

7.- DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

7.1.- TÈCNiques MOLECULARS APLICADES A L'ESTUDI DEL RECEPTOR D'INSULINA

La descripció de la tècnica de la Reacció en Cadena de la Polimerasa (**PCR**) per Saiki i cols al 1985 (88) ha facilitat molt l'obtenció d'ADN en quantitats òptimes per tal de poder-lo manipular i analitzar i ha permès aplicar àmpliament aquesta metodologia per l'estudi de gairebé qualsevol tipus d'ADN que es desitgi. Així, en aquest treball s'ha emprat aquesta tècnica per tal d'amplificar el gen del receptor d'insulina humà. Aquesta amplificació ha permès descartar grans aberracions en el gen, ja que totes les mostres analitzades han presentat la mida corresponent i tots els fragments han pogut ser amplificats sense problemes. Per tant la tècnica de PCR és una tècnica ràpida i eficaç per amplificar l'ADN i per detectar grans aberracions estructurals en el gen del receptor d'insulina.

Per tal de detectar possibles mutacions en els diferents exons del gen del receptor d'insulina es va posar a punt la tècnica de Polimorfismes Conformacionals de Cadena Senzilla (**SSCP**) descrita per Orita i cols. (89). Es van seguir les indicacions de Teschauer i cols (81) per tal de millorar la tècnica. Tot i que mitjançant aquesta tècnica es van detectar variacions en la conformació de diferents exons del gen del receptor d'insulina que ja havien estat descrites anteriorment o no, també és cert que no es va aconseguir trobar les condicions idònies per tal de detectar tots els canvis conformacionals que es van confirmar més tard amb la seqüenciació de l'ADN.

Aquesta tècnica només seria eficaç com a tècnica de criatge un cop se sap què és el que es va a buscar, ja que quan s'empra aquesta tècnica per detectar possibles noves variacions en un determinat fragment d'ADN, aquesta no ens dona una fiabilitat del 100%. Hi ha molts factors que intervenen en el resultat tals com el tampó, la temperatura, el percentatge de l'acrilamida, el voltatge, la composició dels fragments a estudiar, la longitud dels mateixos, etc, i de vegades es fa difícil tenir-los tots controlats de manera que en cada experiment les condicions siguin exactament les mateixes. Petites variacions poden afectar de forma important el resultat de l'electroforesi i fins i tot no són útils les mateixes condicions per diferents variacions en un mateix tipus de fragment.

Per tant l'esforç que ha requerit posar a punt aquesta tècnica per l'estudi del gen del receptor d'insulina, que consta de 22 exons de diferent conformació i de mides molt variables, no ha compensat amb el rendiment que se n'ha obtingut, ja que les mutacions que es detecten en aquest gen no són molt freqüents i a més se solen repetir molt poc (els diferents pacients acostumen a ser portadors de mutacions diferents).

Per altra banda, l'inconvenient de la tècnica de SSCP és que només indica una conformació diferent respecte a la conformació estàndard però no dóna cap tipus d'informació sobre aquest canvi. Per tal de saber la significació d'aquesta variació es fa necessària la seqüenciació.

La **seqüenciació directa** dels productes de PCR és per nosaltres, la manera més ràpida, segura i eficaç de detectar i conèixer variacions en la seqüència dels fragments d'ADN estudiats. L'inconvenient d'aquesta tècnica és el cost econòmic, tant de l'equipament com el cost per mostra.

Per tal de poder estudiar l'estructura i la funció dels receptors mutats, s'ha utilitzat la **mutagènesi dirigida**. Aquesta tècnica, combinada amb la transformació d'aquest ADNc mutat en una *E. Coli* hoste, permet estudiar qualsevol tipus de mutació i permet obtenir la quantitat d'ADN necessari per efectuar els estudis adients.

Mitjançant els kits de mutagènesi emprats s'haurien hagut d'obtenir un elevat nombre de colònies. En el nostre cas només s'ha obtingut un elevat nombre de colònies amb la mutació Leu140. La mutació Val1028 es troba en una zona molt rica en GC i això va provocar problemes alhora de mutar l'ADNc. En els experiments amb aquesta mutació no es van obtenir més que 12 colònies. Per obtenir la mutació splicing-1239Aturada es va forçar el sistema de mutagènesi fent-lo treballar amb un insert més gran del recomanat i únicament es van obtenir 5 colònies. Aquesta baixa freqüència de mutagènesi no ha suposat cap impediment pels estudis posteriors, ja que l'obtenció d'una única colònia mutada és suficient per poder obtenir l'ADN necessari per estudiar, ja que aquesta colònia mutada es pot multiplicar i se'n pot fer un stock de glicerol.

A pesar del baix nombre de colònies obtingudes, més de la meitat d'aquestes eren portadores de la mutació. Per tant el sistema de selecció de les colònies mutades que incorporen els kits de mutagènesi han funcionat, ja que degut al mètode semiconservatiu de replicació de l'ADN únicament esperaríem que un 50% de les colònies obtingudes fossin mutants.

Els sistemes de mutagènesi emprats en aquest estudi utilitzen polimerases d'alta fidelitat (T4 DNA polymerase, *Pfu Turbo* DNA polymerase), per tal de minimitzar les males incorporacions i evitar l'aparició de segones mutacions no desitjades. Tot i emprar aquestes polimerases, hem detectat l'aparició d'una mutació no esperada en un dels experiments, concretament vam detectar la deleció d'una base pròxima a la regió que es volia mutar, fent canviar completament l'efecte de la mutació inserida. Aquest fet ens indica que tot i l'alta fiabilitat dels enzims emprats, es fa necessària la revisió de la seqüència per tal d'assegurar que el que obtenim després de la mutagènesi és realment el que volem.

Per tal d'analitzar *in vitro* les conseqüències fenotípiques d'aquestes mutacions s'han transferit, de manera transitòria, els vectors portadors de l'ADNc mutat a cèl·lules en cultiu d'ovari de Hámster (CHO). El mètode de **transfecció** emprat ha estat la transfecció per lipofecció (utilització de lípids carregats positivament que són capaços d'unir-se tant a l'ADN com a la superfície cel·lular). Aquest mètode ens ha permès expressar l'ADN desitjat en un sistema *in vivo*, de manera que hem pogut estudiar l'efecte de diferents agents, com la insulina i la Metformina, sobre el comportament de la proteïna que ens interessa, en el nostre cas el receptor d'insulina.

7.2.- TÈCNiques EMPRADES PER DETERMINAR LA FUNCIONALITAT DELS RECEPTORS D'INSULINA

Les tècniques que s'han emprat per tal de determinar l'activitat i estructura dels receptors recuperats de les cèl·lules CHO, han permès imitar el cicle de senyalització de la insulina quan s'uneix al seu receptor.

Així doncs s'ha estudiat el nivell d'**expressió** dels receptors, tant l'expressió **total** en el llisat cel·lular, que permet detectar problemes de síntesi o processament post-transcripcional, com l'expressió a la **superfície cel·lular (Biotinització)**, que ens dóna la possibilitat de detectar problemes de transport dels receptors cap a la membrana plasmàtica quan es té la dada de l'expressió total, ja que en principi tots els receptors expressats haurien d'anar cap a la superfície cel·lular un cop la cèl·lula ha

estat estimulada amb insulina. Per tal de determinar l'expressió total s'han emprat dos anticossos diferents; el Carl 10 que està dirigit contra el domini COOH-terminal, és molt específic i dóna una forta senyal, i l'anti IR que està dirigit contra la subunitat i tot i que és específic pel receptor d'insulina, dóna una senyal més dèbil que el Carl 10 i a més es detecten múltiples bandes inespecífiques. Aquest últim anticòs s'ha hagut d'emprar per detectar el receptor amb la mutació d'splicing (que no conté el domini COOH-terminal). Les múltiples bandes detectades poden ser degudes a què la subunitat del receptor d'insulina és força semblant a les subunitats dels receptors de la mateixa família (receptor IGF-1, insulin receptor related receptor), en canvi el domini COOH-terminal és molt més específic del receptor.

Per tal de detectar problemes d'estructura en la subunitat dels receptors i problemes d'afinitat per la insulina s'ha estudiat la **unió de la insulina** als receptors, tant en el llisat cel·lular, *in vitro*, com en cèl·lules en suspensió, *in situ*. En una situació normal el valor d'unió *in vitro* (llisat cel·lular) juntament amb el de l'expressió total es corresponen. Quan hi ha algun problema de processament del receptor aquests dos valors presenten una discordància, demostrant que no tots els receptors expressats són capaços d'unir insulina. Així mateix la unió *in situ* es correspon amb l'expressió del receptor a membrana (Biotinització).

Per estudiar l'activitat intracel·lular dels receptors i la seva capacitat de transmetre el senyal, s'ha estudiat si hi ha **autofosforilació** del receptor com a conseqüència de l'estimulació per la insulina un cop unida al receptor. Les dades obtingudes han permès detectar defectes en la capacitat d'unió de l'ATP pel receptor. També s'ha estudiat si els receptors presentaven **activitat enzimàtica tirosina quinasa** a través de la fosforilació de substrats exògens (pèptid sintètic FYF i el Poly Glu:Tyr 4:1). Les dades obtingudes han permès analitzar la capacitat dels receptors per interaccionar amb d'altres proteïnes intracel·lulars, mitjançant la seva fosforilació, que serien substrats del propi receptor i que s'encarregarien de transmetre el senyal iniciat per la insulina cap al nucli.

Aquests assajos ens han permès caracteritzar els receptors mutats objecte d'aquest treball, d'una manera lògica i seqüencial mimetitzant els aconteixements naturals que es donen en la cèl·lula i permetent conèixer en quins passos aquests receptors presenten problemes.

7.3.- PACIENTS AMB RESISTÈNCIA A LA INSULINA SUBSIDIARIS DE PRESENTAR MUTACIONS EN EL GEN DEL RECEPTOR D'INSULINA

S'ha estudiat aquesta sèrie de pacients per tal d'intentar determinar la causa de la resistència a la insulina que pateixen, o si més no, per tal de descartar o confirmar lesions en el gen del receptor d'insulina.

7.3.1.- PACIENTS AMB RESISTÈNCIA A LA INSULINA D'ETIOLOGIA DESCONEGUDA

Dins d'aquest grup s'han estudiat una sèrie de 9 pacients (6 del sexe femení i 3 del sexe masculí) que presentaven resistència moderada o greu a la insulina però que no entraven a formar part de les síndromes estudiades en aquest treball.

La classificació d'aquests pacients és controvertida ja que molts comparteixen moltes característiques amb la síndrome de resistència a la insulina Tipus A, com són la resistència a la insulina, l'hiperandrogenisme o l'acantosis nigricans. Els punts de discrepància es troben en la severitat d'aquestes característiques o en la presència o no d'alguna altra característica com pot ser el pes o problemes menstruals (en les noies). Aquesta problemàtica en la classificació porta de vegades a discrepàncies entre autors, ja que n'hi ha que inclouen dins de la síndrome de resistència Tipus A a aquelles pacients que també presenten obesitat (90), mentre que la primera descripció d'aquesta síndrome corresponia a adolescents que no presentaven obesitat i si la resta de característiques (52,53).

En aquest treball s'ha respectat la descripció inicial de resistència a la insulina Tipus A i s'han exclòs d'aquest grup les pacients que presentaven ovari poliquístic o obesitat i s'ha agrupat en aquest altre grup de resistència idiopàtica a la insulina.

En aquest grup de pacients estudiats no es va detectar cap mutació en el gen del receptor d'insulina. Aquesta dada ha fet descartar que la possibilitat que la resistència a la insulina que pateixen sigui deguda a lesions en aquest gen.

7.3.2.- PACIENTS AMB OBESITAT

Es va incloure en aquest treball una pacient que presenta un obesitat molt severa de la part superior del cos, ja que tot i que l'obesitat no és una síndrome pròpiament genètica de resistència a la insulina, s'ha descrit alguna mutació en el gen del receptor d'insulina en pacients amb aquest problema (91,92). Els estudis realitzats confirmen que aquesta pacient no presenta mutacions en aquest gen i que per tant la resistència severa que presenta a la insulina pot ser deguda a d'altres factors com pot ser la pròpia obesitat o a lesions en d'altres gens relacionats amb l'obesitat.

7.3.3.- PACIENTS AMB LIPODISTROFIA

S'han inclòs aquest estudi quatre pacients afectes de la síndrome de Lipodistròfia. En aquesta síndrome tot i no pertànyer al grup de síndromes genètiques de resistència a la insulina, Yokota i cols. al 1990 van descriure una mutació en el gen del receptor d'insulina d'un pacient amb aquestes característiques (93). Encara que no van poder determinar l'efecte d'aquesta mutació sobre el funcionament del receptor transfectant cèl·lules CHO, van creure que la mutació podia ser la responsable de la resistència a la insulina.

El resultat de l'estudi dels receptors en aquest tipus de pacients en aquest treball, ha confirmat l'absència de mutacions en el gen del receptor d'insulina, i és concordant amb la majoria d'estudis que s'ha fet en pacients amb Lipodistròfies on no s'han detectat mutacions en aquest gen (94). Per tant en aquesta patologia les mutacions en el gen del receptor d'insulina són més una excepció que la causa directa de la resistència a la insulina.

7.3.4.- PACIENTS AMB LA SÍNDROME DE LEPRECHAUNISME

La síndrome de Leprechaunisme es caracteritza per ser la més greu del grup de síndromes genètiques de resistència a la insulina. Els afectats per aquesta síndrome presenten problemes de creixement intrauterí i seriosos problemes de la regulació de les glucèmies post-natals entre d'altres. En aquest treball s'han estudiat els receptors d'una parella jove que havien perdut un fill recent nascut per problemes greus de regulació de la glucèmia. Es va sospitar que el neonat podia patir Leprechaunisme un cop aquest havia mort, i per tant es va fer l'estudi dels pares. El resultat de l'estudi

molecular dels receptors dels progenitors va donar negatiu per mutacions en el gen del receptor d'insulina.

Fins avui, s'han descrit diferents pacients amb la síndrome de Leprechaunisme, la majoria dels quals presenten mutacions en homozigosi o són heterozigots compostos (58,62,64,83,95-97) (entre d'altres), també s'ha descrit algun pacient heterozigot per una mutació i associat a uns nivells d'ARNm baixos (56,57,98) o associat a una alteració de les isoformes del receptor (99). Segons el nostre coneixement només s'ha descrit un cas de Leprechaunisme on no s'han detectat mutacions en cap del 22 exons que componen el gen del receptor d'insulina (ni en les seves immediates regions intròniques), ni en el promotor d'aquest gen (100). Per tant la raresa d'aquest cas i la característica que la majoria de casos són homozigots o heterozigots compostos van fer descartar la sospita del diagnòstic de Leprechaunisme en el nadó objecte d'aquest estudi, ja que a més els clínics no van poder donar informació concreta sobre si aquest nadó presentava o no els trets fenotípics característics de la síndrome.

7.3.5.- PACIENTS AMB LA SÍNDROME DE RABSON MENDENHALL

Es van detectar dues mutacions diferents en heterozigosi en el pacient estudiat amb la síndrome de Rabson-Mendenhall; Asn15Lys i Arg1000Aturada. L'estudi dels receptors d'insulina en eritròcits va revelar que aquest pacient gairebé no presentava receptors en aquest tipus cel·lular (**figura 47**).

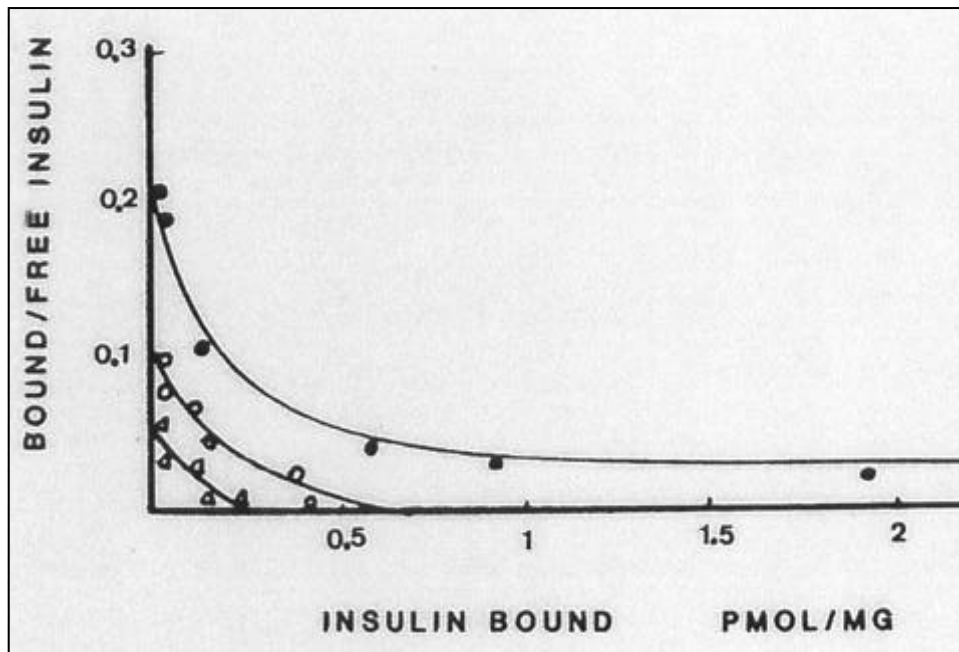


Figura 47.- Corba d'scathard de la unió de la insulina en els receptors d'eritròcits en la família del pacient RM1. ●; pacient RM1, ○; pare del pacient RM1, ▲; mare del pacient RM1.

