



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00186**

(22) Data de depozit: **25/03/2019**

(41) Data publicării cererii:
27/11/2020 BOPI nr. **11/2020**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE BIOCHIMIE AL
ACADEMIEI ROMÂNE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **ALEXANDRU PETRUȚA RAMONA,
BULEVARDUL UNIRII, BL.18D, AP.23,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PETRESCU ȘTEFANA,
STR.POSTĂVARUL NR.5, BL.C 5, SC.7,
AP.85, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **METODĂ PENTRU TRATAREA, CONTROLUL
ȘI PREVENIREA DIABETULUI ȘI A ALTOR BOLI
METABOLICE ÎNRUDITE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție prezintă un proces inovativ pentru controlul, tratarea și prevenirea diabetului și a altor boli metabolice înrudite prin administrarea genei EDEM1, în particular livrată prin sisteme lentivirale pentru expresie tranzientă sau stabilă. Metoda, conform invenției, constă în administrarea genei EDEM1 în sistem biologic celular și model animal, ceea ce determină o creștere

a concentrației de insulină, a toleranței la glucoză crescută și în final o scădere a glicemiei din sânge în model diabetic animal.

Revendicări: 14
Figuri: 6



Metoda pentru tratarea, controlul si prevenirea diabetului si a altor boli metabolice inrudite

Inventia se refera la o metoda de terapie pentru atenuarea si ameliorarea simptomelor diabetului zaharat prin administrarea genei EDEM1 (ER degradation-enhancing mannosidase-like protein), un activator al ERAD (degradare asociata reticulului endoplasmatic).

Insulina este un hormon peptidic care controleaza homeostazia glucozei. Celulele β -pancreatice secreta insulina ca raspuns la concentratii crescute de glucoza in sange (1). Insulina este initial sintetizata ca preproinsulina, pe ribozomi si translocata in reticulul endoplasmatic (ER), unde peptidul semnal este scindat (2, 3). Proinsulina generata consta intr-o molecula cu un singur lanț de 86 de aminoacizi cuprinzand lantul B (30 de aminoacizi) si lantul A (21 aminoacizi) legati impreuna de peptidul C (4).

In lumenului RE, proinsulina dobandeste conformatia nativa si este stabilizata prin formarea celor trei legaturi disulfidice (5). Proinsulina corect pliata este transportata din RE, in aparatul Golgi, unde este impachetata in vezicule secretorii imature care inmuguresc din reseaua trans-Golgi (TGN), acoperite cu clatrina ce sufera un proces de maturare. Moleculele de proinsulina corect pliate trec de controlul calitatii din RE, transportate in aparatul Golgi (6). Maturarea proteolitica a insulinei este insotita de indepartarea si secretia peptidului C ce corespunde maturarii veziculelor secretorii in timpul etapei de acidificare (7). Insulina este impachetata si depozitata in veziculele secretorii, pana in momentul in care celula β -pancreatica este stimulata si insulina este secretata prin exocitoza (8).

Controlul calitatii proteinelor din RE este crucial in mentinerea homeostazei proteinelor celulare si eficientei caii secretorii. In celulele pancreatice stimulate cu glucoza exista o crestere a sintezei proinsulinei care poate ajunge pana la 50% din totalul de proteine din RE (9). Supraaglomerarea RE poate reduce eficienta procesului de pliere a proteinelor, ceea ce duce la acumularea de molecule de proinsulina incorect pliate si a imposibilitatii de a iesi din RE (10). Aceasta, la randul sau, poate declansa stresul in RE si raspunsul proteinelor la stres (UPR), procese care conduc adesea la apoptoza si moarte celulara (11). Prin urmare, aceste celule trebuie sa dispuna de mecanisme de secretie de mare eficienta pentru eliminarea proteinelor incorect pliate. In RE, proteinele incorect pliate sunt indepartate prin calea de degradare asociata reticulului endoplasmatic (ERAD) (12). Acest proces implica complexe de proteine cu rol in recunoasterea si retrotranslocarea lor in citosol si in final in degradarea proteazomica a proteinelor incorect pliate marcate cu ubiquitina (13).

Studii recente realizate pe proinsulina mutanta (Akita) au aratat ca acesta este degradata in proteazom printr-o cale care implica HRD1 si SEL1L, ambele componente ale caii ERAD (14). Daca moleculele de proinsulina incomplet pliate ar fi indepartate intr-un mod similar, atunci calea ERAD ar putea controla indepartarea proinsulinei și/sau a secretiei din ER, cu consecinte asupra maturarii insulinei in veziculele secretorii si secretia insulinei.

EDEM1 (proteina 1 asemanatoare cu alfa-manozidaza care creste degradarea in RE) apartine familiei de proteine EDEM, manozidaze din RE, cu un nivel de expresie crescut de stresul din RE (15, 16). In ciuda faptului ca rolul EDEM1 ca si componenta ERAD a fost bine documentat, mecanismul prin care EDEM1 induce o accelerare a degradarii proteinelor incorect pliate nu este complet elucidat. EDEM1 interactioneaza in principal cu proteine care nu reusesc sa se plieze corect si sunt respinse de controlul calitatii din RE si directionate pentru dislocare din ER. Asocierea EDEM1 cu SEL1L / HRD1 si alte componente ale disloconului are rolul de a facilita eliminarea proteinelor incorect pliate din RE pentru degradarea proteazomala (17). Este necesara cresterea expresiei EDEM1 pentru modularea caii ERAD, fiind implicata in degradarea proteinelor glicozilate cat si a celor neglicozilate (17-20). Majoritatea raportarilor se bazeaza pe cercetarea proteinelor exogene incorect pliate si doar cateva substrate endogene au fost raportate pana in prezent, incluzand MHC clasa I si tirozinaza, enzima cheie in pigmentare (21-23). Impreuna cu rata de injumatatire rapida, aceasta sustine o functie pentru EDEM1 in reglarea fina de la nivelulul RE si un rol mai redus in coordonarea caii ERAD.