Aquest pacient té un familiar que presenta la mateixa síndrome amb les mateixes mutacions (veure **figura 46**). El desenvolupament de la malaltia en aquests dos pacients ha anat paral·lela, per tant a més de compartir el genotip (a nivell del gen del receptor d'insulina) també comparteixen fenotip. Els receptors d'aquest familiar van ser estudiats per Kadowaki i cols. (83) qui varen descriure i analitzar per primer cop aquestes dues mutacions. El fet de presentar un codó d'aturada prematur en l'exó 17 just abans del lloc d'unió de l'ATP, en el domini tirosina quinasa, va fer pensar que aquest receptor podria mantenir la capacitat d'ancorar-se a la membrana cel·lular, ja que manté el domini transmembrana, i que mantindria la capacitat de lligar la insulina, ja que la subunitat β no estava afectada. Van detectar un nivell d'expressió de l'al·lel amb la mutació Aturada1000 molt baix (90% menys) comparat amb l'al·lel amb el codó Lys15. En cas que aquest receptor fos expressat tampoc seria funcional el mecanisme de transmissió del senyal iniciat per la insulina, ja que li manca la seqüència consens per la unió de l'ATP i per tant de l'activació enzimàtica tirosina quinasa intrínseca, imprescindible per transmetre el senyal (83).

Fent estudis d'expressió amb la mutació Lys15 (101), es va detectar que el receptor amb aquesta mutació uneix la insulina amb un percentatge molt més baix que els receptors WT. Aquesta disminució en la unió era deguda a dos factors; la mutació impedeix el processament post-transcripcional del receptor i a més impedeix també el transport d'aquest cap a la membrana plasmàtica. Estudis d'afinitat van revelar que aquesta també estava molt disminuïda respecte als receptors WT. Segons aquests autors la Asn15 seria l'aminoàcid inicial, en l'extrem N-terminal, per formar una α -hèlix, per tant en aquesta posició una Lys trencaria aquesta formació distorsionant l'estructura terciària.

Quon i cols. (102) fent estudis *in vitro* de caracterització post-unió de la insulina conclouen que els receptors Lys15 són capaços d'aconseguir un nivell d'autofosforilació normal però requereixen d'una concentració d'insulina molt més elevada degut al problema de la baixa afinitat amb què aquests receptors lliguen la insulina.

Kusari i cols. (103) descriuen una altra pacient afecta d'una síndrome de resistència severa a la insulina, heterozigota composta per dues mutacions en el gen del receptor d'insulina; Arg1000Aturada i Arg993Gln. Aquesta pacient no té cap tipus de relació familiar amb els anteriors pacients citats.

Els estudis efectuats per Kusari i cols. sobre la mutació Aturada1000 són coincidents amb els de Kadowaki i cols, corroborant la important disminució de l'expressió i el seu efecte.

El pacient estudiat en aquest treball, presenta una resistència a la insulina molt important (veure **taula 4**). Els estudis d'unió de la insulina en eritròcits, fets pel nostre grup, denoten una pràctica inexistència de receptors en les membranes plasmàtiques d'aquestes cèl·lules. Aquesta dada és corroborada pels resultats obtinguts pels altres dos grups en quant a la presència de receptors a membrana. La severa resistència a la insulina que presenta es pot explicar, doncs, pel baix número de receptors que s'expressen a la membrana plasmàtica i a la disminució en l'afinitat d'aquests degut a l'efecte que exerceixen les mutacions Arg1000 i Lys15 en heterozigosi presents en el gen del receptor de la insulina.

7.3.6.- PACIENTS AMB LA SÍNDROME DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA TIPUS A O DE KAHN

En aquest treball s'han estudiat tres pacients amb la síndrome de resistència a la insulina Tipus A, respectant la descripció d'aquesta síndrome (adolescents que presenten resistència severa a la insulina (hiperinsulinisme), acantosis nigricans i hiperandrogenisme en absència d'obesitat i anticossos) (52,53). Hi ha autors que inclouen en aquesta síndrome pacients que presenten obesitat i postulen que les mutacions en el gen del receptor d'insulina en la síndrome de resistència a la insulina Tipus A no és un tret constant (44).

En aquestes tres pacients s'han descobert tres noves mutacions en el gen del receptor d'insulina que afecten de diferent manera el funcionament normal del receptor:

7.3.6.1.- MUTACIONS QUE AFECTEN LA SÍNTESI DEL RECEPTOR I LA UNIÓ DE LA INSULINA

La pacient A1, estudiada en aquest treball, està afectada de la síndrome genètica de resistència a la insulina Tipus A i és heterozigota composta per mutacions en el gen del receptor d'insulina (**Val140Leu** / Splice 21-Aturada 1239) (Article 1). La mutació de canvi de sentit en l'exó 2 afecta al codó 140 i canvia una Valina per una Leucina (**Val140Leu**). L'exó 2 del receptor d'insulina s'extén des de l'aminoàcid 7 fins el 191. En aquesta regió s'hi troba el domini L1 (aminoàcids 1-119) on es troben dues regions implicades directament amb la unió de la insulina (aminoàcids 1-68 i 83-95).

Els dos aminoàcids involucrats en aquesta mutació (Val140Leu) pertanyen al grup dels aminoàcids neutres i hidrofòbics pel que faria pensar que la substitució de l'un per l'altre no faria variar considerablement l'estructura secundària i terciària de la proteïna, ni per tant la seva funcionalitat.

Els estudis efectuats per determinar l'efecte fenotípic d'aquesta mutació ha indicat que el receptor mutat s'expressa significativament menys que el receptor WT, tant a membrana plasmàtica com en el llistat cel·lular, i que l'afinitat d'aquests receptors per la insulina és menor. Aquestes dades, contràriament al què faria pensar la naturalesa dels dos aminoàcids, indiquen un possible problema de síntesi o de

degradació prematura del receptor mutat, així com un problema d'estructura o conformació en la regió d'unió de la insulina, ja que aquests receptors presenten una menor afinitat pel seu lligand. D'altres mutacions que han estat descrites en el receptor d'insulina i que provoquen un efecte similar són la **Gly31Arg** que va ser descrita en heterozigosi en un pacient amb la síndrome de Leprechaunisme (**Gly31Arg** / WT) (104). Aquest aminoàcid és el centre d'un motiu de Gly en el domini L1 i per tant un aminoàcid molt conservat. En estudis d'expressió d'aquests receptors mutats únicament es va poder detectar el proreceptor, indicant problemes de processament post-transcripcionals. També es van detectar problemes en el plegament de la proteïna donant lloc a un canvi conformacional i resultant en una absència d'unió d'insulina i per tant absència d'autofosforilació. S'ha predit que la Gly31 estaria ubicada en la regió de transició entre una hèlix i una làmina (80) i que per tant seria molt important per determinar el plegament i la conformació de la subunitat del receptor. Les mutacions **Asp59Gly** i **Leu62Pro** s'han descrit en una pacient heterozigota composta, afecta de la síndrome genètica de resistència a la insulina Tipus A (**Asp59Gly** / **Leu62Pro**) (105). Aquests receptors mostraven una dramàtica disminució en la unió de la insulina, efecte similar al trobat en el pacient RM1 estudiat en aquest treball. Aquesta disminució es pot deure a un canvi en la conformació del receptor degut a les mutacions, ja que estan situades en motius de Gly en el domini L1, o bé degut a què són aminoàcids situats en una regió que confereix especificitat per la unió del lligand (aminoàcids 1-68) (105). La mutació **Arg86Pro** va ser trobada en homozigosi en un pacient afecte de la síndrome de Leprechaunisme (**Arg86Pro** / **Arg86Pro**) (106). Aquest aminoàcid no és conservat entre membres de la mateixa família de receptors, encara que es troba en una regió implicada en la unió de la insulina (aminoàcids 83-95). Aquest receptor presenta problemes de processament post-transcripcional en estudis de transfecció, mentre que es processa naturalment en fibroblasts del pacient. *In vivo* el receptor presenta una autofosforilació i una activitat tirosina quinasa constitutiva i és capaç d'activar el transport de glucosa a pesar de no tenir afinitat per la insulina. Sembla ser que la posició 86 actuaria com una frontissa entre els dos dominis d'unió de la insulina (aminoàcids 1-68 i 83-95), per tant un canvi en aquest punt modificaria la conformació impedit generant un lloc d'alta afinitat per la insulina, mentre que estabilitzaria una conformació activa per l'activitat tirosina quinasa (106). *In vitro* tot i detectar aquesta activació constitutiva de l'activitat enzimàtica, aquest receptor no és capaç de fosforilar els seus substrats en absència d'insulina (107). La mutació **Leu87Pro** va ser

descrita en heterozigosi en una pacient amb la síndrome de Leprechaunisme (**Leu87Pro** / deleció de 1,3 Kpb entre els exons 4 i 6) (108). Aquesta mutació es troba en un dels presumptes llocs per la unió de la insulina (aminoàcids 83-95). Els estudis efectuats per determinar l'efecte d'aquesta mutació van indicar que aquest receptor mutat es dimeritzava més lentament que el WT, que s'expressava a la superfície cel·lular de manera normal, que tenia una afinitat per la insulina menor que el WT i la seva fosforilació era normal tenint en compte la unió de la insulina. Degut a què el receptor s'expressa en superfície de manera normal i l'únic que varia és l'afinitat per la insulina, els autors postulen que aquest pot ser un lloc directe d'unió de la insulina, a més, estudis de mutagènesis d'aquesta posició amb d'altres aminoàcids han indicat que només hi ha modificació de l'afinitat per la insulina (108). La mutació **Deleció de l'exó 2 respectant el marc de lectura** es va detectar en heterozigosi en una pacient amb la síndrome de resistència a la insulina Tipus A (**Deleció de l'exó 2 respectant el marc de lectura** / Phe996Ile) (109). Aquest receptor uneix la insulina un 13% respecte als receptors normals i amb una afinitat lleugerament disminuïda. Van detectar que els nivells d'ARNm de l'al·lel normal d'aquest pacient s'expressaven d'una manera molt pobre, mentre que l'al·lel amb la deleció s'expressava de manera normal. Els autors desconeixen el mecanisme pel qual l'expressió de l'al·lel normal és inhibida, encara que no és el primer cas en el que es dona aquesta situació (68,83). També apunten a un possible problema d'imprinting dels al·lells (22).

La mutació Leu140 no es troba en cap de les zones presumptament importants per la unió de la insulina, tot i que es troba en l'exó 2. Això indica que l'efecte sobre el receptor no és directament sobre els punts d'unió de la insulina encara que l'afinitat està disminuïda. Aquest residu, però, és molt conservat entre espècies i entre receptors de la mateixa família. Els receptors presenten una activitat enzimàtica normal respecte als nivells d'expressió, pel que es descarten problemes de transmissió del senyal. Per tant aquesta mutació afecta al número de receptors expressats en superfície i a l'afinitat d'aquests receptors pel seu lligand.

En general les mutacions que es troben en aquesta regió (exó 2 del receptor) afecten al processament i a la unió, tal i com s'ha vist més amunt, i tot i que hi ha mutacions descrites que no es troben en els punts que es creuen crítics per la unió, també afecten a aquesta funció. També s'ha descrit una mutació situada en el domini L1, la **Deleció de la Lys121**, detectada en heterozigosi en un pacient afecte de la

síndrome de Leprechaunisme (**Deleció de la Lys121 / WT**) (110), que no afecta a la unió de la insulina. Encara que es va detectar un increment de la fosforilació basal d'aquest receptor tot i que la fosforilació depenent de la insulina era normal, mentre que a nivell d'activitat tirosina quinasa també es va detectar un increment d'activitat basal, mentre que l'activitat estimulada per la insulina estava disminuïda. L'efecte més greu d'aquesta mutació sobre l'acció de la insulina és que aquest receptor és incapaç de transmetre el senyal mitogènic (110). Aquest fet indicaria que per un correcte reconeixement de la insulina pel receptor es requereix una conformació de la subunitat , o al menys de l'exó 2 correcte, i que no es coneixen exactament tots els punts d'ancoratge de la insulina al receptor ni la significació de les regions colindants en el fet de la unió.

Per tant doncs la possibilitat d'estudiar diferents receptors mutats en la subunitat que es detecten en pacients amb resistència a la insulina, ajuda a la comprensió global dels mecanismes i punts d'unió de la insulina i als requeriments conformacionals que existeixen per tal de que la insulina pugui iniciar el senyal que ha de ser transmès a través del receptor.

Aquest al·lel mutat detectat en la pacient A1 (Leu140) és heretat del pare (pacient 10/11.1) que tot i presentar els nivells d'insulina alts, és normoglicèmic i no presenta cap símptoma de resistència a la insulina (veure **taula 4**). Aquest fet deu ser degut a què tot i que la mutació exerceix un efecte negatiu sobre la funcionalitat del receptor, en el pare es deu mantenir un al·lel normal i aquest deu pal·liar l'efecte destorbador de la mutació (no es pot garantir ja que no s'ha seqüenciat tot el gen, però és molt improbable que el pare presentés una altra mutació en l'altre al·lel i no ho expressés fenotípicament).

7.3.6.2.- MUTACIONS QUE AFECTEN ALS LLOCS DE PROCESSAMENT DE L'ARNm

El receptor d'insulina (al igual que la majoria de gens eucariotes) conté les seqüències d'ADN codificants de manera discontinua seguint el model exó-intró-exó, on els exons representen les regions codificants. El processament (splicing) d'aquestes seqüències per tal d'unir les regions codificants requereix d'unes seqüències consens específiques a cada extrem de cada exó (111) (**figura 48**).

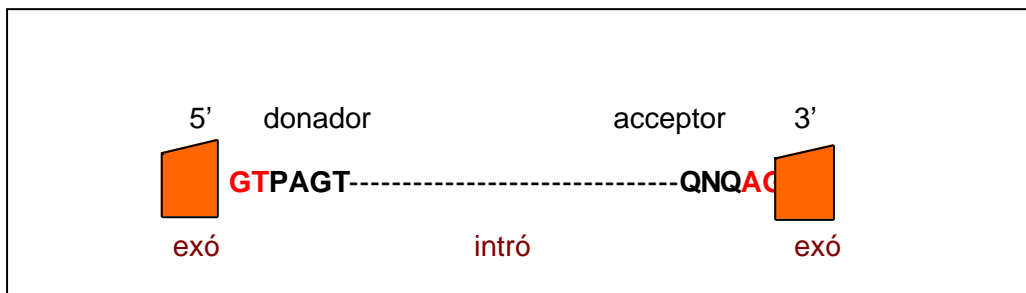


Figura 48.- Representació de les seqüències consens donadora i acceptora d'splicing en els introns. P=A/G, Q=T/C, N=qualsevol nucleòtid

Les mutacions en les seqüències consens per l'splicing poden donar lloc a quatre situacions diferents: expulsió d'un exó (56%), en el receptor d'insulina trobem els següents casos: la **transició GT→AT en la primera base de la seqüència donadora d'splicing de l'intró 14**. Aquesta mutació es va descriure en heterozigosi en dos cosins afectats de la síndrome de resistència a la insulina Tipus A (**G-A 5' intró 14 / WT**) (112). Aquesta mutació provoca l'expulsió de l'exó 14, de manera que l'exó 13 s'uneix al 15, i a més canvia el marc de lectura provocant una aturada prematura en el codó 867. Per tant la proteïna resultant d'aquest ARNm està truncada en el domini extracel·lular de la subunitat , li manca el domini transmembrana d'ancoratge i el domini intracel·lular. La **transició GT→AT en la primera base de la seqüència donadora d'splicing en l'intró 17** també és un altre exemple d'expulsió d'un exó. Aquesta mutació va ser descrita en heterozigosi en un pacient afecte d'una miopatia congènita (Congenital Fiber-Type Disproportion Myopathy) (**G-A 5' intró 17 / Arg1174Gly**) (113). Aquesta mutació dóna lloc a l'expulsió de l'exó 17, es dóna un corriment de la pauta de lectura després de l'exó 16 en el codó 979 i després de 36 aminoàcids es crea una aturada prematura en el codó 1015. Per tant a aquest receptor li manca aproximadament el 50% de la subunitat amb tot el domini tirosina quinasa inclòs i no presenta aquesta activitat enzimàtica (113,114).

Una altra situació és l'activació d'un lloc d'splicing críptic (32%) com per exemple la **transició GT→AT del primer nucleòtid de la seqüència donadora d'splicing en l'intró 13** en el gen del receptor d'insulina. Aquesta mutació va ser descrita en heterozigosi en un pacient afecte de la síndrome de Leprechaunisme (**G-A 5' intró 13 / delecio Asn281**) (115). Aquesta mutació aboleix el lloc donador d'splicing en l'intró 13, i s'activa un lloc d'splicing críptic 27 pb dins l'exó 13 (així doncs aquest exó té 27 pb menys que un exó 13 normal), aquesta delecio respecta el marc de lectura i per tant manquen els aminoàcids 859-867, situats en el domini extracel·lular de la subunitat del receptor. Els fibroblasts dels familiars portadors d'aquesta mutació presenten una disminució en la unió de la insulina (115).

Les altres dues situacions que es poden trobar quan es dona una mutació en un lloc d'splicing són la creació d'un pseudo-exó dins d'un intró (11%), i la retenció d'un intró entrant a formar part de l'exó (6%) (116).

També es poden donar dues circumstàncies diferents degut a la mateixa mutació com passa amb la mutació del gen del receptor d'insulina, **transició AG→GG en la primera base de la seqüència acceptora d'splicing en l'intró 4**. Aquesta mutació va ser descrita en heterozigosi en un pacient amb la síndrome de Rabson-Mendenhall (**G-A 3' intró 4 / delecio 8 pb en l'exó 12**) (117). Es van detectar dos tipus d'ARNm defectuosos; en un l'exó 5 havia estat expulsat i s'havia creat una aturada prematura en el codó 341 causant el trencament de la subunitat, i en l'altre s'havia activat un lloc d'splicing críptic 12pb endins de l'exó 5, canviant una Asn per una Thr en el codó 348 i eliminant quatre aminoàcids, donant lloc a un receptor anormal. Tot i que aquesta mutació és d'origen matern, només es va detectar el tipus d'ARNm amb el lloc críptic d'splicing en el pacient. Aquesta mutació es troba en l'extrem C-terminal del domini ric en Cys. Aquest receptor anormal s'expressa molt menys que un receptor normal, uneix la insulina amb una afinitat molt més baixa i manté l'activitat enzimàtica tirosina quinasa (d'acord amb l'expressió) degut a que no té defectes en la subunitat (117,118).

Aquesta situació on es donen dues anomalies també es dona en la mutació en un lloc d'splicing descrita en aquest treball, la **transició AG→AA en heterozigosi en la segona base de la seqüència acceptora d'splicing de intró 21** del gen receptor d'insulina, descrita en les dues pacients germanes A1 (**G-A 3' intró 21 / Val140Leu**) i

A2(**G-A 3' intró 21** / WT) afectes de la síndrome de resistència a la insulina Tipus A (Article 1).

Aquesta mutació dóna lloc a dos ARNm diferents, en un s'inactiva el lloc acceptor d'splicing, degut a la pròpia mutació, i s'activa un lloc d'splicing críptic dins de la regió del exó 22, de manera que part de la seqüència exònica 22 queda eliminada, i es crea un codó d'aturada just després d'aquest nou lloc d'splicing, de manera que l'exó 22 queda expulsat. En l'altre s'inactiven tant el lloc donador com l'acceptor d'splicing WT, i s'activa un lloc donador críptic dins de la regió intrònica, de manera que seqüència intrònica queda retinguda dins l'exó 21, i per l'altra part s'activa el mateix lloc acceptor críptic que en la situació anterior i per tant també li manca seqüència exònica 22 i es crea altre cop un codó d'aturada. La proteïna resultant d'ambdós ARNm és la mateixa, ja que en els dos ARNm es crea un codó d'aturada prematura en la mateixa posició; just després de la Val1238 que és l'aminoàcid limítrof entre els exons 21 i 22, per tant al receptor resultant li manquen 117 aminoàcids del domini COOH-terminal de la subunitat que componen l'exó 22.

Aquests receptors s'expressen pràcticament com els receptors normals i uneixen un 50% menys la insulina que els receptors RI.WT, fet que fa sospitar de l'existència de problemes de processament ja que no tots els receptors que s'expressen són capaços d'unir la insulina. Aquests receptors no tenen la capacitat d'autofosforilar-se com a resposta a l'estímul de la insulina i a conseqüència d'això no retenen l'activitat enzimàtica tirosina quinasa.

Aquesta mutació és d'origen matern. Tot i que la mare també és heterozigota per la mutació no presenta resistència a la insulina, encara que presenta uns nivells basals d'insulina lleugerament elevats (veure **taula 4**).

L'extrem COOH-terminal del receptor d'insulina és específic d'aquest receptor i difereix en la seva composició aminoacídica de la resta de receptors tirosina quinasa. És interessant l'estudi de receptors truncats en aquesta regió per tal de determinar-ne la funció, així doncs diferents grups han fet estudis amb receptors d'insulina sintetitzats amb deleccions en aquesta regió. Maegawa i cols. (119) van estudiar les propietats d'un receptor d'insulina truncat al qual li mancaven els 43 aminoàcids finals (RI 43). Expressat en les cèl·lules Rat 1, aquest receptor mantenia les propietats d'unió de la insulina, de l'autofosforilació, d'endocitosi i reciclatge així com l'activitat tirosina quinasa. Tot i això el receptor era defectiu en transmetre les respostes metabòliques de la insulina.

Levy-Toledano i cols. (120) van estudiar un receptor al qual li mancaven el 113 últims aminoàcids de la subunitat (RI 113). Aquests receptors van ser expressats de manera estable en cèl·lules CHO i en NIH-3T3. El processament post-transcripcional d'aquest receptor mutat estava alterat, el trencament proteolític del proreceptor en les subunitats i estava frenat i encara que aquest receptor mutat s'expressava en la superfície cel·lular, la degradació de les subunitats madures estava accelerada. A més aquest receptor era deficient en l'autofosforilació i en l'endocitosi estimulades per la insulina contràriament als receptors RI 43. Van suggerir que els aminoàcids compresos entre el 1242 i el 1311 eren necessaris per diverses funcions associades al domini intracel·lular del receptor; com són l'autofosforilació, l'activitat tirosina quinasa i l'endocitosi del receptor.

Baron i cols. (121) van estudiar el domini acídic comprès entre els aminoàcids 1281 i 1291 mitjançant un anticòs dirigit a aquesta regió. Aquest anticòs va inhibir l'autofosforilació de les tirosines 1158, 1161 i 1162, llocs que són moduladors de l'activitat del receptor. L'anticòs també va disminuir l'activitat tirosina quinasa del receptor mesurada mitjançant la fosforilació del poly Glu:Tyr i de pèptids sintètics. També van observar que aquest anticòs competia amb les histones (moduladors de l'activitat tirosina quinasa) per unir-se al receptor. Els autors proposen que aquesta regió estaria involucrada en la unió de substrats del receptor i en la regulació de l'autofosforilació i activitat tirosina quinasa. Per tant suggereixen que aquest domini podria interaccionar amb proteïnes cel·lulars modulant la quinasa del receptor.

Gual i cols. (122) van emprar un anticòs dirigit al domini 1301-1328 del receptor d'insulina. Van comprovar que aquest anticòs inhibia la fosforilació induïda per la insulina de substrats tant endògens (Src i IRS-1) com exògens (Poly Glu:Tyr i pèptids sintètics) del receptor però no l'autofosforilació del propi receptor. Per tant l'anticòs interferia d'alguna manera amb el lloc enzimàtic del receptor i així doncs l'extrem COOH-terminal tindria algun tipus de paper regulador.

El receptor descrit pel nostre grup és l'únic d'aquestes característiques trobat en un pacient. El domini deletat degut a la mutació d'splicing comprèn la major part dels dominis que s'han estudiat en els treballs descrits més amunt i per tant és d'esperar que a aquest receptor li manquin totes les activitats reguladores que s'han descrit. Els resultats obtinguts dels estudis funcionals així ho corroboren, validant el fet que aquesta regió ha de tenir un paper regulador de l'activitat tirosina quinasa.

Donat que aquest receptor no presenta cap anomalia en la seva seqüència fins passat el domini tirosina quinasa, no s'hauria de preveure cap problema en

l'autofosforilació, ja que les tirosines d'aquest domini estan intactes. L'estudi fet per Tennagels i cols. (123), emprant només el domini tirosina quinasa amb les tirosines de l'extrem COOH-terminal mutades a Fenilalanines, va donar com a resultat que el receptor es podia fosforilar però que no podia transmetre el senyal. D'alguna manera l'extrem COOH-terminal interacciona amb el loop catalític i permetria la interacció amb els substrats cel·lulars, de manera que quan les tirosines COOH-terminals estan mutades hi ha un canvi conformacional que impedeix la interacció amb el loop catalític.

El receptor mutat objecte del present estudi, no presenta autofosforilació tot i tenir el loop catalític intacte, en contraposició amb els receptors estudiats per Tennagels. Aquesta discrepància pot ser deguda a què els receptors de Tennagels tot i estar mutats, conservaven l'extrem COOH-terminal, en canvi els receptors RI.1239Aturada del present estudi no conserven aquest domini. Per tant per la correcta fosforilació del receptor i l'activació enzimàtica associada és necessari, a més de les tirosines de l'extrem COOH-terminal, la presència de tot el domini terminal.

L'absència de l'extrem COOH-terminal en el receptor IR.1239Aturada, donaria problemes de processament del receptor i donaria lloc a un receptor amb una conformació alterada, que seria el causant de la inactivació de l'autofosforilació i de l'activitat tirosina quinasa.

7.3.6.3.- MUTACIONS QUE AFECTEN AL DOMINI TIROSINA QUINASA

El domini tirosina quinasa comprèn els exons 17-21 (aminoàcids 978-1238) i és el responsable de l'activitat enzimàtica del receptor. En aquest domini és on s'han descrit la majoria de mutacions en el receptor d'insulina.

En aquest treball s'ha identificat una mutació nova, en heterozigosi, en el domini tirosina quinasa del receptor d'insulina en una pacient amb resistència a la

insulina Tipus A (pacient A3, **Ala1028Val** / WT) (Article 1). Ambdós aminoàcids són hidrofòbics neutres, cosa que faria pensar que el canvi no modificaria de manera important l'estructura del receptor ni per tant la seva funció. Aquesta mutació es troba en el domini de reconeixement i unió de l'ATP (aminoàcids 1003-1030) que és molt conservada en les tirosines quinases, i a més el residu Val1028 és molt pròxim al residu Lys1030 que sembla ser clau per l'activitat tirosina quinasa del receptor.

Els estudis funcionals han determinat que les propietats de la subunitat en quant a la unió i afinitat per la insulina són equivalents a un receptor WT. L'autofosforilació d'aquest receptor mutat està del tot inhibida, a l'igual que l'activitat tirosina quinasa (4% respecte als receptors WT). Tot i que el canvi d'aminoàcid és conservatiu (els dos aminoàcids són del mateix grup), aquest deu provocar un canvi prou significatiu en la conformació de la seqüència de reconeixement de l'ATP impeding-ne la unió.

La gran part de mutacions descrites en aquest domini afecten d'alguna manera a l'activitat enzimàtica tirosina quinasa, igual que la mutació Val1028. Així doncs s'ha descrit la mutació **Arg993Gln** en heterozigosi en un pacient afecte de la síndrome de resistència a la insulina Tipus A (**Arg993Gln** / Arg1000Aturada) (103). L'al·lel amb aquesta mutació presenta uns nivells d'autofosforilació / activitat tirosina quinasa molt reduïts. La **Phe996Ile** es va descriure en heterozigosi en una pacient afecta de resistència a la insulina Tipus A (**Phe996Ile** / Deleció exó 2) (109). Aquest residu es troba en el domini juxtamembrana i és un residu semiconservat. La **Gly1008Va** es va descriure en heterozigosi en un pacient amb resistència a la insulina Tipus A (**Gly1008Val** / WT) (124). Aquesta mutació es troba en la tercera Gly del motiu Gly1003-Xaa-Gly1005-Xaa-Xaa-Gly1008 molt conservat en el domini tirosina quinasa ja que és el lloc d'unió de l'ATP. L'efecte d'aquesta mutació és l'abolició de l'activitat tirosina quinasa del receptor mutat impeding la transmissió del senyal. La **Ala1048Asp** està descrita en heterozigosi en una pacient afecta de resistència a la insulina Tipus A (**Ala1048Asp** / WT) (125). L'activitat tirosina quinasa d'aquests receptors està molt disminuïda tot i que l'ATP es pot unir normalment, indicant que aquest canvi d'aminoàcid produeix un canvi conformacional que afecta la regió de la tirosina quinasa impeding-li funcionar. L'**Arg1092Gln** es va descriure en homozigosi en un pacient amb la síndrome de Leprechaunisme (**Arg1092Gln** / **Arg1092Gln**) (260). L'activitat tirosina quinasa en els limfoblasts del pacient era un 90% inferior al de receptors WT. La unió de la insulina i l'afinitat eren normals. Aquest residu es troba en un loop connector entre dos lòbuls de subunitats que interaccionen per donar una forma oberta o tancada, cosa que ha suggerit que està implicada en l'especificitat de substrat. L'**Arg1131Gln** va ser descrita en heterozigosi en un pacient amb resistència a la insulina Tipus A (**Arg1131Gln** / WT)

(127). Aquesta mutació es troba en el loop catalític del domini tirosina quinasa (aminoàcids 1131-1137). Aquests receptors mutats s'expressen a membrana i uneixen insulina amb una afinitat equivalent a la dels receptors WT. La mutació Gln1131 inhibeix l'activitat tirosina quinasa i la capacitat de fosforilar els substrats endògens IRS-1 així com també es detecta una disminució de la PI3K fosforilada. L'**Ala1134Thr** es va descriure en heterozigosi en una pacient amb la síndrome genètica de resistència a la insulina Tipus A (**Ala1134Thr** / WT) (128). Aquests receptors mutats s'expressen i uneixen la insulina normalment, però són incapaços d'autofosforilar-se i de fosforilar substrats endògens. El residu Ala1134 és molt conservat en el lloc catalític de moltes tirosines quinases i per tant deu ser important pel manteniment de la funció enzimàtica. L'**Arg1152Gln** es va descriure en heterozigosi en un pacient amb Diabetis Mellitus Tipus 2 (**Arg1152Gln** / ?? (No es van estudiar tots els exons del gen del receptor d'insulina en aquest pacient)) (47). Aquest receptor presentava autofosforilació però l'activitat tirosina quinasa no responia a l'estimulació per la insulina, per tant es creu que la regió d'aquesta posició pot ser important per la interacció amb els substrats intracel·lulars del receptor (47). La **Met1153Ile** es va descriure en heterozigosi en una pacient obesa (**Met1153Ile** / WT) (91). Aquesta mutació es troba pròxima al clúster de fosforilació de tirosines (residus 1158, 1162 i 1163). El receptor Ile1153 no s'autofosforila i té inhibida l'activitat tirosina quinasa, per tant no pot fosforilar els seus substrats intracel·lulars. A més la mutació impedeix l'endocitosis del receptor, donant així un número normal de receptors a membrana, aquests receptors són resistents a la *down regulation* (134). L'**Arg1174Gln** es va descriure en heterozigosi en una pacient amb resistència a la insulina Tipus A (**Arg1174Gln** / WT) (90), així com també en un pacient amb una miopatia congènita (**Arg1174Gln** / G-A 5' intró17) (114). Aquesta mutació fa disminuir molt l'autofosforilació del receptor i fa que aquest sigui incapaç de mediar la síntesi de glicogen i la mitogènesi com a resposta a l'estimulació per la insulina, tot i que la fosforilació del substrat IRS-1 no està del tot inhibida. Això denota que l'IRS-1 sol no és capaç de mediar les funcions metabòliques i mitogèniques de la insulina (113,114,130). La **Pro1178Leu** ha estat descrita en heterozigosi en una dona obesa amb la síndrome de l'ovari poliquístic (**Pro1178Leu** / WT) (92) i també en una pacient amb resistència a la insulina Tipus A (**Pro1178Leu** / WT) (94,130). Aquesta mutació es troba en una seqüència molt conservada en moltes de les tirosines quinases (D¹¹⁵⁰-F¹¹⁵¹-G¹¹⁵²-----A¹¹⁷⁷-P¹¹⁷⁸-E¹¹⁷⁹). L'activitat tirosina quinasa i la capacitat de transmetre el senyal iniciat per la insulina es troba inhibida en aquest receptor. La **Trp1200Ser** es va descriure en heterozigosi en una pacient amb la síndrome de resistència a la insulina Tipus A (**Trp1200Ser** / WT) (131). Aquest mutant s'expressa i uneix la insulina normalment. L'autofosforilació del receptor mutat està fortament disminuïda així com també l'activitat tirosina quinasa i la capacitat de transmetre el senyal iniciat per la insulina.