Problema pe care o rezolva aceasta inventie este tratarea, controlul si prevenirea diabetului si a bolilor metabolice inrudite prin utilizarea unei terapii inovatoare care induce cresterea secretiei de insulina si scaderea concentratiei de glucoza din sange.

Avantajele aplicarii acestei inventii sunt:

- Terapia descrisa in acest brevet de inventie a fost testata pe culturi celulare de insulinom de soarece
- Terapia descrisa in acest brevet de inventie a fost testata pe insule primare umane
- Terapia descrisa in acest brevet de inventie a fost testata pe model diabetic animal
- Terapia descrisa in acest brevet de inventie poate contribui la descoperirea defectelor in diabetul zaharat si elucidarea mecanismelor moleculare prin care putem modula cresterea secretiei de insulina

- Terapia descrisa in acest brevet de inventie poate fi folosita cu succes si datorita faptului ca EDEM1 poate oferi protectie fata de bolile neurodegenerative si nu produce toxicitate in organisme precum *Drosophila* si *C.elegans*.

Terapia, conform inventiei poate fi folosita pentru imbunatatirea raspunsului celulelor β -pancreatice la stimuli precum glucoza. In prezenta de EDEM1 celulele sintetizeaza si secreta o cantitate de aproximativ 3 ori mai mare, comparativ cu celule control.

Terapia, conform inventiei, poate fi folosita pentru tratarea diabetului zaharat indus cu streptozocina in soareci, scazand concentratia de glucoza din sange si crescand secretia de insulina.

Pentru validarea terapiei au fost realizate experimente in trei sisteme biologice diferite. Nivelul de expresie al EDEM1 a fost crescut in celule de insulinom de sobolan, in insule pancreatice umane si in model diabetic animal (sobolani Wistar). Rolul EDEM1 a fost demonstrat si prin scaderea nivelului de expresie EDEM1 in sistem celular unde rezultatele au aratat o scadere dramatica a sintezei si secretiei de insulina. In paralel au fost realizate experimente in care s-a demonstrat ca EDEM1 transdus stabil in celule este functional si isi exercita functia consacrata, de accelerare a degradarii proteazomale a proteinelor incorect pliate. In acest caz s-a folosit proteina $\alpha 1$ -antitripsina mutanta "null Hong Kong (NHK), cunoscuta ca fiind substrat ERAD.

In model animal, terapia a fost validata prin testul tolerantei la glucoza realizat dupa inducerea diabetului si prin monitorizarea glicemiei si nivelul de expresie al insulinei.

Metoda, conform inventiei, prezinta urmatoarele proprietati:

- creste sinteza si secretia de insulina in celule de insulinom de sobolan
- creste sinteza si secretia de insulina in insule pancreatice umane
- creste toleranta la glucoza, secretia de insulina si scade glicemia din sange in model diabetic animal
- poate fi folosita pentru tratarea, controlul si terapia diabetului

Se dau, in continuare, noua exemple de realizare a inventiei, in legatura si cu figurile 1...6, care reprezinta:

Fig.1 Supraexpresia EDEM1 creste sinteza si secretia de insulina in celule de insulinom. Celule INS-1 Control si celule INS-1 ce exprima stabil EDEM1 au fost insamantate cu 48h inainte de stimularea cu glucoza. Dupa infometare in mediu RPMI 1640 , fara glucoza, pentru

2h, celulele au fost expuse la concentratie crescatoare de glucoza (2.8mM, 14 mM si 28 mM), pentru 24h. A) Celulele si mediul de secretie au fost analizate prin Western blot, folosind anticorpi specifici pentru insulina si EDEM1. B) Secretia de insulina a fost cuantificata prin metoda ELISA. C) Celulele au fost fixate, permeabilizate si incubate alternativ cu anticorpi specifici pentru peptidul C (verde), insulina (verde) si EDEM1 (rosu), urmata de incubarea cu anticorpi secundari cuplati cu Alexa Fluor si FITC. Nucleii sunt marcati cu DAPI, iar imaginile suprapuse sunt reprezentate in partea dreapta a figurii.

Fig.2 Scaderea expresiei EDEM1 reverseaza efectul de crestere a secretiei de insulina in celule INS-1. Celule INS-1 transduse sa exprime fie secvente nonsens shRNA, fie secvente specifice pentru a tinti in gena EDEM1 au fost cultivate 48h inainte de starvarea in mediu fara glucoza si apoi stimulate cu 2.8mM, 14mM si 28 mM glucoza, 24h. A) Lizatele si mediu de cultura au fost analizate prin Western blot si imunoblotate cu anticorpi anti- α 1AT, anti-insulina si anti-EDEM1. B) Secretia de insulina a fost analizata prin metoda ELISA. C) Celulele au fost fixate si analizate prin imunofluorescenta confocala folosind anticorpi anti-insulina (verde) si anti-EDEM1 (rosu).