Totes aquestes mutacions es troben en llocs considerats clau o no per l'activitat enzimàtica del receptor i provoquen el mateix tipus d'efecte; disminuir o anular aquesta activitat. Aquest és l'efecte que s'esperaria d'una mutació en aquesta regió, tot i que s'han trobat mutacions en aquesta regió que actuen de maneres diferents com la **Arg1092Trp**, descrita en heterozigosi en un pacient amb Leprechaunisme (**Arg1092Trp** / Glu1179Lys) que actua de forma totalment oposada ja que l'autofosforilació basal d'aquests receptors en fibroblasts del pacient era un 330% més elevat que en els controls, mentre que la resposta a l'estimulació per la insulina era pobre. L'activitat tirosina quinasa basal també estava incrementada respecte als receptors WT, tot i això la síntesi de glicogen i la síntesi d'ADN com a conseqüència de l'estimulació per la insulina estaven disminuïdes. Una explicació és que aquestes mutacions farien canviar la conformació de la subunitat de manera que el substrat es pot segrestar però no és fosforilat pel receptor. Per altra banda l'activació crònica dels receptors deu donar lloc a la desensibilització d'algun pas més intern en la senyalització de la insulina.

O bé com l'**Arg1000Aturada** que a conseqüència de la naturalesa de la pròpia mutació dona com a resultat una dràstica disminució de l'expressió de l'al·lel mutat i per tant una dràstica disminució de receptors expressats a membrana plasmàtica. Aquesta mutació s'ha descrit en tres pacients, dos d'ells cosins, afectes de la síndrome de Rabson-Mendenhall (**Arg1000Aturada** / Lys15) (83) (un d'ells descrit pel nostre grup, RM1) i en una pacient afecta de la síndrome de resistència a la insulina Tipus A (**Arg1000Aturada** / Arg993Gln) (103).

També s'ha descrit l'**Ala1135Glu** en heterozigosi en una pacient amb la síndrome de resistència a la insulina Tipus A (**Ala1135Glu** / WT) (132). Aquesta mutació impedeix el processament proteolític del proreceptor i per tant impedeix el transport a la membrana pel que en superfície hi ha un número de receptors disminuït. Tal i com fan les altres mutacions descrites en el domini tirosina quinasa, aquesta també inhibeix aquesta activitat.

Les següents mutacions es troben també en el domini tirosina quinasa i la principal afectació és l'expressió, la unió de la insulina, la degradació dels proreceptors o la interacció amb diferents substrats intracel·lulars. L'**Arg1174Trp** està descrita en heterozigosi en un pacient afecte de la síndrome de Leprechaunisme (**Arg1174Trp** / Cys274Tyr) (133). Aquest receptor mutat s'expressa menys que el receptor WT, uneix la insulina de forma equivalent als receptors WT, no és autofosforilat per l'estimulació de la insulina ni presenta activitat tirosina quinasa i és degradat més ràpidament. La **Glu1179Asp** es va descriure en heterozigosi en un pacient afecte de resistència a la

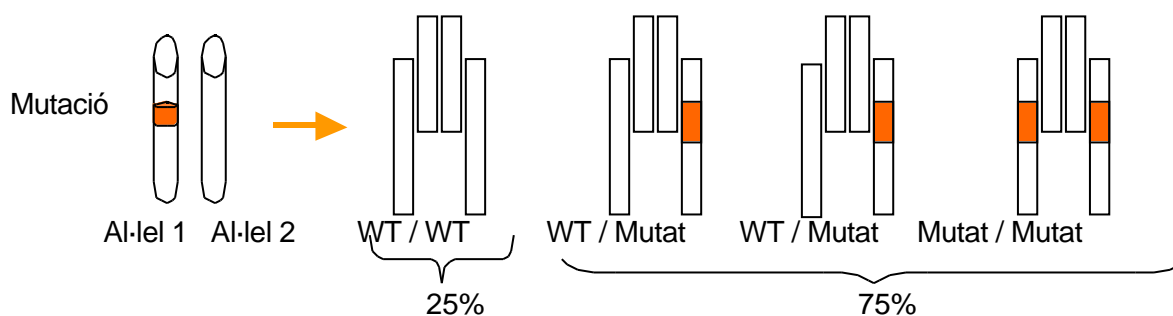
insulina Tipus A (**Glu1179Asp** / WT) (134). Aquesta mutació es troba en una seqüència molt conservada. La unió de la insulina està molt disminuïda així com també l'activitat tirosina quinasa. La degradació dels proreceptors mutats és dues vegades més ràpida que la dels proreceptors WT, mentre que a nivell de receptor es degraden a la mateixa velocitat. La **Trp1193Leu** es va descriure en heterozigosi en una pacient afectada de resistència a la insulina Tipus A (**Trp1193Leu** / WT) (134). L'efecte d'aquesta mutació sobre el funcionament del receptor és idèntica a la mutació Asp1179. La **Tyr1134Cys** va ser descrita en heterozigosi en un pacient amb Diabetis Mellitus Tipus 2 (**Tyr1134Cys** / WT) (135). Aquesta mutació impedeix la unió del receptor amb la PI3-quinasa. Estudis de lligament de la mutació amb la Diabetis Mellitus Tipus 2 van revelar que la mutació no cosegrega amb la malaltia.

Tal i com hem dit tot i que la majoria de mutacions descrites exerceixen la mateixa disfunció, també hem vist que n'hi ha d'altres que actuen de manera diferent. Aquest fet ens indica que els estudis funcionals són necessaris per determinar el tipus d'efecte que fan les mutacions en aquest domini. Aquest domini del receptor d'insulina ha pogut ser cristal·litzat (136) i per tant se'n coneix l'estructura. També s'ha cristal·litzat aquest domini activat (137) i per tant es pot veure quins canvis conformacionals es donen quan hi ha l'activació del receptor. Tot i que aquest fet permetria, mitjançant modelació per computació, conèixer quins canvis es donen en la conformació d'aquest domini, en relació a l'activació, quan es dona una mutació, el resultat de moment només seria un possible model que s'hauria de confirmar experimentalment.

La mutació Val1028 descrita en la pacient A3, és d'origen matern i la comparteix amb dos germans. Tant la mare com els germans no presenten intolerància a la glucosa, tot i que presenten uns nivells d'insulina basals lleugerament elevats (veure **taula 4**).

Tant aquesta pacient (A3) com la pacient A2 presenten un fenotip de resistència a la insulina molt sever, mentre que a nivell de genotip són igual que les seves mares que a efectes fenotípics són normals (únicament presenten uns nivells basals d'insulina lleugerament elevats). Aquesta situació no és nova, ja que en d'altres pacients resistents a la insulina i heterozigots per mutacions en el gen del receptor d'insulina, es dona la mateixa situació (veure **taula 3** on s'enumeren les mutacions descrites). S'han apuntat diferents hipòtesis per poder explicar aquest fet:

- ▶ la possibilitat de què es formessin híbrids entre els receptors WT i els mutats faria que el 75% dels receptors fossin anòmals (125,128). En molts casos aquests receptors mutats es comporten com a dominants negatius abolint l'expressió de l'al·lel normal.



- ▶ la possibilitat de que hi hagi d'altres factors (tant genètics com ambientals) que de manera directa o indirecta modifiquin la sensibilitat per la insulina (112).
- ▶ la possibilitat de que es doni una situació d'imprinting (22) i que per tant es doni una expressió diferent entre els progenitors i els fills.

La possibilitat de formació de receptors híbrids WT/Mutat no és del tot clara ja que mentre Taouis i cols. (37) van estudiar l'efecte de la mutació Leu323 en el receptor d'insulina mitjançant la cotransfecció de les cèl·lules NIH-3T3 amb dos ADNc diferents (el receptor mutat Leu323 i un receptor amb una deleció de 43 aminoàcids en l'extrem C-terminal) i van detectar la formació d'híbrids entre els dos tipus de receptors, Levy-Toledano i cols. (71) van investigar el mecanisme de l'efecte dominant negatiu de mutacions en el domini tirosina quinasa del receptor co-transfectant cèl·lules NIH-3T3 amb dos tipus d'ADNc (el receptor mutat Ile1153 i un receptor amb una deleció de 43 aminoàcids en l'extrem C-terminal) i el resultat va ser que no es va detectar cap receptor híbrid.

Aquests dos autors pertanyen al mateix grup, l'estudi és del mateix any, les cèl·lules emprades per la transfecció van ser les mateixes i el receptor amb la deleció va ser el mateix, per tant l'únic que varia és la mutació pròpia del receptor a estudiar (una en la subunitat i l'altra en la subunitat). Es coneix l'efecte dominant negatiu de les mutacions en heterozigosi en el domini tirosina quinasa, en canvi no és tan freqüent quan les mutacions són en la subunitat . En aquests estudis es detecten híbrids quan la mutació és a la subunitat , però no quan es troba en el domini tirosina quinasa, per tant semblaria que en aquesta situació el 50% dels receptors haurien de ser normals i l'altre 50% mutats, i que per tant l'efecte de la mutació afectaria al 50% de la funcionalitat dels receptors dels pacients. En canvi a nivell pràctic s'ha detectat que la funcionalitat dels receptors en els pacients heterozigots per mutacions en el domini tirosina quinasa és inferior a aquest 50%, mentre que en els progenitors que també són heterozigots per la mateixa mutació, l'efecte d'aquesta, la majoria de vegades, és imperceptible.

Així doncs és possible que hi hagi factors ambientals o d'altres factors genètics que afectin l'expressió d'aquests al·lels mutats de manera diferencial entre progenitors i progènie o fins i tot entre individus de la mateixa generació (ja que de vegades no es dóna el mateix efecte fenotípic entre germans que comparteixen el mateix genotip) (125,128,134).

Les funcions que es donen a través del receptor d'insulina un cop estimulat per la insulina són molt diverses (en temps i en activitat) i són molt necessàries per l'organisme. Aquest deu haver desenvolupat un sistema alternatiu per compensar la manca d'activitat del receptor d'insulina, si més no parcialment, a través d'altres receptors de la mateixa família com el receptor del factor de creixement semblant a la insulina (IGF-1IR), o a través de sistemes interns de transmissió del senyal iniciat per la insulina (proteïnes substrat intracel·lulars) que encara es desconeixen. D'alguna manera s'han de dur a terme aquestes funcions en els pacients o animals d'experimentació que no expressen el receptor d'insulina i que sobreviuen tot i tenir unes mancances metabòliques o mitogèniques importants (58,95,97,138).

Desenredar el complicat entramat que forma el receptor d'insulina amb els seus substrats intracel·lulars descobrint les relacions que hi estableix i determinar el grau d'associació amb d'altres receptors afins, és i serà sens dubte un gran repte pel coneixement del mecanisme d'acció de la insulina.

7.3.6.3.1.- ESTUDI DE L'EFECTE DOMINANT NEGATIU

En els experiments de cotransfecció de les cèl·lules CHO amb els receptors RI.Val1028 i RI.WT per tal de determinar la dominància es van obtenir uns resultats dispersos. En dos experiments es donava una dominància negativa del receptor RI.Val1028 sobre el RI.WT, de manera que es detectava l'expressió dels dos tipus de receptors (quan es trobaven cotransfectats), però no es detectava autofosforilació. En uns altres dos experiments es detectava expressió dels receptors coexpressats i l'autofosforilació d'aquests es detectava com una banda amb la meitat d'intensitat que la banda d'autofosforilació del receptor RI.WT, indicant que no hi havia dominància negativa (veure **figura 41**).

Aquesta situació de dominància negativa que s'expressa o no, podria representar el que es troba quan s'estudien famílies amb mutacions en heterozigosi en el domini tirosina quinasa. D'alguna manera hi deu haver algun factor que "regula" la formació d'heterodímers WT/Mutat, i l'expressió o no de l'efecte dominant negatiu de l'al·lel mutat.

Aquests experiments s'han dut a terme en les mateixes condicions i seguint el mateix protocol, per tant semblaria que aquests factors "reguladors" serien d'origen intracel·lular, tot i que les cèl·lules emprades per l'estudi també són les mateixes i es troben en les mateixes condicions.

Tot i que aquesta situació també es detecta *in vivo*, en aquests experiments els resultats es podrien veure afectats per la menor concentració d'ADN emprat en la situació d'heterozigosi (0,25µg vs. 0,5µg d'ADN que s'empra en les situacions d'homozigosi) al cotransfectar les cèl·lules, encara que es creu poc probable ja que no es detecten aquestes diferències en els assajos d'expressió.

7.4.- VARIANT VAL985MET

Es va detectar una alteració en l'exó 17 en un dels controls emprats en la tècnica de SSCP. La seqüenciació d'aquesta mostra va revelar que aquest control presentava la variant Val985Met en heterozigosi. Aquest control era una dona sana, no presentava hiperinsulinisme, no era diabètica ni tenia antecedents de diabetis a la família. Aquesta variació ja havia estat descrita anteriorment i no es va procedir a fer els estudis funcionals per determinar l'efecte sobre el receptor.

Al 1991 O'Rahilly i cols. (48) descriuen per primer cop aquest canvi. En un estudi amb 30 pacients amb Diabetis Mellitus no Dependent d'Insulina (Diabetis Tipus 2) i 13 individus controls normoglicèmics, detecten aquest canvi en heterozigosi en 1 individu de cada grup.

Aquests autors postulen que donat que aquesta variant es troba en el domini tirosina quinasa del receptor d'insulina i que aquest domini és molt conservat entre espècies, aquest és un domini funcionalment important. Dins d'aquest domini la posició 985 està sempre ocupada per una Val, fins i tot en receptors relacionats amb el de la família del receptor d'insulina com són el receptor insulin like growth factor I (IGF-I), i el receptor insulin-receptor-related. Proposen que tot i que el canvi Val Met és un canvi bastant conservatiu (tots dos són aminoàcids alifàtics, no polars i hidrofòbics amb la diferència que la Met conté sofre i té un pes molecular lleugerament més gran), pot provocar canvis en l'estructura secundària i per tant canvis en l'activitat biològica del receptor.

El grup de Elbein i cols. també descriu aquesta variant en un pedigree amb antecedents familiars de Diabetis Mellitus Tipus 2 (85). Troba aquesta variant en heterozigosi en individus de tres generacions del mateix pedigree, encara que la presència de la variant en aquests individus no està lligada al 100% amb la Diabetis Tipus 2. Per tant la variant sembla tenir una baixa penetrància respecte a la diabetis, ja que només un 37,5% dels portadors expressaven el fenotip Diabetis Tipus 2. De tota manera els individus portadors demostraven una relativa hiperglicèmia comparada amb els no portadors, per tant aquests autors van considerar que el canvi Val985Met pot modificar la predisposició genètica per la Diabetis Tipus 2, encara que la baixa penetrància els suggeria que també deuen ser necessaris d'altres factors per l'expressió del fenotip diabètic ja que és una patologia d'etiologia multifactorial. Aquests autors també refereixen uns resultats no publicats del Dr. D. Moller els quals revelen que aquest canvi no té efectes sobre el l'activitat i funcionalitat del receptor d'insulina (RI.Met985) quan aquest és expressat *in vitro*.

't Hart i cols. al 1996 (86) en un extens estudi basat en la població de Rotterdam on estudien 161 individus amb Diabetis Tipus 2 i 538 individus control sans, detecten la variant val985Met en heterozigosi, en 9 individus del grup amb Diabetis Tipus 2 (5,6%), mentre que en el grup control troben 7 heterozigots per aquesta variant (1,3%). Les característiques clíniques de la població total estudiada indica que tant els nivells de glucosa en sèrum com la prevalència de diabetis mellitus són significativament més alts en el grup Met985. Estimen que el risc relatiu de presentar diabetis amb el genotip Met985 és del 4,49%. 't Hart i cols. conclouen que hi ha una associació entre la variant Met985, la hiperglicèmia i la Diabetis Tipus 2 en la població holandesa tot i que no estableixen el mecanisme pel qual es dona aquesta associació.

El grup de Strack i cols. (87) mitjançant estudis d'expressió del receptor Met985 en cèl·lules HEK293 detecten que aquest receptor portador de la variant s'autofosforila igual que el receptor WT, i tampoc detecten diferències entre els dos tipus de receptor en quant la sensibilitat a la insulina. Donat que la posició 985 és dins la regió jxtamembrana i molt pròxima a la Tyr972, que és el punt d'ancoratge dels substrats intracel·lulars com els IRS, sembla possible que aquesta alteració pugui afectar o modular la interacció del receptor amb els seus substrats. Per tal de comprovar això Strack i cols. van fer estudis de cotransfecció del receptor RI.Met985 amb els substrats IRS-1 i Shc. El resultat va ser que es va detectar fosforilació tant de l'IRS-1 com del Shc, igual i fins i tot una fosforilació lleugerament incrementada. També van estudiar la fosforilació de la PI3-quinasa sense detectar diferències amb el RI.WT. Després dels resultats obtinguts, aquest grup conclou que aquesta variant no modifica ni l'autofosforilació del propi receptor, ni tampoc els passos inicials de transmissió del

senyal, per tant creuen molt improbable que aquesta variant causi resistència a la insulina. No descarten, però la possibilitat que es doni algun tipus de modificació de la interacció amb els substrats IRS-1 i Shc donat l'increment de fosforilació detectat.

El subjecte a qui s'ha detectat la variació Val985Met en el present estudi és un control sa i sense història de resistència a la insulina ni diabetis, tot i que no s'han efectuat els estudis funcionals pertinents per determinar l'efecte d'aquesta sobre el funcionament del receptor, el fenotip del control no dona cap indicatiu que aquesta variació estigui associada a cap anomalia, per tant estaria d'acord amb els estudis citats mes amunt on conclouen que aquesta variació no és responsable ni està associada a resistència a la insulina ni a hipertensió.

7.5.- MECANISME D'ACCIÓ DE LA METFORMINA. EFECTE SOBRE ELS RECEPTORS RI.WT I RI.VAL1028

La Metformina ha estat àmpliament utilitzada amb èxit en el tractament de pacients amb Diabetis Mellitus Tipus 2 (139) i en pacients amb la síndrome de l'ovari poliquístic (140-143) com a antidiabètic oral i per disminuir l'hiperinsulinisme (144). També s'ha descrit algun cas en el que aquest compost no ha ajudat a millorar la resistència a la insulina (145).

La pacient A3 d'aquest treball presentava un hiperinsulinisme molt sever (veure **taula 4**) degut a la presència d'una mutació en heterozigosi en el gen del receptor d'insulina. Aquesta pacient no presentava Diabetis Mellitus Tipus 2, ni obesitat però presentava hiperandrogenisme funcional ovàric amb hiperinsulinisme i es va tractar amb Metformina (el primer cas d'una pacient afectada d'una síndrome genètica de resistència a la insulina segons el nostre coneixement). El resultat va ser gairebé espectacular amb una reducció de l'hiperinsulinisme i de l'hiperandrogenisme molt important i amb l'aparició de la menarquia per primer cop (Article 2).

El mecanisme mitjançant el qual actua la Metformina no és del tot clar (82). La Metformina incrementa la unió de la insulina als seus receptors, la fosforilació i l'activitat tirosina quinasa *in vivo*, però aquestes accions deuen ser degudes a la reducció de la glucosa en plasma ja que no s'han pogut reproduir *in vitro* (139).

El resultat obtingut de l'estudi efectuat amb els receptors RI.WT, RI.Val/1028 i el seu homòleg heterozigot RI.WT/Val1028 (representa la zigosi de la pacient A3) en les cèl·lules CHO, indiquen que la Metformina no afecta a l'expressió del receptor d'insulina, per tant no modifica el nombre de receptors que es troben a la membrana cel·lular i que lligaran la insulina.

Els assajos d'unió denoten que la Metformina per ella sola no incrementa la unió de la insulina, aquest resultat concorda amb els obtinguts per d'altres autors (146-149). Es detecta un augment de la unió al incubar les cèl·lules amb insulina i amb insulina+Metformina sense notar-se cap diferència entre aquestes dues condicions, pel que es creu que l'augment és més degut a l'efecte de la insulina que de la Metformina. Per tant la Metformina actuaria a través d'un mecanisme post-unió de la insulina tal i com s'ha suggerit en d'altres treballs (75). Per tant a nivell intracel·lular hauria d'actuar sobre la fosforilació o sobre l'activitat tirosina quinasa. Segons els resultats obtinguts en aquests treball la Metformina incrementa la fosforilació dels receptors RI.WT sempre i quan hi hagi hagut estimulació amb insulina, mentre que no es dona aquest efecte en els receptors RI.WT/Val1028.

No es té clar el perquè es dona aquest efecte. Pot ser que hi hagi un efecte dominant negatiu dels receptors RI.Val1028 sobre els RI.WT i bloquegi l'efecte de la Metformina.

L'increment de fosforilació dels receptors mitjançant l'estimulació amb Metformina possiblement dona lloc a un increment de fosforilació dels substrats interns. Un increment en la fosforilació del substrat IRS-1 ha estat descrit en rates resistents a la insulina i tractades amb Metformina (150). Aquest fet no és estrany, ja que l'IRS-1 és el primer substrat del receptor d'insulina i per tant un cop fosforilat pel receptor activa les diferents vies bioquímiques que donaran lloc a les diferents accions de la insulina (transport de glucosa, síntesi de glicogen, metabolisme lipídic, mitogènesi).

L'activitat enzimàtica tirosina quinasa dels receptors tant RI.WT com RI.WT/Val1028 es detecta únicament si hi ha estimulació per la insulina. La Metformina sola no activa aquest enzim. La incubació de les cèl·lules amb insulina+Metformina dona un increment d'aquesta activitat tant en els receptors

RI.WT, com en els RI.WT/Val1028. Aquests últims en aquestes condicions presenten una activitat equivalent a la dels RI.WT quan han estat estimulats únicament amb insulina. Podríem dir que "recuperen" l'activitat normal. Aquest fet és força sorprenent si es té en compte la dada de fosforilació, ja que sembla que l'activació de la quinasa del receptor en presència de la Metformina, no depèn directament del grau de fosforilació del receptor.

Encara que aquests són estudis preliminars i tenint en compte que són necessaris més assajos per determinar-ne la fiabilitat, es pot concloure que la Metformina requereix de la insulina per actuar. Que la seva acció és a través de la quinasa del receptor, i que aquesta quinasa ha de ser funcional, ja que en cap moment l'estimulació amb Metformina ha modificat el comportament dels receptors quinasa defectius RI.Val1028. Per tant això sembla suggerir que la Metformina potencia l'acció de la insulina.

Per tant podem dir que l'efecte de la Metformina en la pacient tractada en aquest treball (A3, WT/ Va1028) ha estat a través dels receptors WT. Podríem dir que en condicions normals aquest tipus de receptor, en aquesta pacient, es trobarien sota l'efecte dominant negatiu de l'al·lel mutat Val1028 (ja que el quadre de resistència a la insulina que presenta és molt sever), i que el tractament amb la Metformina d'alguna manera anul·laria aquest efecte "reactivant" l'activitat dels receptors WT.

8.- CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1 Les tècniques moleculars i bioquímiques emprades en aquest treball són útils per caracteritzar el receptor d'insulina a nivell genètic i funcional.
- 2 S'ha confirmat el diagnòstic clínic dels pacients amb les síndromes genètiques de resistència a la insulina Rabson-Mendenhall i de Resistència a la Insulina Tipus A estudiats en aquest treball, mitjançant la detecció de noves mutacions en el gen del receptor d'insulina.
- 3 La resistència a la insulina que pateixen els pacients amb obesitat, lipodistròfia i resistència idiopàtica a la insulina estudiats en aquest treball, no és deguda a mutacions en el gen del receptor d'insulina.
- 4 Les mutacions que s'han descrit en el gen del receptor d'insulina en els diferents pacients objecte d'estudi d'aquest treball, són responsables de l'alteració del funcionament dels receptors portadors de les mateixes i per tant de la severa resistència a la insulina que pateixen els pacients.
 - 4.1 Els receptors amb la mutació Leu140 s'expressen menys que els receptors WT, uneix la insulina amb un percentatge menor que els WT i amb una afinitat lleugerament disminuïda.
 - 4.2 La mutació d'splicing-1239A turada afecta al processament post-transcripcional, impedeix l'autofosforilació i aboleix l'activitat enzimàtica tirosina quinasa del receptor.
 - 4.3 La mutació Val1028 impedeix l'autofosforilació del receptor i aboleix la seva activitat enzimàtica tirosina quinasa.

- 5 L'efecte de les mutacions descrites sobre l'estructura/funció del receptor són les següents:
 - 5.1 La posició Val140 en l'exó 2 (aa 7-191) del receptor, tot i no pertànyer al domini L1 (aminoàcids 1-119) on es troben dues regions relacionades directament amb la unió de la insulina (aminoàcids 1-68 i 83-95), està d'alguna manera implicada en la unió ja que la substitució de la Val per una Leu afecta a aquesta unió i a l'afinitat.
 - 5.2 Els receptors amb la mutació splicing-1239Aturada tenen deletat el domini COOH-terminal i no presenten activitat. El domini COOH-terminal del receptor és imprescindible per l'activitat de la subunitat del receptor que és regulada per la interacció d'aquest domini amb els loops d'unió de l'ATP, activador i/o catalític.
 - 5.3 La posició Ala1028 es troba dins de la seqüència consens per la unió de l'ATP (aa 1003-1030) i tot i que no és un dels aminoàcids conservats, la substitució de l'Ala per una Val (ambdós hidrofòbies neutres) modifica de manera dràstica la conformació d'aquest domini implicant l'autofosforilació del receptor.
- 6 La Metformina no modifica l'expressió del receptor ni la unió de la insulina. La Metformina requereix de la insulina per actuar i el seu mode d'acció seria a través de l'estimulació de la quinasa del receptor per fosforilar substrats interns (IRS-1/2) potenciant l'acció de la insulina, sempre i quan la quinasa del receptor sigui funcional.
- 7 Els receptors d'insulina mutats que es troben en pacients afectes de resistència a la insulina, són un bon model per estudiar i comprendre l'estructura del receptor i el mecanisme d'acció de la insulina.

9.- ARTICLES

Clin Genet 2000; 57: 67–69
 Printed in Ireland. All rights reserved

Copyright © Munksgaard 2000
 CLINICAL GENETICS
 ISSN 0009-9122

Short Report

Identification of three novel mutations in the insulin receptor gene in type A insulin resistant patients

Riqué S, Nogués C, Ibáñez L, Marcos MV, Ferragut J, Carrascosa A, Potau N. Identification of three novel mutations in the insulin receptor gene in type A insulin resistant patients. *Clin Genet* 2000; 57: 67–69. © Munksgaard, 2000

Type A insulin resistance syndrome is characterized by the association of ovarian hyperandrogenism, acanthosis nigricans, and severe insulin resistance. We have identified three novel mutant alleles of the insulin receptor gene in 3 patients with type A syndrome, a severe form of insulin resistance. Two of the patients were sisters (A1, A2), 1 of them was a compound heterozygote for a mutation at the 3'-splice acceptor site of intron 21 (AG → AA), and a missense mutation Val140Leu in exon 2. Her sister was a simple heterozygote for the 3'-splice acceptor mutation. The third patient (A3) was heterozygous for the missense mutation Ala1028Val in exon 17, in the consensus sequence for ATP binding.

Susanna Riqué^a,
 Carme Nogués^b,
 Lourdes Ibáñez^c,
 María Victoria Marcos^d,
 Juan Ferragut^e,
 Antonio Carrascosa^f and
 Neus Potau^g

^aLaboratori Hormonal, Hospital Universitari Materno-Infantil Vall d'Hebron, Barcelona, ^bDept. Biologia Cel·lular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, ^cHospital Universitari Sant Joan de Déu, Barcelona, ^dConsorci Hospitalari de Terrassa, Terrassa, ^eHospital Son Dureta, Mallorca, Spain

Key words: insulin receptor gene – insulin resistance – missense mutation – splice mutation – type A syndrome

Corresponding author: S. Riqué, Laboratori Hormonal, Plaça Soterrani, Hospital Universitari Materno-Infantil Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-125, 08035 Barcelona, Spain. Fax: +34 93 2746837; e-mail: susanna@latinmail.com

Received 12 July 1999, revised and accepted for publication 16 September 1999

To date, unequivocal evidence for genetic lesions underlying severe insulin resistance in humans remains confined to those in the insulin receptor (INSR) gene. Type A insulin resistance was initially characterized in young female patients with acanthosis nigricans, ovarian hyperandrogenism, and virilization (1). Over 30 mutations have been described in these patients, which are clustered in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. Other patients demonstrate no mutations in the INSR gene implying the presence of other critical primary defects in insulin signaling (2). In this study, we have characterized the INSR gene in 3 girls with type A insulin resistance syndrome from two unrelated Spanish families.

Subjects and methods

Patient A1 presented at the age of 14 years with acne, acanthosis nigricans, hyperandrogenism, and hyperinsulinism, suggestive of type A insulin resistance. Patient A2, the sister of patient A1, presented at the age of 13 years with the same clinical and biochemical phenotype. Their parents were not consanguineous, and they showed high serum insulin levels (123.50 µU/ml father, 213 µU/ml mother) with normal basal glucose levels.

Patient A3 was a 15-year-old girl who presented with primary amenorrhea, acanthosis nigricans, and high serum insulin levels with severe hyperandrogenism. She was the third child of unrelated parents. Two brothers and her mother presented

Riqué et al.

Table 1. Biochemical features and insulin receptor genotype of probands

Patient	Age (years)	Fasting serum glucose (75-115 mg/dl)	Fasting serum insulin (5-20 µU/ml)	C-peptide (0.8-4.0 ng/ml)	Oral glucose tolerance test (OGTT)	Androstenedione (125.7 ± 49.8 ng/dl)	Testosterone (20-60 ng/dl)	Genotype paternal/maternal allele
A1	16	65.00	123.1+	11.5+	Normal	320.00+	128.00+	Leu140
A2	15	78.00	186.7+	12.9+	Normal	180.00	90.00+	wt
A3	14	101.00	334.20+	14.60+	Normal	468.70+	172.80+	wt

Values corrected for age and sex. Normal ranges for each of the hormonal values are displayed in brackets.
+ increased values.

with high serum insulin levels. The father was not available at the time of this study.

Genomic DNA of the patients and their family members was extracted from peripheral blood samples as described (3). Exons 1-22 of the insulin receptor gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) according to Seino et al. (4), and were analyzed by agarose gel electrophoresis to confirm the integrity of PCR products. After single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as described by Teschauer et al. (5), PCR products were purified for direct sequence analysis on a Perkin-Elmer 3.10 DNA sequencer according to the manufacturer's instructions.

Results

The biochemical characteristics and the insulin receptor genotype of the patients are depicted in Table 1. SSCP analysis revealed different conformation patterns in the PCR products of exons 2 and 22 in patient A1, of exon 22 in patient A2, and of exon 17 in patient A3. Sequence analysis in A1 revealed an alteration in exon 2 resulting in a Val140 to Leu substitution (GTG-TTG). A mutation in the second nucleotide of the consensus sequence of the splice acceptor site in intron 21 (AG→AA) was also evident. A2 only presented with the splice mutation. Sequence analysis of exon 17 of patient A3 showed GCG→GTG substitution predicting a Ala1028Val residual change (Fig. 1), in the consensus sequence for ATP binding. Screening of family members revealed a paternal inheritance for Leu140, and a maternal inheritance for the splice mutation and Val1028. Two brothers of patient A3 were found to be carriers of the Val1028 mutation while the sister had neither mutation.

Discussion

Mutations in consensus splice sequences of introns are known to result in aberrant splicing. Such mutations cause exon skipping, activation of cryptic sites, creation of a pseudoexon within an intron, and intron retention to redefine exon-intron structures. In any of these situations, conformation of the A1/A2 mutant COOH-terminal receptor would be modified. Studies of COOH-terminal truncated receptors indicate that the function of such receptors depends on the specific amino acids deleted and also proves that receptors contain domains that function to enhance or impair the actions of other regions within the same receptor structure (6).

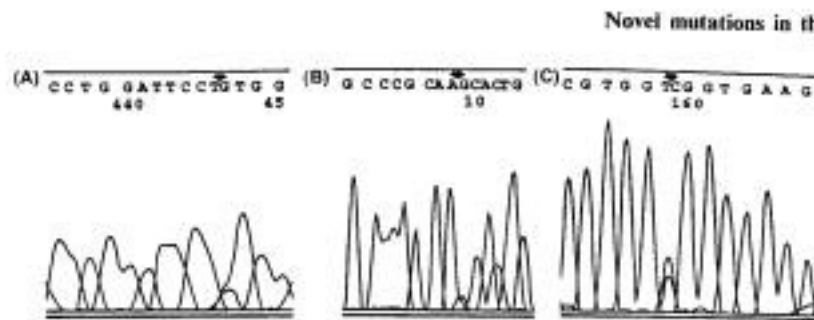


Fig. 1. Partial nucleotide sequence of the three patients insulin receptor DNA containing the three novel mutations described. A) At the first position of codon 140 there is a G \rightarrow T substitution in one of the alleles that results in the missense mutation Val140 (GTG) \rightarrow Leu (TTG) in heterozygous state. B) A G by A substitution in one allele in a splicing consensus sequence results in an heterozygous splice mutation. C) A C by T substitution in the second nucleotide of codon 1028 results in the missense mutation Ala1028 (GCG) \rightarrow Val (GTG) in one allele (according to the numbering system of Ebina et al. (9)).

The novel mutation Val140Leu is localized in a highly conserved region among the members of the insulin/IGF-I receptor family. Several other missense mutations have been described in this region (2) and are crucial for the correct folding and function of the protein. In general, these mutations impair transport of receptors to the cell surface and decrease affinity for insulin.

The Ala1028Val mutation is located in the β -subunit of the insulin receptor, in the consensus sequence for ATP binding (aa 1003–1030), in the tyrosine kinase domain, and in a highly conserved position among the species. This suggests that this mutation may impair the tyrosine kinase enzymatic activity of the receptor, rendering the receptor unable to transmit the insulin signal through the cytoplasmic messengers (7). Patients A2 and A3 had the same insulin receptor genotype as their mothers who were not insulin resistant. This suggests that other factors (either genetic or environmental) may contribute to the pathogenesis of insulin resistance in such patients (8). It is unlikely that these changes represent polymorphisms as they were not seen in over 100 normal chromosomes.

In conclusion, we have described three novel mutant alleles in human INSR gene: Leu140, splice acceptor of intron 21 (AA), and Val1028. These mutations are associated with high insulin levels in these families. Further functional studies of these mutations in transfected cells will clarify their role in the insulin receptor signal transduction process.