Fig.3. EDEM1 activeaza ERAD si induce degradarea proteinelor incorrect pliate. Celule INS-1-Control si INS-1-EDEM1, stimulate cu 14 mM glucoza au fost transfectate cu α 1-antitripsina WT (α 1AT) si mutanta nula a α 1-antitripsina, NHK. Dupa 24h de la transfectie, celulele au fost lizate si separate in gel de poliacrilamida (Tris/Tricine SDS-PAGE). Proteinele au fost transferate pe membrana de nitroceluloza si imunoblotate cu anticorpi specifici anti- α 1AT, EDEM1 si proinsulina. Tubulina a fost folosita drept control de incarcare in gelul de poliacrilamida.

Fig.4 EDEM1 protejeaza celula β - pancreatica de stresul cronic indus cu glucoza si imbunatateste procesarea proinsulinei si secretia insulinei. Celule INS-1 si INS-1-EDEM1 au fost insamnatate cu 24h inainte de stimularea cu glucoza (2.8mM, 14mM si 28 mM) si incubate pentru inca 24h si 48h. Celulele au fost analizate prin Western blot si proteinele p-IRE1 si eiF2a au fost identificate cu anticorpi specifici.

Fig.5 Transductia EDEM1 in insule pancreatice primare umane creste stimularea secretiei de insulina cu glucoza. Insule primare umane au fost infectate cu un sistem lentiviral ce codifica pentru proteina EDEM1 si comparate cu celule infectate cu vector

control. Insulele au fost pre-incubate peste noapte in mediu cu 2.8 mM glucoza, ziua urmatoare au fost stimulate cu 14 mM glucoza, pentru 24h. A) Lizatele si mediu de cultura au fost analizate prin metoda Western blot pentru determinarea insulinei si proteinei EDEM1. B) Insulina intra si extra-celulara a fost cuantificata prin metoda ELISA. C) Prin metoda de imunofluorescenta cu microscop confocal insulina (verde) si proteina EDEM1 (rosu) au fost marcate.

Fig.6 Efectul terapiei cu EDEM1 in model diabetic animal. Testul de toleranta la glucoza a fost realizat imediat dupa inducerea diabetului cu streptozocina si dupa tratament. A) A fost injectata intraperitoneal glucoza (1g/kg corp) in toate loturile de animale, urmata de monitorizarea glicemiei la momentul 0,30,60,90 si 120 de minute, de la administrare. B) Animalele au fost sacrificate la sfarsitul experimentului. Pancreasul a fost colectat, lizat si analizat prin metoda Western blot, folosind anticorpi anti- proinsulina si anti-EDEM1. C) Concentratia insulinei din ser s-a determinat prin metoda ELISA. D) Glucoza din sange a fost determinata zilnic, incepand cu prima zi de la inducerea diabetului si pana in ziua 9 de tratament.

Exemplul 1: Obținerea liniilor stabile ce prezintă expresie crescută de EDEM1

Supraexpresia EDEM1 in linia celulara INS-1E a fost obtinuta utilizand un sistem retroviral folosind plasmida de ambalare pCL-Ampho (Imgenex) si vectorul de expresie pLPCX (Clontech). Vectorii de expresie pLPCX si pLPCX-EDEM1 au fost generati prin clonarea ADNc al EDEM1 in vectorul retroviral pLPCX. Celule HEK293T au fost transfectate tranzitoriu, fie cu vectorul de control pLPCX, fie cu pLPCX-EDEM1 impreuna cu plasmida de ambalare (pCL-Ampho) si folosind polietilenimina. La 24 de ore dela transfectie s-a adaugat mediu proaspat si dupa 24h de incubare s-a colectat mediul continand particule retrovirale. Mediul a fost apoi centrifugat la 3000xg timp de 5 minute la 4°C si trecut printr-un filtru de 45 µm. Celulele INS-1 au fost incubate in mediu continand particulele retrovirale si polibren. Apoi celulele au fost incubate in mediu ce contine antibioticul de selectie, puromicina. S-a obtinut o cultura heterogena ce contine celule cu expresie diferita de EDEM1. Selectia clonelor pozitive pentru EDEM1 a presupus sortarea celulelor pornind de la o singura celula utilizand metoda de dilutie in serie. Fiecare celula va dezvolta o clona. Nivelul de expresiei al EDEM1 in cultura heterogena si in clonele selectate a fost verificat prin metoda Western Blot.

Exemplul 2. Obținerea liniilor stabile ce prezintă expresie scăzută de EDEM1

Pentru obținerea linii celulare cu expresie scăzută de EDEM1, celule INS-1 au fost transfectate cu patru secvențe diferite de ARN, care să tintească în gena EDEM1 și o secvență shRNA, drept control negativ. Celulele au fost selectate și verificate după metoda folosită mai sus.

Exemplul 3. Stimularea secreției de insulină cu glucoza

Pentru determinarea ratei de secreție a insulinei, ca răspuns la stimularea cu concentrații diferite de glucoză, celulele au fost însemantate în placa de 6 godeuri. După 48 ore celulele au fost private de glucoză timp de 2 ore și apoi stimulate timp de 24 ore cu glucoză (2.8 mM, 14 mM și 28 mM). Mediul a fost colectat și centrifugat la 720xg, timp de 5 minute, pentru îndepărtarea celulelor detașate. Insulina secretată a fost cuantificată prin ELISA și Western Blot. Mediul a fost normalizat la concentrația totală de proteină, determinată prin metoda cu acid bicinoninic (BCA, Bicinchoninic Acid protein assay).