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Dr Maria Martell for helping us in sequencing and to Dr Jonathan P.

Whitehead for reviewing the manuscript. This work was supported by a grant from the Fundació per a la Recerca i la Docència de la Ciutat Sanitària i Universitària de la Vall d'Hebron.

References

1. Tritos NA, Mantzoros CS. Syndromes of severe insulin resistance. *J Clin Endocr Metab* 1998; 83: 3025–3030.
2. Krook A, O'Rahilly S. Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance. *Baillière's Clin Endocrinol Metab* 1996; 10: 97–122.
3. Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, vol. 2. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 9.17–9.19.
4. Seino S, Seino M, Bell GI. Human insulin-receptor gene. *Diabetes* 1990; 39: 123–128.
5. Teschauer W, Mussack T, Braun A, Waldner H, Fink E. Conditions for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis with broad applicability: a study on the effects of acrylamide, buffer and glycerol concentrations in SSCP analysis of exons of the p53 gene. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 125–131.
6. Maegawa H, McClain DA, Freidenberg G et al. Properties of a human insulin receptor with a COOH-terminal truncation. *J Biol Chem* 1988; 263: 8912–8917.
7. Haruta T, Takata Y, Iwanishi M et al. Ala1048 \rightarrow Asp mutation in the kinase domain of insulin receptor causes defective kinase activity and insulin resistance. *Diabetes* 1993; 42: 1837–1844.
8. Magré J, Karayanni C, Hadjathanasiou CG et al. Dominant transmission of insulin resistance in a type A family resulting from a heterozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene and associated with decreased mRNA level and insulin binding sites. *Diabetes* 1997; 46: 1901–1903.
9. Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K et al. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 1985; 40: 747–758.

Letters to the editor

385

- repeat in the frataxin gene are not associated with type 2 diabetes or altered glucose induced β -cell function in Danish caucasians. *Diabetes* 48: 914-917
6. Hart LM, Ruige JB, Dekker JM, Stehouwer CDA, Maassen JA, Heine RJ (1999) Altered β -cell characteristics in impaired glucose tolerant carriers of a GAA trinucleotide repeat polymorphism in the frataxin gene. *Diabetes* 48: 924-926

7. Huxtable SJ, Saker PJ, Haddad L et al. Analysis of parent-offspring trios provides evidence for linkage and association between the insulin gene and type 2 diabetes mediated exclusively through paternally-transmitted class III VNTR alleles. *Diabetes* (in press)
8. Pianese L, Cavalcanti F, de Michele G et al. (1997) The effect of parental gender on the GAA dynamic mutation in the FRDA gene. *Am J Hum Genet* 60: 460-463

Effects of metformin on androgens and insulin concentrations in type A insulin resistance syndrome

Dear Sir,

Insulin receptor gene mutations have been described in type A insulin resistance syndrome, characterized by hyperinsulinaemia, acanthosis nigricans and hyperandrogenism [1].

Non-obese women with polycystic ovary syndrome, a form of functional ovarian hyperandrogenism have an intrinsic form of insulin resistance that is unique to the disorder [2]. Treatment with insulin-sensitizing agents, such as metformin, has been shown to reduce insulin resistance, to statistically significantly decrease androgen concentrations and to initiate menstrual cyclicity in these patients [3]. These effects are consistent with the hypothesis that hyperinsulinaemia and insulin resistance have an aetiological role in hyperandrogenism through stimulation of ovarian and adrenal steroidogenesis.

We report the results of a 10-month treatment with metformin (850 mg twice daily) in a lean (body mass index, 20 Kg/m²), girl aged 13 years 6 months with severe hirsutism, acne, clitoral hypertrophy, acanthosis nigricans and primary amenorrhea. Basal hormonal assessment showed high total serum testosterone, 17-hydroxyprogesterone, androstenedione, immunoreactive insulin concentrations and decreased sex hormone-binding globulin concentrations. A tumoral origin of the hyperandrogenism was ruled out by appropriate imaging studies. Short-term leuprolide acetate stimulation (Procrin, Abbott, Madrid, Spain, 500 μ g, s.c), elicited an increase in ovarian 17-hydroxyprogesterone concentrations (30.6 nmol/l) suggestive of functional ovarian hyperandrogenism. A standard oral glucose tolerance test produced insulin peaks of more than 3587 pmol/l at all time points, with normal glucose tolerance.

Molecular analysis of the insulin receptor gene showed a heterozygous novel missense mutation in exon 17 of the insulin receptor gene (Ala1028 \rightarrow Val) abolishing autophosphorylation of the insulin receptor β -subunit.

Basal androgens and fasting insulin concentrations decreased significantly during treatment whereas sex hormone-binding globulin concentrations increased (Table 1). Breast development progressed and menarche occurred in the fifth month of therapy. No side-effects were documented.

Metformin is a biguanide hypoglycaemic agent that increases peripheral utilization of glucose, acting in the early steps of insulin signal transduction through potentiating phosphatidylinositol-3' kinase pathway of insulin receptors [4] and decreasing ovarian and adrenal cytochrome P450c17 activity [3]. Prolonged treatment with metformin has been proved to be safe in Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and in a pregnant hyperandrogenic woman [5]. Metformin, troglitazone (a thiazolidinedione derivative) and the D-chiro-inositol-containing phosphoglycan mediator of the action of insulin, reduce hyperinsulinism and hyperandrogenism in women with functional ovarian hyperandrogenism. The new agent L-783,281, recently identified as a non-peptidyl fungal metabolite, seems to act by stimulating tyrosine kinase activity of insulin receptors [7]. Although this drug might have beneficial effects in insulin resistance states due to insulin receptor mutations in the α -subunit, it might be ineffective in tyrosin kinase domain mutations of the insulin receptor in which this activity is abolished.

Our results show the usefulness and safety of metformin therapy in an adolescent with type A insulin resistance syndrome associated with severe hyperandrogenism.

Yours sincerely,

S. Rique, L. Ibáñez, M. V. Marcos, A. Carrascosa, N. Potau

Table 1. Clinical data, androgen and sex hormone-binding globulin concentrations and fasting glucose and insulin concentrations before and after 5 and 10 months of metformin treatment (850 mg twice daily)

	Tanner breast stage	hirsutism score ^a	TT nmol/l	SHBG nmol/l	FAI	17-OHP mmol/l	Δ^4 -A nmol/l	glucose mmol/l	insulin pmol/l
Baseline	II	20	8.3	31.2	13.5	10.5	12.0	4.9	1127.9
5 months	III	17	2.1	48.6	6.4	1.9	10.9	4.2	581.8
10 months	V	10	1.7	48.6	4.3	1.9	10.8	4.3	332.2

^a Ferriman and Gallwey score (normal \leq 8); TT, total testosterone; SHBG, sex hormone-binding globulin; FAI, free androgen index (equivalent to free testosterone; normal \leq 5); 17-OHP, 17-hydroxyprogesterone; Δ^4 -A, androstenedione.

Normal values for age-matched control girls (mean \pm SD; n = 40): TT, 0.7 \pm 0.3 nmol/l; SHBG, 59.0 \pm 6.9 nmol/l; 17-OHP, 1.8 \pm 0.01 nmol/l; Δ^4 -A, 4.4 \pm 1.7 nmol/l; insulin, 35.9-107.6 pmol/l

Corresponding author: N. Potau MD, Hormonal Laboratory, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, E-08035 Barcelona, Spain

References

1. Tritos NA, Mantzoros CS (1998) Syndromes of severe insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3025-3030
2. Dunaif A (1997) Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrinol Rev* 18: 774-800
3. Nestler JE, Jakubowicz DJ (1996) Decreases in ovarian cytochrome P450c17 activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 335: 617-634
4. Grigorescu F, Pouchet P, Bouix O et al. (1998) Metformin potentiates phosphatidylinositol-3' kinase by IRS-2 recruitment in rat hepatic tissue. *Diabetologia* 41 [Suppl 1] 189A (Abstract)
5. Sarles NJ, Weil SJ, Nelson LM (1999) Administration of metformin to a diabetic woman with extreme hyperandrogenemia of nontumoral origin: management of infertility and prevention of inadvertent masculinization of a female fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1510-1512
6. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Reamer P, Gunn RD, Allan GA (1999) Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 340: 1314-1320
7. Zhang B, Salituro G, Szalkowski D et al. (1999) Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science* 284: 974-977

Measurement of T-cell autoreactivity in autoimmune diabetes

Dear Sir,

We sincerely applaud the organisers of the IDS-sponsored, first international T-cell workshop, who undertook and completed a very difficult task [1]. The purpose of this first T-cell workshop and its less ambitious successors, is to develop robust techniques for the measurement of T-cell autoimmunity in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus-prone subjects [2]. This would provide new mechanistic insight, improve staging of prediabetes and, eventually, allow us to measure the effectiveness of intervention therapies well before onset of overt disease.

In this search for better procedure and technology, we all are still beginners. It took well over a decade to refine diabetes autoimmune serology to its present, quite reliable status. Autoantibodies could, however, be rather late markers of progressive autoimmunity, and the efforts to measure autoreactive T-cells in a disease principally mediated by T-cells are rational and important.

In the first workshop, 29 laboratories tested 24 diabetes-relevant antigens. It was probable that not all these antigens would be recognised equally by the diverse study cohorts of patients, relatives and unrelated control subjects, hence the variety of test antigens. One initial goal was to find, in a blinded protocol, culture conditions that allowed a distinction between control subjects and patients (and perhaps relatives), with a reasonable subset of antigens.

The data eventually generated were analysed with care. The results of this analysis were disappointing. Data analysis is, however, always influenced by certain basic assumptions and is often open to interpretations. When we received the workshop data, we concluded that, rather than none [1, 2], there were five laboratories (numbers 3, 8, 10, 15, 23) which could detect disease-associated T-cell responses to four to seven of the test antigens.

Some of these responses would have been excluded by the workshop data analysis team, due to their choice of a hard cut-off for positive responses. In our hands, the mean stimulation index of ovalbumin stimulated cells plus four standard deviations produced a cut-off for positive responses that distinguished positive patient from negative control subject responses to over ten 'diabetes antigens' in blinded studies of several hundred patients, relatives and healthy controls [3].

The Toronto-Pittsburgh collaborative team supplied two sets of T-cell response data to the workshop: those with and those without a small interleukin 2 (IL2) supplement. By the time of the T-cell workshop, we had garnered evidence, that abnormal T-cell anergy was common in diabetic patients and that T-cell responses were small but could be rescued by exogenous IL2 in our serum-free cultures [4]. This has since been substantiated [3, 5].

Data from IL2-supplemented cultures were not evaluated by the workshop committee, because of confidentiality rules: IL2 supplements would have identified our laboratory. We acknowledge this rationale but as we all are still searching for basic assay alternatives, we here provide the data set from IL2-supplemented cultures, blindly submitted to the workshop years ago.

Figure 1 shows the proportions of positive responses elicited by the test antigens. Incorporation of H³-thymidine in ovalbumin-stimulated and non-stimulated cultures was not statistically different (*p* values > 0.6). In this small data set IA2, ICA69 and some GAD65 preparations were most frequently targeted by diabetic autoimmunity.

Children with recent onset Type 1 diabetes (*n* = 10) generated 47 positive responses to the test antigens (not counting tetanus toxoid, TT). 16 were observed in the first-degree relative's (FDR) group (*n* = 3) and 3 were generated by the seven healthy control subjects (Fig. 1 insert). The distinction of patients and healthy control subjects was significant (*p* < 0.0001, relative risk 10.97 [95% CI 3.5-34.6]). Of the three first-degree relatives tested, two had responses to many of the test antigens, one did not, the former two are prospectively followed as part of a high risk relative's cohort [6]. Several workshop laboratories used first-degree relatives in their control group. Because relatives often show signs of diabetic autoimmunity, this could have contributed to a lack of distinction between patients and control subjects.

Serum-free culture systems with small IL2 supplements may be promising techniques for the detection of disease-associated T-cell autoreactivities in autoimmune diabetes. In our hands, T-cell autoreactivity without IL2 supplements is too variable for analysis. Other laboratories which use serum supplemented culture systems seem, however, to bypass some or much of the IL2 requirement, perhaps through cytokine release from bystander T-cells (e.g. [7, 8]).

Sincerely Yours,
H.-M. Dosch, D.J. Becker

Corresponding author: H.-M. Dosch, MD, Department of Paediatrics, IIR Program, The Hospital For Sick Children, 555 University Ave., Toronto, Ont., Canada, M5G 1X8

10.- ÍNDEX D'ABREVIATURES

ÍNDEX D'ABREVIATURES

A

ADN: Àcid desoxiribonuclèic.

A: Adenina.

A1/2/3: Pacients amb la síndrome de Resistència a la insulina Tipus A.

aa: aminoàcids.

ADNc: Àcid desoxiribonuclèic complementari.

ADNdc: Àcid desoxiribonuclèic de doble cadena.

Ala: Alanina.

AMPc: Adenina monofosforilada cíclica.

Ampr: Gen de resistència a l'Ampicilina.

APS: Persulfat amònic.

Arg: Arginina.

ARN: Àcid ribonucleic.

ARNm: Àcid ribonuclèic missatger.

Asn: Asparragina.

Asp: Àcid aspàrtic.

ATP: Adenina trifosfat.

B

Bad: Proteïna que està relacionada en processos d'apoptosis. També controla l'activitat de la quinasa mTOR.

C

C: Citosina.

C/EBP: Enhancer binding protein. Potenciador de la unió de proteïnes.

c-Fos: Factor de transcripció.

CHO: Cèl·lules d'ovari de hámster.

CHO-IR.Val1028: Cèl·lules d'ovari de hámster transfectades amb el receptor d'insulina amb la mutació Val1028.

CHO-IR.WT: Cèl·lules d'ovari de hámster transfectades amb el receptor d'insulina normal.

CHO-RI.WT/Val1028: Cèl·lules d'ovari de hámster transfectades amb els receptors d'insulina normals i amb els portadors de la mutació Val1028.

CL6: Cèl·lules d'ovari de hámster que expressen de manera estable el receptor d'insulina humana.

C-Myc: Factor de transcripció.

CRE: Element que respon a l'AMPc.

CREB: Proteïnes que s'uneixen a l'element que respon a l'AMPc.

Cys: Cisteïna.

D

D: Àcid aspàrtic segons la nomenclatura aminoacídica d'una sola lletra.

DMSO: Dimetil sulfòxid.

E

E: Àcid glutàmic segons el codi aminoacídic d'una sola lletra.

EGF: Epidermal Growth Factor. Factor de creixement epidèrmic.

Elk 1: Factor de transcripció.

F

F: Fenilalanina segons el codi aminoacídic d'una sola lletra.

FYF: Fenilalanina Tirosina Fenilalanina. Abreviació de la seqüència aminoacídica del pèptid substrat sintètic emprat pels assajos de l'activitat tirosina quinasa.

FSIVGTT: Mostrejat freqüent en un test de tolerància a la glucosa intravenosa.

G

G: Guanina.

G+C: Guanina més Citocina.

Gab 1: Grb2-associated binder-1. Enllaçador 1 associat a Grb-2

GDP: Guanina difosfat.

GH: Growth hormone. Hormona de creixement.

Gln: Glutamina.

Glu: Àcid glutàmic.

Gly: Glicina.

Grb-2/10: Growth factor receptor-bound protein 2/10. Proteïna 2/10 unida al receptor del factor de creixement.

GREs: Glucocorticoids response elements. Elements de resposta als glucocorticoids.

GSK3: glycogen syntase kinase 3. Quinasa reguladora de la síntesi de glicogen i la iniciació de la traducció del ARNm.

GTP: Guanina trifosfat.

H

HAIR-AN: HiperAndrogenisme, Resistència a la insulina, Acantosis Nigricans.

Hidr: Aminoàcids hidrofòbics.

HIR-A: isoforma del receptor d'insulina humana que no conté els aminoàcids que formen l'exó 11.

HIR-B: isoforma del receptor d'insulina humana que conté els aminoàcids que formen l'exó 11.

His: Histidina.

HRP: horseradish peroxidasa.

I

IGF-I: Insulin like growth factor-1. Factor de creixement semblant a la insulina.

Ile: Isoleucina.

IPTG: Isopropil -D-thiogalactopiranosid.

IRNF-1 i 2: Insulin receptor nuclear factors 1 i 2. Factors nuclears 1 i 2 del receptor d'insulina.

IRS-1/2/3/4: Insulin receptor substrate-1/2/3/4. Substrat 1/2/3/4 del receptor d'insulina.

ITT: Mesura dels nivells seqüencials de glucosa en plasma després de l'administració d'insulina intravenosa.

K

KDa: Quilodàlton.

Kpb: Quiloparells de bases.

L

Leu: Leucina.

Lys: Lisina.

M

M: Mesura de la disponibilitat de glucosa mediada per la insulina *in vivo*.

MAPKAP-kinase 1/2: Quinases.

MEK: MAPK ERK-activating kinase. Quinasa activadora Mapk erk.

Met: Metionina.

min.: Minut.

MOCK: Cèl·lules d'ovari de hàmtster que estan sotmeses a un cicle de transfecció simulat (sense ADN).

mTOR: Mammalian target of Rampamycin. Quinasa regulada per la Bad.

N

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

Neor: Gen de resistència a la Neomicina.

NF-1: Nuclear factor 1. Factor nuclear 1.

NGF: Necrosis growth factor. Factor de creixement necròtic.

NIH-3T3: Tipus especial de fibroblasts.

NPXY: N;Asparagina, P; fenilalanina, X; qualsevol aminoàcid, Y; tirosina.

O

O/N: Over night. Tota la nit.

OGTT: Test de tolerància oral a la glucosa.

P

p110: Subunitat catalítica de la PI3K.
p21 Ras: Petita proteïna G.
p42/p44Map quinasa: Mitogen activated protein kinase. Proteïna quinasa mitogen activada.
p70S6: Quinasa regulada per mTOR.
p85: Subunitat reguladora de la PI3K.
p90 RSK: Quinasa.
pb: Parells de bases.
PCOS: Síndrome de l'ovari poliquístic.
PCR: Polymerase Chain Reaction. Reacció en cadena de la polimerasa.
PDGF: Platelet derived growth factor. Factor de creixement derivat de les plaquetes.
PDK1/2: Phosphatidyl-dependent protein kinases 1 i 2. Proteïna quinases dependents del fosfatidil.
PdtIns(3,4,5)P3/(3,4)P2: Fosfatidilinositol 3 fosfat / 2 fosfat.
PFK2: 6-phosphofructo2-kinase. 6-Fosfofructo2-quinasa.
PH: Domini homòleg a la Plecstrina.
Phe: Fenilalanina.
PI3-K: Fosfatidilinositol 3 quinasa.
PKB: Proteïna quinasa B.
PKC: Proteïna quinasa C.
PM: Pes molecular.
pRc.CMV: Vector pRc amb el promotor del citomegalovirus humà.
pRc.CMV.RI: Vector pRc.CMV portador del receptor d'insulina.
Pro: Prolina.
PTB: Domini d'unió a fosfotirosines.
pUC18.RI.Val1028: Vector pUC18 portador del receptor d'insulina amb la mutació Val1028.

R

Raf-1: Serín/treonín quinasa.
RI: Receptor d'insulina.
RI 113: Receptor d'insulina amb la deleció de 113 aminoàcids terminals.
RI 43: Receptor d'insulina amb la deleció de 43 aminoàcids terminals.
RI.1239Aturada: Receptor d'insulina portador de la mutació d'splicing 1239Aturada.
RI.Leu140: Receptor d'insulina portador de la mutació Leu140.
RI.Val1028: Receptor d'insulina portador de la mutació Val1028.
RI.WT: Receptor d'insulina normal.
RI.WT/Val1028: Receptor d'insulina heterozigot normal i amb la mutació Val1028.
RM1: Pacient amb la síndrome de Rabson-Mendenhall.
RT: Retrotranscriptasa.

S

SDS-PAGE: Gel electroforètic de poliacrilamida amb sodi dodecil disulfat.

seg.: Segon.

Ser: Serina.

SH2/3: Src homology 2/3.

Shc: Src homology collagen protein. Proteïna Src homòloga al colagen.

SHP2: Tirosín fosfatasa SHP2

SHPS-1: SHP substrate 1. Substrat 1 de la SHP.

Si: Índex de sensibilitat a la glucosa.

SIRPs: Signal regulatory proteins. Proteïnes reguladores del senyal.

Sos: Proteïna anomenda Son of sevenless.

Sp1: Factor de transcripció.

SSCP: Single strand conformation polymorphisms. Polimorfismes conformacionals de cadena senzilla.

T

T: Timina.

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametilenediamina.

Thr: Treonina.

Trp: Tryptòfan.

Tyr: Tirosina.

U

UTR: Untranslated region. Regió que no es tradueix.

V

Val: Valina.

vs.: versus.

W

WT: Wild type. Forma normal o salvatge.

X

Xaa: Qualsevol aminòacid.

X-Gal: 5-Bromo 4-cloro-3-indolil -D-galactopiranosid.

Y

YMXM: Y; tirosina, M; Metionina, X; qualsevol aminoàcid.

YXXM: Y; tirosina, X; qualsevol aminoàcid, M; Metionina.

11.- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Myers MG, White MF. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:615-58.
2. Gomis R, Gasa R, Usac EF. El Mèdol, editors. *Diabetis Mellitus*. Barcelona: Associació Catalana de Diabetis; 1996; 3, Bases bioquímiques i fisiopatologia de la Diabetis Mellitus. p. 45-56.
3. Soler J, Raurell M, Nacher, V. El Mèdol, editors. *Diabetis Mellitus*. Barcelona: Associació Catalana de Diabetis. 1996; 4, Síntesi i secreció d'insulina. p. 57-68.
4. Heesom KJ, Herbeck M, Khan CR, Denton RM. Insulin action on metabolism. *Diabetologia* 1997;40:B3-9.
5. Knutson VP. Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *FASEB J* 1991;5(8):2130-8.
6. Bevan AP, Seabright PJ, Tikerpae J, Posner BI, Smith GD, Siddle K. The role of insulin dissociation from its endosomal receptor in insulin degradation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000;164:145-57.
7. Hedin CH. Imperial Cancer Research Fund. editors. *Cancer Surveys*. 1996; Protein tyrosine kinase receptors. p. 7-24.
8. Sesti G, Tullio AN, Marini MA, Manera E, Borboni P, Accili D, Longhi R, Fusco A, R. L, A. M. Role of exon 11 of the insulin receptor gene on insulin binding identified by anti-peptide antibodies. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994;101:121-7.
9. Yang-Feng TL, Francke U, Ullrich A. Gene for human insulin receptor. Localization to site on chromosome 19 involved in pre-B-cell leukemia. *Science* 1985;228:728-31.
10. Ullrich A, Bell GI, Chen EY, Herrera R, Petruzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Y. L, M. T, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 1985;313:756-61.
11. Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou J, Masiarz F, Y.W. K, I.D. G, et al. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 1985;40:747-58.

12. Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:114-8.
13. Calle C, Campión J. Regulación transcripcional de la expresión del gen del receptor de insulina. *Avances en Diabetología* 1995;10:65-74.
14. Feener EP, Backer JM, King GL, Wilden PA, Sun, X, Kahn CR, White MF. Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *J Biol Chem* 1993;268:11256-64.
15. Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Molecular Endocrinology* 1989;3:1263-9.
16. Shoelson SE, White MF, Kahn CR. Tryptic activation of the insulin receptor. *J Biol Chem* 1988;263:4852-60.
17. Herrera R, Lebwohl D, García de Herreros A, Kallen RG, Rosen OM. Synthesis, purification and characterization of the cytoplasmic domain of the insulin receptor using a baculovirus expression system. *J Biol Chem* 1988;264:5560-8.
18. Villalba M, Wentw SR, Russell DS, Ahn J, Reicheldefer CF, Rosen OM. Another version of the human insulin receptor kinase domain: expression, purification and characterization. *Proc Natl Sci USA* 1989;86:7848-52.
19. Bajaj M, Waterfield MD, Schlessinger J, Taylo WR, Blundell T. On the tertiary structure of the extracellular domains of the epidermal growth factor and insulin receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1987;916:220-6.
20. Gustafson TA, Rutters WJ. The cysteine-rich domains of the insulin and insulin-like growth factor I receptors are primary determinants of hormone binding specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 1990;265(30):18663-7.
21. Koller EA, Accili D, Taylor SI. Bruce D. W, editors. *Molecular Endocrinology: Basic concepts and clinical correlations*. New York: Raven Press. Ltd. 1995; 19, Mutations i the insulin receptor gene in insulin resistant patients. p. 283-306.

- 22.** DeMeyts P, Gu J, Shymko RM, Kaplan BE, Bell GI, Whittaker J. Identification of ligand-binding region of the human insulin receptor encoded by the second exon of the gene. *Molecular Endocrinology* 1990;4:409-16.
- 23.** Pessin JE, Frattali AL. Draznin B, LeRoith D, editors. *Molecular Biology of Diabetes, Part II*. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 1994; 21, Structure-Function properties of insulin/IGF-I hybrid receptors. p. 413-36.
- 24.** Zhang B, Roth RA. A region of the insulin receptor important for ligand binding (residues 450-601) is recognized by patient's autoimmune antibodies and inhibitory monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9858-62.
- 25.** Luo RZ, Beniac DR, Fernandes A, Yip CC, Ottensmeyer FP. Quaternary structure of the Insulin-Insulin receptor complex. *Science* 1999;285:1077-80.
- 26.** Schlessinger J. Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *TIBS* 1988;13:443-7.
- 27.** DeMeyts P, Wallach B, Christoffersen CT. The insulin-like growth factor-1 receptor, structure, ligand-binding mechanism and signal transduction. *Horm Res* 1994;42:152-69.
- 28.** Lemmon MA, Schlessinger J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends in Biochemical Sciences* 1994;19:459-63.
- 29.** White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997;40:S2-S17.
- 30.** DeMeyts P. The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-1 receptor binding and negative cooperativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling. *Diabetologia* 1995;37:S135-48.
- 31.** Mynarcik DC, Yu GQ, Whittaker J. Alanine-scanning mutagenesis of a C-terminal ligand binding domain of the insulin receptor α -subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 1996;271(5):2439-42.
- 32.** White MF, Livingston JN, Backer JM, Lauris V, Dull TJ, Ullrich A, Kahn CR. Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* 1988;54:641-9.

- 33.** Kabugari Y, Momomura K, Yamamoto-Honda R, et al. Site-directed mutagenesis of the juxtamembrane domain of the human insulin receptor. *J Biol Chem* 1993;268:16610-22.
- 34.** Combettes-Souverain M, Issad T. Molecular basis of insulin action. *Diabetes & Metabolism* 1998;24:477-89.
- 35.** Seedorf K. Intracellular signalling by growth factors. *Metabolism* 1995;44(10 suppl.4):24-32.
- 36.** Kharitonov A, Schnekenburger J, Chen Z, et al. Adapter function of PTP1D in insulin receptor/IRS1 interaction. *J Biol Chem* 1995;270:29189-93.
- 37.** Taouis M, Levy-Toledano R, Roach P, Taylor SI, Gorden P. Structural basis by which a recessive mutation in the α -subunit of the insulin receptor affects insulin binding. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269(21):14912-8.
- 38.** Takayama S, White MF, Khan CF. Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine activity. *J Biol Chem* 1988;263:3440-7.
- 39.** Coghlan MP, Siddle K. Phorbol esters induce insulin receptor phosphorylation in transfected fibroblasts without affecting tyrosine kinase activity. *B B R C* 1993;193:371-7.
- 40.** White MF, Maron R, Kahn CR. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr 185,000 protein in intact cells. *Nature* 1985;318:183-6.
- 41.** Sun XJ, Rothenberg P, Khan CR, Backer JM, Araki E. The structure of the insulin receptor substrates IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991;352:73-7.
- 42.** Sun XJ, Miralpeix M, Myers MGJ, Glashee EM, Backer JM, et al. The expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *J Biol Chem* 1992;267:22662-72.
- 43.** Mantzoros CS, Flier JS. E. M, editors. *Advances in endocrinology and metabolism*. St. Louis: Mosby-Year Book; 1995; *Insulin resistance: the clinical spectrum*. p. 193-232.

- 44.** Tritos NA, Mantzoros CS. Syndromes of severe insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998;83(9):3025-30.
- 45.** Krentz AJ. Insulin resistance. *BMJ* 1996;313:1385-9.
- 46.** Flier JS, Moller DE, Moses AC, et al. Insulin-mediated pseudoacromegaly: clinical and biochemical characterization of a syndrome of selective insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1533-41.
- 47.** Coccozza S, Porcellini A, Ricardi G, et al. NIDDM associated with mutation in tyrosine kinase domain of insulin receptor gene. *Diabetes* 1992;41:521-6.
- 48.** O'Rahilly S, Choi WP, Patel P, Turner RC, Flier JS, Moller DE. Detection of mutations in insulin receptor gene in NIDDM patients by analysis of single-stranded conformational polymorphisms. *Diabetes* 1991;40:777-82.
- 49.** Taylor SI. Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin receptor gene. *Diabetes* 1992;41:1473-90.
- 50.** Björntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 1991;14:1132-43.
- 51.** Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
- 52.** Moller DE, Flier JS. Insulin resistance. mechanisms, syndromes and implications. *N Engl J Med* 1991;325:938-48.
- 53.** Kahn CR, Flier JS, Bar RS, et al. The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans: insulin receptor disorders in man. *N Engl J Med* 1976;294:739-45.
- 54.** Donohue WL, Uchida, I. Leprechaunism: a euphemism for a rare familial disorder. *J Pediatr* 1954;45:505-19.
- 55.** Clauser E, Leconte, I, Auzan C. Molecular basis of insulin resistance. *Horm Res* 1992;38:5-12.
- 56.** Kadowaki T, Kadowaki H, Taylor SI. A nonsense mutation causing decreased levels of insulin receptor mRNA: detection by simplified technique for direct sequencing of

genomic DNA amplified by polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:658-62.

57. Longo N, Langley SD, Griffin LD, Elsas LJ. Reduced mRNA and a nonsense mutation in the insulin receptor gene produce heritable severe insulin resistance. American Journal of Human Genetics 1992;50:998-1007.

58. Weitheimer E, Lu SP, Backeljauw PF, et al. Homozygous deletion of the human insulin receptor gene results in leprechaunism. Nature 1993;357:71-3.

59. Krook A, O'Rahilly S. Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance. Baillière's Clinical endocrinology and Metabolism 1996;10(1):97-122.

60. Mendenhall EN. Tumor of the pineal gland with high insulin resistance. J Indiana State Med Assoc 1950;43:32-6.

61. Vidal-Puig A, Moller DE, Azziz R, Nestler JE, Dewailly D, editors. Androgen excess disorders in women. Philadelphia: Lippincott Raven; 1997; Insulin resistance: classification, prevalence, clinical manifestations and diagnosis. p. 227-36.

62. Kadowaki T, Bevins CL, Cama A, et al. Two mutant alleles of the insulin receptor gene in patient with extreme insulin resistance. Science 1988;240:787-90.

63. Yoshimasa Y, Seino S, Whittaker J, et al. Insulin resistant diabetes due to a point mutation that prevents insulin proreceptor processing. Science 1988;(240):784-7.

64. Taylor SI, Kadowaki T, Kadowaki H, Accili D, Cama A, McKeon C. Mutations in insulin receptor gene in insulin resistant patients. Diabetes Care 1990;13:257-79.

65. Taylor SI, Cama A, Accili D. Mutations in the insulin receptor gene. Endocrine Reviews 1992;13:566-95.

66. Maquat LE. When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. RNA 1995;1:453-65.

67. Accili D, Barbetti F, Cama A, Kadowaki H, Kadowaki T, Imano E, Levy-Toledano R, Taylor SI. Mutations in the insulin receptor gene in patients with genetic syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. J Invest Dermatol 1992;98:77S-81S.

68. Imano E, Kadowaki H, Kadowaki T, et al. Two patients with insulin resistance due to decreased levels of insulin receptor mRNA. *Diabetes* 1991;40:548-57.

69. Treadway JL, Morrison BD, Soos MA, et al. Transdominant inhibition of tyrosine kinase activity in mutant insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:214-8.

- 70.** Frattali AL, Treadway JL, Pessin JE. Transmembrane signalling by the human insulin receptor kinase. Relationship between intramolecular beta subunit trans- and cis-autophosphorylation and substrate kinase activation. *J Biol Chem* 1992;267:19521-8.
- 71.** Levy-Toledano R, Caro LHP, Accili D, Taylor SI. Investigations of the mechanism of the dominant negative effect of mutations in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. *EMBO J* 1994;13:835-42.
- 72.** McElduff A, Hedo JA, Taylor SI, Roth J, Gorden P. Insulin receptor degradation is accelerated in cultured lymphocytes from patients with genetic syndromes of extreme insulin resistance. *J Clin Invest* 1984;(74):1366-74.
- 73.** Horikoshi H, Yoshioka T. Troglitazone- a novel antidiabetic drug for treating insulin resistance. *Drug Discovery Today* 1998;3(2):79-88.
- 74.** Bailey CJ, Path MRC, Turner RC. Metformin. *The New England Journal of Medicine* 1996;334(9):574-9.
- 75.** Wiernsperger NF. Membrane physiology as a basis for the cellular effects of metformin in insulin resistance and diabetes. *Diabetes & Metabolism* 1999;25:110-27.
- 76.** Riqué S, Nogués C, Ibàñez L, Marcos MV, Ferragut J, Carrascosa A, Potau N. Identification of three novel mutations in the insulin receptor gene in type a insulin resistant patients. *Clinical Genetics* 2000;57:67-9.
- 77.** Riqué S, Ibàñez L, Marcos MV, Carrascosa A, Potau N. Effects of metformin on androgens and insulin levels in type A insulin resistance syndrome. *Diabetologia* 2000;43:385-6.
- 78.** Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Nolan C, Ferguson M, editors. *Molecular cloning. A laboratory manual. second ed.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989;
- 79.** Seino S, Seino M, Bell GI. Human insulin-receptor gene. Partial sequence and amplification of exons by polymerase chain reaction. *Diabetes* 1990;39:123-8.