Exemplul 4. Microscopia confocală de imunofluorescență

Imunofluorescența este o tehnică de investigare a proteinelor care se bazează pe reacția antigen-anticorp. Celulele INS-1E și insulele umane au fost atașate de un suport solid (lamela), cu 48 ore înainte de a fi stimulate cu 14 mM glucoză, timp de 24h. Celulele au fost spălate cu PBS, fixate, permeabilizate și incubate cu anticorpi anti-insulină, anti-peptid C (C-PEP). Excesul de anticorpi nelegati a fost îndepărtat prin spălare cu PBS, urmat de incubarea cu anticorpi conjugați cu Texas Red sau FITC. Nucleii au fost marcați cu DAPI și probele au fost examinate cu un microscop confocal LSM710 și software-ul Zen2010 (Carl Zeiss).

Exemplul 5. Analiza Western Blot

Western blot este o tehnică prin care se pot identifica specific proteine dintr-un amestec complex. Metoda presupune separarea proteinelor în gel de poliacrilamidă în funcție de masă moleculară, transferul proteinelor pe un suport solid (nitroceluloză) și marcarea proteinelor de interes prin reacția imună antigen-anticorp. Celulele INS-1 și insule umane au fost lizate și concentrația totală de proteine a fost determinată prin metoda (BCA). Aceeași cantitate de proteină totală a fost separată în gel de poliacrilamidă, transferată pe membrana de nitroceluloză și incubată cu anticorpi primari, urmată de incubarea cu anticorpi secundari

conjugati cu HRP. Benzile imunoreactive au fost vizualizate utilizand un sistem de detectie a chemiluminiscentei amplificate (enhanced chemiluminescence, ECL).

Exemplul 6. Demonstrarea functionalitatii EDEM1 in sistemul celular folosit

Proteina EDEM1 este componenta a sistemului ERAD cu functie in recunoasterea si accelerarea degradarii proteinelor incorect pliate prin calea de degradare asociata RE. Folosind ca model proteina mutanta de $\alpha 1$ anti-tripsina, NHK s-a demonstrat ca EDEM1 este functional in sistemul celular folosit. $\alpha 1$ AT (WT) si forma ei mutanta au fost transfectate tranzient in celule INS-1-Control si INS-1-EDEM1. 24h de transfectie celulele au fost recoltate si analizate prin metoda Western Blot folosind anticorpi specifici pentru $\alpha 1$ AT, EDEM1 si proinsulina. Rezultatele obtinute au aratat ca, in celule INS-1-EDEM1 este accelerata degradarea proteinei NHK, in timp ce expresia proinsulinei este crescuta. In aceste conditii am aratat ca, pe substrate cunoscute ERAD, functia EDEM1 este intacta.

Exemplul 7. EDEM1 protejeaza celula β -pancreatica de stresul cronic din RE indus cu glucoza

Stimularea secretiei de insulina cu concentratie crescuta de glucoza si pentru un timp indelungat duce la stres in reticulul endoplasmic si activarea mecanismelor celulare de aparare, inrudite cu raspunsul la stresul din RE. Raspunsului proteinelor la stresul din RE este caracterizat de activarea PERK (protein-kinase-RNA (PKR) like ER kinase si reducerea translatiei proteinelor prin fosforilarea factorului eif2 α), activarea IRE-1 (inositol-requiring 1) / XBP-1 (X-box-binding-protein) si reducerea incarcaturii RE prin cresterea nivelului de expresiei al proteinelor tinta si degradarea proteinelor nepliate sau incorect pliate si activarea ATF6 (factorul de transcriptie 6) prin cresterea expresiei proteinelor chaperon din RE si, ulterior, cresterea capacitatii de pliere a RE. Celule INS-1-Control si INS-1-EDEM1 au fost infometate pentru 2h, in mediu RPMI 1640, fara glucoza, apoi stimulate 2.8mM, 14mM si 28mM glucoza, pentru 24h sau 48h. Celulele au fost recoltate si analizate prin metoda Western blot, pentru determinarea proteinelor senzori la stres (IRE1 si eif2 α). In conditii de supraexpresie de EDEM1 a fost identificata o scadere a expresiei proteinelor IRE-1 si eif2 α si s-a corelat cu un nivel crescut de proinsulina si insulina. In concluzie, supraexpresia EDEM1 protejeaza celulele beta pancreatice INS-1 de stresul din RE si reuseste sa produca si sa secrete o cantitate crescuta de insulina, fiind astfel o posibila strategie viabila in tratamentul diabetului.

Exemplul 8. Demonstrarea rolului fiziologic al EDEM1 in insule primare umane

Insulele pancreatice umane au fost cultivate conform protocolului descris de Prodo Laboratories Inc. Pentru verificarea efectului EDEM1 asupra insulinei in sistem celular uman, acestea au fost transduse cu lentivirus pLPCX si pLPCX-EDEM1. Secretia insulinei a fost stimulata cu 14 mM glucoza. Atat mediul de cultura cat si insulele au fost analizate prin metoda Western blot pentru verificarea randamentului de transductie si a efectului EDEM1 asupra insulinei. Cuantificarea insulinei intra si extracelulara s-a realizat prin metoda ELISA. Distributia subceluara a insulinei si EDEM1 a fost realizata prin microscopie confocala. Rezultatele obtinute prin cele trei metode au aratat ca atat insulina intracelulara cat si cea extracelulara era crescuta in prezenta EDEM1.