- 80.** Barbetti F, Gejman PV, Taylor SI, Raben N, Cama A, Bonora E, Pizzo P, Moghetti P, Muggeo M, Roth J. Detection of mutations in insulin receptor gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Diabetes* 1992;41:408-15.
- 81.** Teschauer W, Mussack T, Braun A, Waldner H, Fink E. Conditions for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis with broad applicability: A study on the effects of acrylamide, buffer and glycerol concentrations in SSCP analysis of exons of the p35 gene. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:125-31.
- 82.** Stith BJ, Woronoff K, Wiernsperger N. Stimulation of the intracellular portion of the human insulin receptor by the antidiabetic drug metformin. *Biochemical Pharmacology* 1998;55:533-6.
- 83.** Kadowaki T, Kadowaki H, Rechier MM, Serrano-Rios M, Roth J, Gorden P, Taylor SI. Five mutant alleles of the insulin receptor gene in patients with genetic forms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1990;86:254-64.
- 84.** Whittaker J, Okamoto AK, Thys R, Bell GI, Steine DF, Hofmann CA. High-level expression of human insulin receptor cDNA in mouse NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;8:5237-41.
- 85.** Elbein SC, Sorensen LK, Schumacher MC. Methionine for Valine substitution in exon 17 of the insulin receptor gene in a pedigree with familial NIDDM. *Diabetes* 1993;42:429-34.
- 86.** 't Hart LM, Stolk RP, Heine RJ, Grobbee DE, van der Does FEE, Maassen JA. Association of the insulin receptor variant Met985 with hyperglycaemia and non insulin dependent diabetes mellitus in Netherlands: a population based study. *Am J Hum Genet* 1996;59:1119-25.
- 87.** Strack, V, Bossenmaier B, Stoyanov B, Mushack J, Häring HU. A 973 valine to methionine mutation of the human insulin receptor: interaction with insulin-receptor substrate-1 and Shc in HEK 293 cells. *Diabetologia* 1997;40:1135-40.
- 88.** Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globine genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350-4.

- 89.** Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2766-70.
- 90.** Moller DE, Cohen O, Yamaguchi Y, et al. Prevalence of mutations in the insulin receptor gene in subjects with features of type A syndrome of insulin resistance. *Diabetes* 1994;43:247-55.
- 91.** Cama A, Sierra MIL, Ottini L, Kadowaki T, Gorden P, Imperato-McGinley J, Taylor SI. A mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor associated with insulin resistance in an obese woman. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991;73(4):894-901.
- 92.** Kim H, Kadowaki H, Sakura H, Odawara M, Momomura K, Takahashi Y, Miyazaki Y, Ohtani T, Akanuma Y, Yazaki Y, et al. Detection of mutations in the insulin receptor gene in patients with insulin resistance by analysis of single-stranded conformation polymorphisms. *Diabetologia* 1992;35:261-6.
- 93.** O'Rahilly S, Moller DE. Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance. *Clinical Endocrinology* 1992;36:121-32.
- 94.** Krook A, Kumar S, Laing I, Boulton AJM, Wass JAH, O'Rahilly S. Molecular scanning of the insulin receptor gene in syndromes of insulin resistance. *Diabetes* 1994;43:357-68.
- 95.** Krook A, Brueton L, O'Rahilly S. Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene in infant with Leprechaunism. *Lancet* 1993;342:277-8.
- 96.** van der Vorm ER, Kuipers A, Kielkopf-Renner S, MKrans HMJ, Möller W, Maassen JA. A mutation in the insulin receptor that impairs proreceptor processing but not insulin binding. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269(19):14297-302.
- 97.** Jospe N, Kaplowitz PB, Furlanetto W. Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene of a patient with severe congenital insulin resistance:leprechaunism and the role of the insulin-like growth factor receptor. *Clinical Endocrinology* 1996;45:229-35.
- 98.** Suzuki Y, Hatanaka Y, Taira M, Shimada F, Hashimoto N, Takayanagi M, Taylor SI, Makino H, Yoshida S. Insulin resistance associated with decreased levels of insulin-

receptor messenger ribonucleic acid: Evidence of a de novo mutation in the maternal allele. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995;80(4):1214-20.

99. van der Vorm ER, Maassen JA. Alternative splicing of the insulin receptor isoforms is altered in patients with Leprechaunism. *Horm metab Res* 1994;26:599-601.

100. Haruta T, Imamura T, Iwanishi M, Egawa K, Goji K, Kobayashi M. Amplification and analysis of promoter region of insulin receptor gene in a patient with leprechaunism associated with severe insulin resistance. *Metabolism* 1995;44(4):430-7.

101. Kadowaki T, Kadowaki H, Accili D, Taylor SI. Substitution of Lysine for Asparagine at position 15 in the α -subunit of the human insulin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1990;265:19143-50.

102. Quon MJ, Cama A, Taylor SI. Postbinding characterization of five naturally occurring mutations in the human insulin receptor gene: Impaired insulin-stimulated c-jun expression and thymidine incorporation despite normal receptor autophosphorylation. *Biochemistry* 1992;31:9947-54.

103. Kusari J, Takata Y, Hatad E, Freidenberg G, Kolterman O, Olefsky JM. Insulin resistance and diabetes due to different mutations in the tyrosine kinase domain of both insulin receptor gene alleles. *The Journal of Biological Chemistry* 1991;266(15):5260-7.

- 104.** van der Vorm ER, Van der Zon GCM, Möller W, Krans HMJ, Lindhout D, Maassen JA. An Arg for Gly substitution at position 31 in the insulin receptor, linked to insulin resistance, inhibits receptor processing and transport. *The Journal of Biological Chemistry* 1992;267(5):66-71.
- 105.** Rouard M, Macari F, Bouix O, Lautier C, Brun JF, Lefebvre P, Renard E, Bringer J, Jaffiol C, Grigorescu F. Identification of two novel insulin receptor mutations, Asp59Gly and Leu62Pro, in Type A syndrome of extreme insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997;234:764-8.
- 106.** Gronskov K, Vissing H, Shymko RM, Tornqvist H, DeMeyts P. Mutation of Arginine 86 to Proline in the insulin receptor alpha subunit causes lack of transport of the receptor to the plasma membrane, loss of binding affinity and a constitutively activated Tyrosine kinase in transfected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993;192(2):905-11.
- 107.** Longo N, Langley SD, Still MJ. Role of arginine 86 of the insulin receptor in insulin binding and activation of glucose transport. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998;1402:86-94.
- 108.** Nakae J, Morioka H, Ohtsuka E, Fujieda K. Replacements of Leucine 87 in human insulin receptor alter affinity for insulin. *The Journal of Biological Chemistry* 1995;270(37):22017-22.
- 109.** Moritz W, Böni-Schnetzler M, Stevens W, Froesch ER, Levy JR. In-frame exon 2 deletion in insulin receptor RNA in a family with extreme insulin resistance in association with defective insulin binding: a case report. *European Journal of Endocrinology* 1996;135:357-63.
- 110.** Jospe N, Zhu J, Liu R, Livingston JN, Furlanetto RW. Deletion of 3 basepairs resulting in the loss of Lysine-121 in the insulin receptor alpha-subunit in a patient with leprechaunism: binding, phosphorylation, and biological activity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994;79:1294-302.
- 111.** Andreadis A, Gallego ME, Nadal-Guinard B. Generation of protein isoform diversity by alternative splicing: mechanistic and biological implications. *Ann Rev Cell Biol* 1987;3:207-42.

- 112.** Magré J, Karayanni C, Hadjiathanasiou CG, Desbois-Mouthon C, Meier M, Vigouroux C, Stavrinadis C, Sinaniotis C, Caron M, Capeau J. Dominant transmission of insulin resistance in a Type A family resulting from a heterozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene and associated with decreased mRNA level and insulin binding sites. *Diabetes* 1997;46:1901-3.
- 113.** Vorwerk P, Christoffersen CT, Müller J, Vestergaard H, Pedersen O, DeMeyts P. Alternative splicing of exon 17 and a missense mutation in exon 20 of the insulin receptor gene in two brothers with a novel syndrome of insulin resistance (congenital fiber-type disproportion myopathy). *Hormone Research* 1999;52:211-20.
- 114.** Klein HH, Müller R, Vestergaard H, Pedersen O. Implications of compound heterozygous insulin receptor mutations in congenital muscle fibre type disproportion myopathy for the receptor kinase activation. *Diabetologia* 1999;42:245-9.
- 115.** Longo N, Langley SD, Griffin LD, Elsas LJ. Two mutations in the insulin receptor gene of a patient with Leprechaunism: application to prenatal diagnosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995;80:1496-501.
- 116.** Berget SM. Exon recognition in vertebrate splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 1995;270(6):2411-4.
- 117.** Takahashi Y, Kadowaki H, Ando A, Quin JD, MacCuish AC, Yazaki Y, Akanuma Y, Kadowaki T. Two aberrant splicings caused by mutations in the insulin receptor gene in cultured lymphocytes from a patient with Rabson-Mendenhall's syndrome. *J Clin Invest* 1998;101(3):588-94.
- 118.** Kadowaki H, Takahashi Y, Ando A, Momomura K, Kaburagi Y, Quin JD, MacCuish AC, Koda N, Fukushima Y, Taylor SI, et al. Four mutant alleles of the insulin receptor gene associated with genetic syndromes of extreme insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997;237:516-20.
- 119.** Maegawa H, McClain DA, Freidenberg G, Olefky JM, Napier M, Lipari T, Dull TJ, Lee J, Ullrich A. Properties of a human insulin receptor with a COOH-terminal truncation. *The Journal of Biological Chemistry* 1988;263(25):8912-7.
- 120.** Levy-Toledano R, Accili D, Taylor SI. Deletion of C-terminal 113 amino acids impairs processing and internalization of human insulin receptor: comparison of receptors expressed in CHO and NH-3T3 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993;1220:1-14.

- 121.** Baron, V, Kaliman P, Alengrin F, Van Obberghen E. Interaction of the C-terminal acidic domain of the insulin receptor with histone modulates the receptor kinase activity. *Eur J Biochem* 1995;229:27-34.
- 122.** Gual P, Baron, V, Alengrin F, Mothe, I, Van Obberghen E. Insulin receptor-Induced phosphorylation of cellular and synthetic substrates is regulated by the receptor B-subunit-C-terminus. *Endocrinology* 1996;137(8):3416-23.
- 123.** Tennagels N, Bergschneider E, Al-Hasani H, Klein HW. Autophosphorylation of the two C-terminal tyrosine residues Tyr1316 and Tyr1322 modulates the activity of the insulin receptor kinase in vitro. *FEBS Letters* 2000;479:67-71.
- 124.** Yamamoto R, Shiba T, Tobe K, Shibasaki Y, Koshio O, Izumi T, Odawara M, Mikami Y, Matsuura N, Akanuma Y, et al. Defect in tyrosine kinase activity of the insulin receptor from a patient with insulin resistance and acanthosis nigricans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990;70:869-78.
- 125.** Haruta T, Takata Y, Iwanishi M, Maegawa H, Imamura T, Egawa K, Itazu T, Kobayashi M. Ala1048Asp mutation in the kinase domain of insulin receptor causes defective kinase activity and insulin resistance. *Diabetes* 1993;42:1837-44.
- 126.** Takahashi Y, Kadowaki H, Momomura K, Fukushima Y, Orban T, Okay T, Taketani Y, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T. A homozygous kinase-defective mutation in the insulin receptor gene in a patient with leprechaunism. *Diabetologia* 1997;40:412-20.
- 127.** Kishimoto M, Hashiramoto M, Yonezawa K, Shii K, Kazumi T, Kasuga M. Substitution of glutamine for arginine 1131. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269(15):11349-55.
- 128.** Moller DE, Yokota A, White MF, Pazianos AG, Flier JS. A naturally occurring mutation of insulin receptor alanine 1134 impairs tyrosine kinase function and is associated with dominantly inherited insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry* 1990;265(25):14979-85.
- 129.** Cama A, Quon MJ, Sierra MIL, Taylor SI. Substitution of isoleucine for methionine at position 1153 in the b-subunit of the human insulin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1992;267(12):8383-9.

- 130.** Krook A, Whitehead JP, Dobson SP, Griffiths MR, Ouwens M, Baker C, Hayward AC, Sen SK, Maassen JA, Siddle K, et al. Two naturally occurring insulin receptor tyrosine kinase domain mutants provide evidence that phosphoinositide 3-kinase activation alone is not sufficient for the mediation of insulin's metabolic and mitogenic effects. *The Journal of Biological Chemistry* 1997;272(48):30208-14.
- 131.** Moller DE, Yokota A, Ginsberg-Fellner F, Flier JS. Functional properties of a naturally occurring Trp1200Ser mutation of the insulin receptor. *Molecular Endocrinology* 1990;4:1183-91.
- 132.** Cama A, Sierra MIL, Quon MJ, Ottini L, Gorden P, Taylor SI. Substitution of glutamic acid for alanine 1135 in the putative "catalytic loop" of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1993;268(11):8060-9.
- 133.** Whitehead JP, Soos MA, Jackson R, Tasic V, Kocova M, O'Rahilly S. Multiple molecular mechanisms of insulin receptor dysfunction in a patient with Donohue syndrome. *Diabetes* 1998;47:1362-4.
- 134.** Imamura T, Takata Y, Sasaoka T, Takada Y, Morioka H, Haruta T, Sawa T, Iwanishi M, Hu YG, Suzuki Y, et al. Two naturally occurring mutations in the kinase domain of insulin receptor accelerate degradation of the insulin receptor and impair kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269(49):31019-27.
- 135.** Kan M, Kanai F, Iida M, Jinnouchi H, Todaka M, Imanaka T, Iyo K, Nishioka Y, Ohnishi T, Kamohara S, et al. Frequency of mutations of insulin receptor gene in Japanese patients with NIDDM. *Diabetes* 1995;44:1081-6.
- 136.** Hubbard SR, Wei L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 1994;372:746-54.
- 137.** Hubbard SR. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *The EMBO Journal* 1997;16(18):5572-81.
- 138.** Psiachou H, Mitton S, Alagband-Zadeh J, Hone J, Taylor SI, Sinclair L. Leprechaunism and homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene. *The Lancet* 1993;342:924
- 139.** Bailey CJ. Biguanides in the treatment of type II diabetes. *Curr Opin Endocrinol and Diabetes* 1995;2:348-54.

- 140.** Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T, Sosa F, Glueck CJ. Metformin therapy in polycystic Ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 1994;43(5):647-54.
- 141.** Sarlis NJ, Weil SJ, Nelson LM. Administration of Metformin to a diabetic woman with extreme hyperandrogenemia of nontumoral origin: management of infertility and prevention of inadvertent masculinization of a female fetus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999;84(5):1510-2.
- 142.** Pascuali R, Gambineri A, Biscotti D, Vicennati, V, Gagliardi L, Colitta D, Fiorini S, Cognini GE, Filicori M, Morselli-Labate AM. Effect of long-term treatment with Metformin added to hypocaloric diet on body composition, fat distribution, and androgen and insulin levels in abdominally obese women with and without the polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000;85(8):2767-74.
- 143.** la Marca A, Egbe TO, Morgante G, Paglia T, Ciani A, De Leo, V. Metformin treatment reduces ovarian cytochrome p-450c17a response to human chorionic gonadotrophin in women with insulin resistance-related polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 2000;15:21-3.
- 144.** Lenhard JM, Klier SA, Paulik MA, Plunket KD, Lehmann JM, Weiel JE. Effects of Troglitazone and Metformin on glucose and lipid metabolism. *Biochemical Pharmacology* 1997;54:801-8.
- 145.** Lee PJ, Cranston, I, Amiel SA, O'Rahilly S, Green AA. Effect of Metformin on glucose disposal and hyperinsulinaemia in a 14-year-old boy with acanthosis nigricans. *Hormone Research* 1997;48:88-92.
- 146.** Matthaehi S, Hamann A, Klein HH. Association of Metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes. *Diabetes* 1991;40:850-7.
- 147.** Kanigür-Sultuybek G, Güven M, Onaran, I, Tezcan, V, Cenani A, Hatemi H. The effect of Metformin on insulin receptors and lipid peroxidation in alloxan and streptozotocin induced diabetes. *J Basic Clinical Physiol Pharmacol* 1995;6:271-80.

148. Fantus IG, Brosseau R. Mechanism of action of Metformin: insulin receptor and postreceptor effects in vitro and in vivo. *Journal Clinical Endocrinology & Metabolism* 1986;63:898-905.

149. Wu MS, Johnston P, Sheu WHH. Effect of Metformine on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1990;13:1-18.

150. Nakamura SY, Thirone ACP, Carvalho CRO, et al. Effect of Metformin on early steps of insulin signal transduction in liver and muscle of aging rats. [Abstract] *Diabetes* 1998;47 (Suppl.1):1148