Exemplul 9. Rolul fiziologic al EDEM1 in model diabetic animal

Pentru investigarea rolului fiziologic al proteinei EDEM1, in model diabetic animal, proteina EDEM1 a fost supraexprimata si s-a urmarit efectul acesteia asupra homeostaziei glucozei. Streptozotocina (STZ) deregleaza functia celulele β -pancreatice anuland raspunsul celulelor la glucoza alterand nivelul de insulina din ser si crescand concentratia de glucoza. Studiile recente au aratat ca streptozotocina induce moartea celulelor β -pancreatice prin alchilarea ADN-ului. In acest studiu, inducerea diabetului cu streptozotocina (60 g / kg sobolan) s-a realizat la sobolani Wister. Animalele care au dezvoltat diabet au fost impartite in doua grupuri omogene: lotul de diabetici injectati cu vectorul fara insert (pLPCX) si lotul de diabetici injectat cu retrovirus pLPCX-EDEM1. Tratamentul a durat 9 zile si nivelul glucozei din sange a fost monitorizat zilnic, iar la sfarsitul tratamentului animalele au fost sacrificate. In clinica o metoda de investigare a diabetului este testul de toleranta la glucoza. Acesta s-a efectuat prin administrarea unei solutii de glucoza de 2g / kg corp si monitorizarea la momentul 0, 30, 60, 90 si 120 minute, de la administrare a raspunsului celulelor beta pancreatice pentru a scadea nivelul glicemiei apoi determinata glicemia din sangele animalelor. Insulina din ser a fost determinata la sfarsitul tratamentului prin metoda ELISA si Western blot. Nivelul insulinei a fost evaluat in ser prin metoda ELISA, unde s-a obtinut o crestere a insulinei in lotul de diabetici injectati cu EDEM1. Pentru verificarea transductiei proteinei EDEM1 in pancreas s-a realizat liza lor, separarea proteinelor in gel de poliacriamida si urmarita expresia proteinei EDEM1 prin Western blot. Expresia proteinei EDEM1 a fost crescuta semnificativ in lotul animalelor inhectate cu retrovirus pLPCX-EDEM1 comparativ cu lotul control (tratati

cu retrovirus pLPCX) sau lotul animalelor sanatoase. Monitorizarea nivelului glicemiei in cele trei loturi de animale (lotul I-Control, lotul II-pLPCX si lotul II-pLPCX-EDEM1) a aratat ca dupa 2 zile de tratament la grupul animalelor injectate cu pLPCX-EDEM1 nivelul glicemiei a inceput sa scada si s-a mentinut la valori normale pana la sfarsitul experimentului, in comparatie cu lotul de animale injectate cu pLPCX.

Acest studiu sugereaza ca proteina EDEM1 are un rol important in imbunatatirea functiei β -pancreatice, cresterea tolerantei la glucoza, cresterea capacitatii de secretie a insulinei si scaderea glicemiei din ser.

Bibliografie

1. Gold, G., Gishizky, M.L., and Grodsky, G.M. 1982. Evidence that glucose "marks" beta cells resulting in preferential release of newly synthesized insulin. *Science* 218:56-58.
2. Arvan, P., and Castle, D. 1998. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J* 332 (Pt 3):593-610.
3. Liu, M., Hodish, I., Rhodes, C.J., and Arvan, P. 2007. Proinsulin maturation, misfolding, and proteotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15841-15846.
4. Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253:2769-2776.
5. James, R., Niall, H., Kwok, S., and Bryand-Greenwood, G. 1977. Primary structure of porcine relaxin: homology with insulin and related growth factors. *Nature* 267:544-546.
6. Ellgaard, L., and Helenius, A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:181-191.
7. Orci, L., Ravazzola, M., Storch, M.J., Anderson, R.G., Vassalli, J.D., and Perrelet, A. 1987. Proteolytic maturation of insulin is a post-Golgi event which occurs in acidifying clathrin-coated secretory vesicles. *Cell* 49:865-868.
8. Orci, L., Halban, P., Amherdt, M., Ravazzola, M., Vassalli, J.D., and Perrelet, A. 1984. A clathrin-coated, Golgi-related compartment of the insulin secreting cell accumulates proinsulin in the presence of monensin. *Cell* 39:39-47.
9. Riahi, Y., Wikstrom, J.D., Bachar-Wikstrom, E., Polin, N., Zucker, H., Lee, M.S., Quan, W., Haataja, L., Liu, M., Arvan, P., et al. 2016. Autophagy is a major regulator of beta cell insulin homeostasis. *Diabetologia* 59:1480-1491.
10. Zuber, C., Fan, J.Y., Guhl, B., and Roth, J. 2004. Misfolded proinsulin accumulates in expanded pre-Golgi intermediates and endoplasmic reticulum subdomains in pancreatic beta cells of Akita mice. *FASEB J* 18:917-919.
11. Kaufman, R.J., Back, S.H., Song, B., Han, J., and Hassler, J. 2010. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum,

- prevent oxidative stress and preserve differentiation in beta-cells. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2:99-107.
12. Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7:766-772.
 13. Christianson, J.C., Shaler, T.A., Tyler, R.E., and Kopito, R.R. 2008. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol* 10:272-282.
 14. He, K., Cunningham, C.N., Manickam, N., Liu, M., Arvan, P., and Tsai, B. 2015. PDI reductase acts on Akita mutant proinsulin to initiate retrotranslocation along the Hrd1/Sel1L-p97 axis. *Mol Biol Cell* 26:3413-3423.
 15. Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P., and Paganetti, P. 2003. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* 299:1397-1400.
 16. Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I., and Nagata, K. 2003. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* 299:1394-1397.
 17. Cormier, J.H., Tamura, T., Sunryd, J.C., and Hebert, D.N. 2009. EDEM1 recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex. *Mol Cell* 34:627-633.
 18. Shenkman, M., Groisman, B., Ron, E., Avezov, E., Hendershot, L.M., and Lederkremer, G.Z. 2013. A shared endoplasmic reticulum-associated degradation pathway involving the EDEM1 protein for glycosylated and nonglycosylated proteins. *J Biol Chem* 288:2167-2178.
 19. Marin, M.B., Ghenea, S., Spiridon, L.N., Chiritoiu, G.N., Petrescu, A.J., and Petrescu, S.M. 2012. Tyrosinase degradation is prevented when EDEM1 lacks the intrinsically disordered region. *PLoS One* 7:e42998.
 20. Greenblatt, E.J., Olzmann, J.A., and Kopito, R.R. 2011. Derlin-1 is a rhomboid pseudoprotease required for the dislocation of mutant alpha-1 antitrypsin from the endoplasmic reticulum. *Nat Struct Mol Biol* 18:1147-1152.
 21. Petrescu, S.M., Petrescu, A.J., Titu, H.N., Dwek, R.A., and Platt, F.M. 1997. Inhibition of N-glycan processing in B16 melanoma cells results in inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome. *J Biol Chem* 272:15796-15803.
 22. Cioaca, D., Ghenea, S., Spiridon, L.N., Marin, M., Petrescu, A.J., and Petrescu, S.M. 2011. C-terminus glycans with critical functional role in the maturation of secretory glycoproteins. *PLoS One* 6:e19979.
 23. Guiliano, D.B., Fussell, H., Lenart, I., Tsao, E., Nesbeth, D., Fletcher, A.J., Campbell, E.C., Yousaf, N., Williams, S., Santos, S., et al. 2014. Endoplasmic reticulum degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1 targets misfolded HLA-B27 dimers for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Arthritis Rheumatol* 66:2976-2988.

Revendicari

1. Metoda de tratament a diabetului si bolilor metabolice inrudite constand din administrarea genei EDEM1.
2. Metoda, conform revendicarii 1, in care gena EDEM1 este administrata cu un sistem lentiviral care permite supraexpresia tranzienta a proteinei EDEM1.
3. Metoda, conform revendicarii 1, in care gena EDEM1 este administrata cu un sistem care permite integrarea stabila a genei EDEM1 in genom.
4. Metoda de tratament a diabetului si bolilor metabolice inrudite constand din administrarea genei EDEM1 unui subiect care necesita tratament.
5. Metoda, conform revendicarii 4, in care gena EDEM1 este administrata cu un sistem lentiviral care permite supraexpresia tranzienta a proteinei EDEM1.
6. Metoda, conform revendicarii 4, in care gena EDEM1 este administrata cu un sistem care permite integrarea stabila a genei EDEM1 in genom.
7. Metoda pentru ameliorarea functiei insulelor primare pancreatice umane destinate transplantului constand in administrarea genei EDEM1.
8. Metoda, conform revendicarii 7, in care gena EDEM1 este administrata cu un sistem lentiviral care permite supraexpresia tranzienta a proteinei EDEM1.
9. Metoda, conform revendicarii 7, in care gena EDEM1 este administrata cu un sistem care permite integrarea stabila a genei EDEM1 in genom.
10. O compozitie pentru tratamentul starilor diabetice continand gena EDEM1.
11. O compozitie, conform revendicarii 1, continand gena EDEM1 livrata intr-un sistem care permite supraexpresia tranzienta a proteinei EDEM1.
12. O compozitie, conform revendicarii 1, continand gena EDEM1 livrata cu un sistem care permite integrarea stabila a genei EDEM1 in genom.
13. O compozitie, conform revendicarii 7, in care gena EDEM1 este administrata insulelor pancreatice cu un sistem care permite supraexpresia tranzienta a proteinei EDEM1.
14. O compozitie, conform revendicarii 7, in care gena EDEM1 este administrata insulelor pancreatice cu un sistem care permite integrarea stabila a genei EDEM1 in genom.

Fig.1

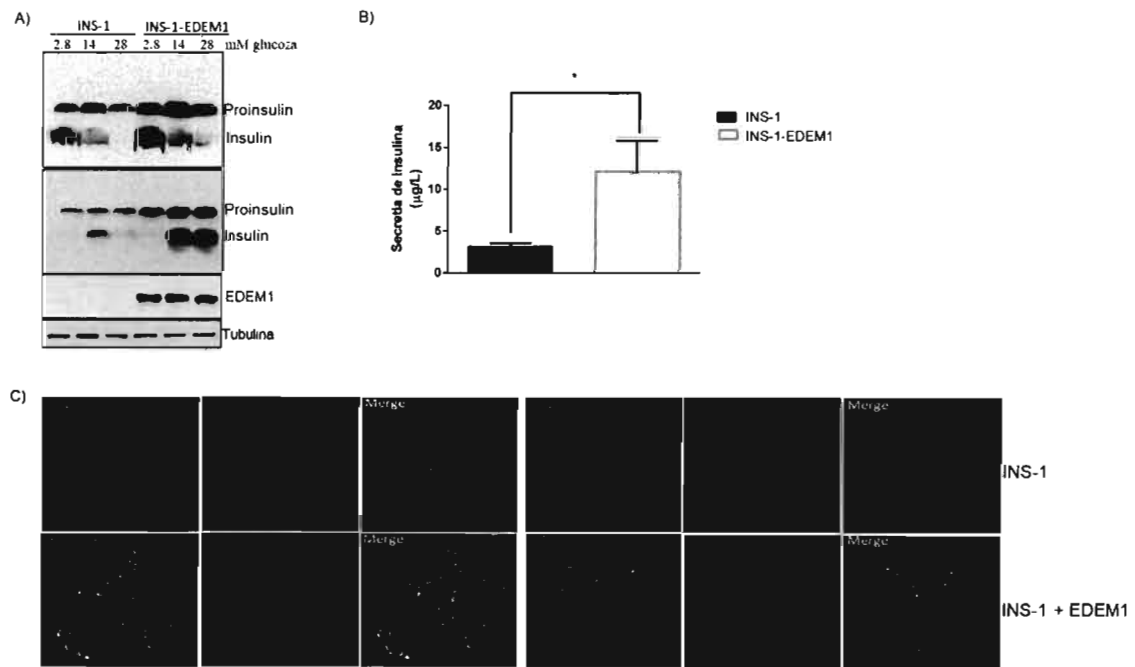


Fig.2

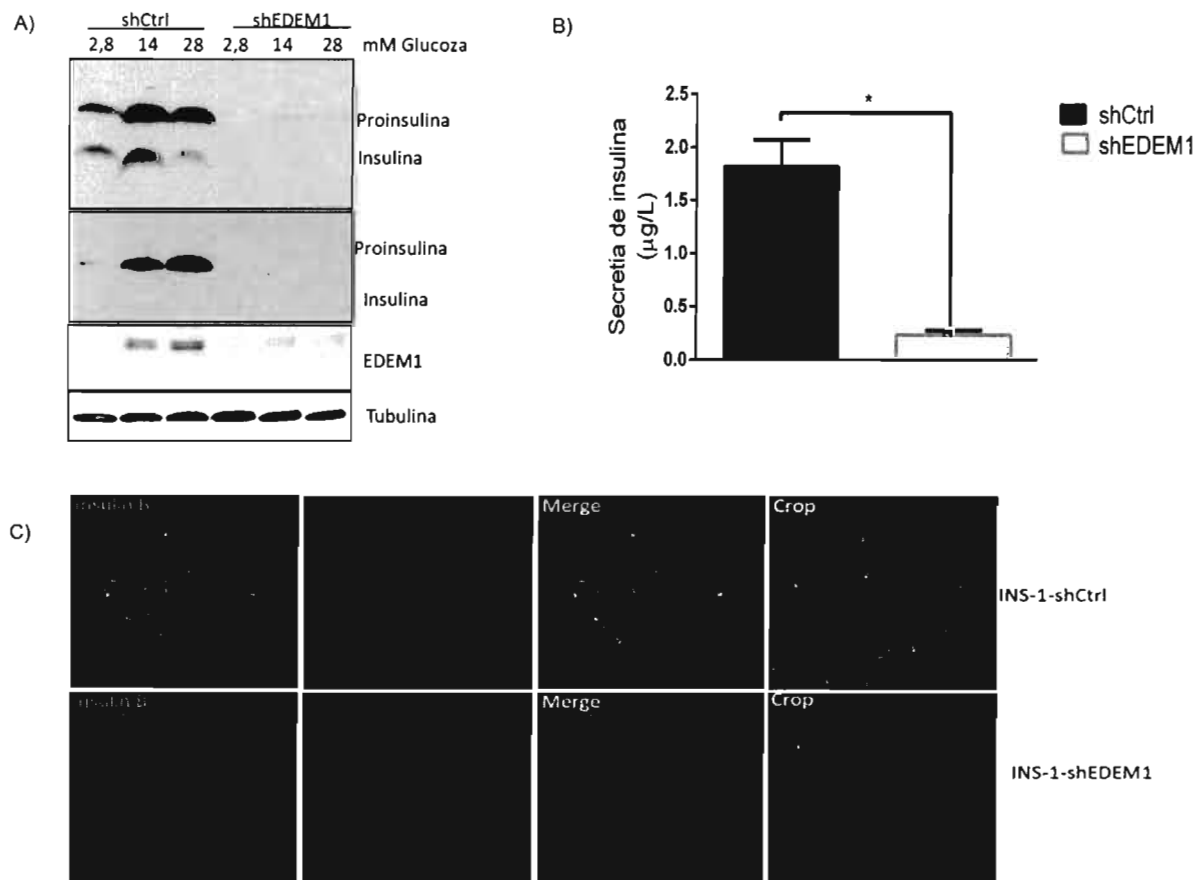


Fig.3

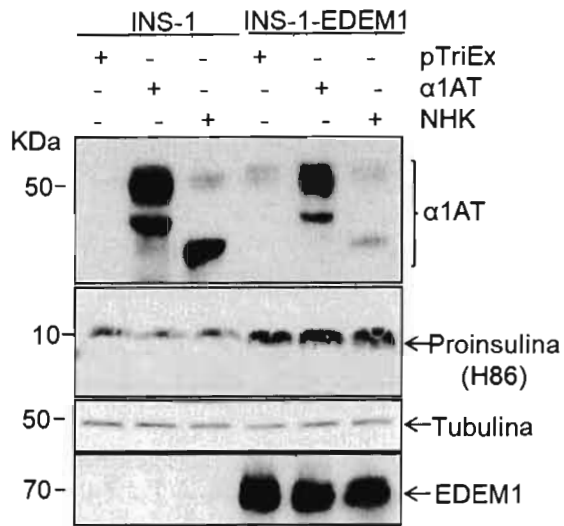


Fig.4

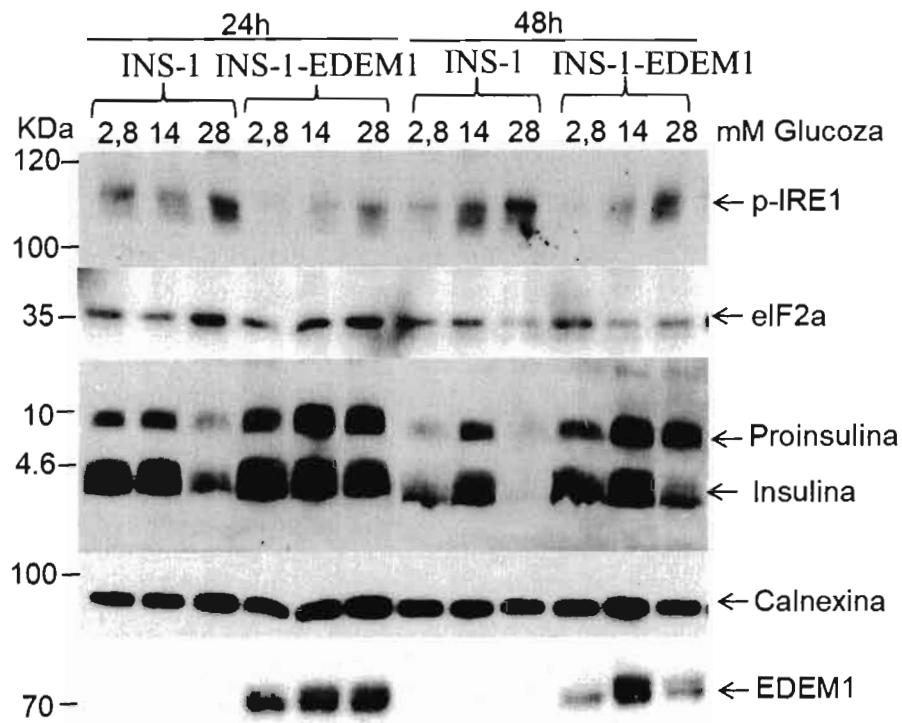


Fig.5

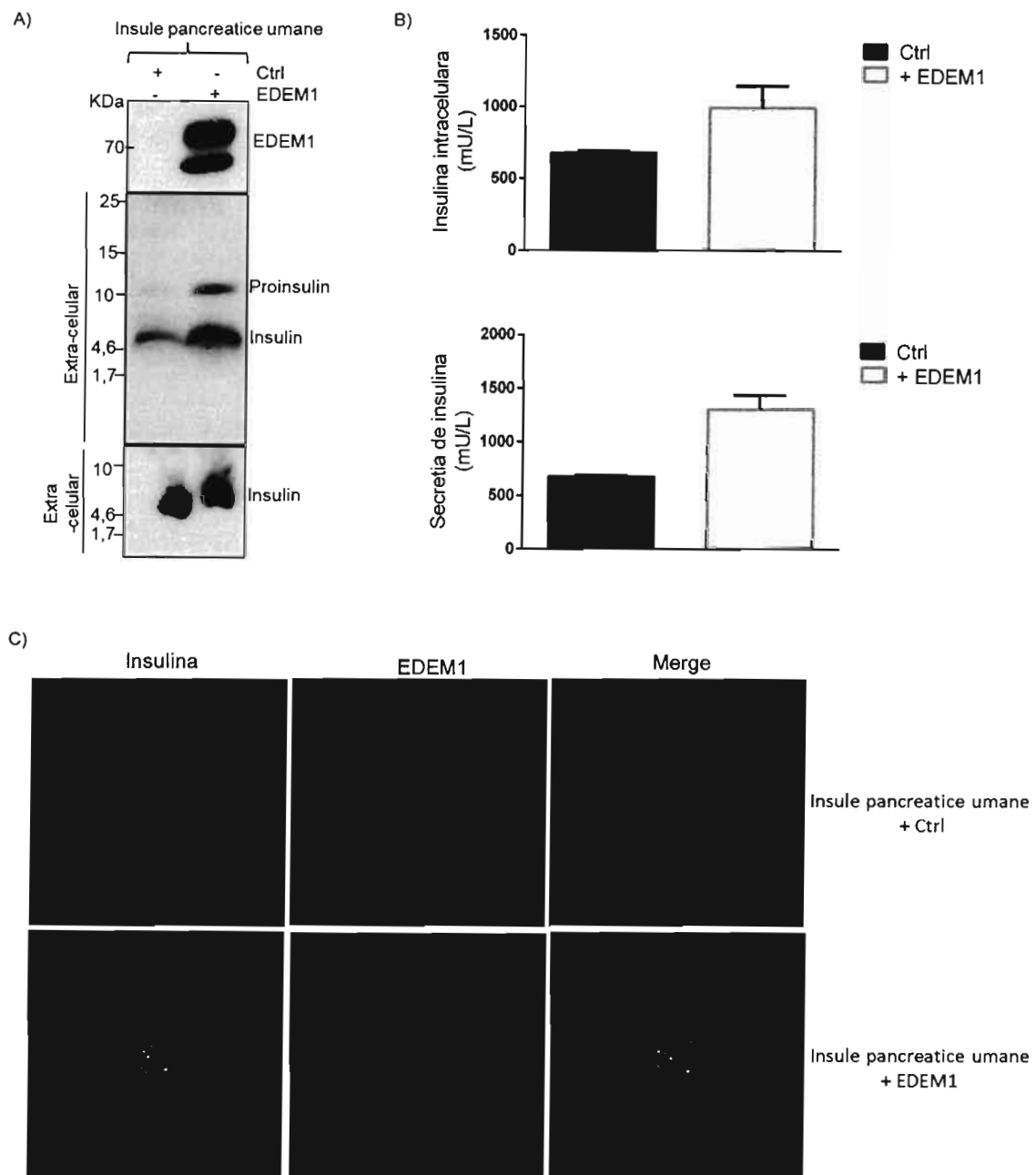
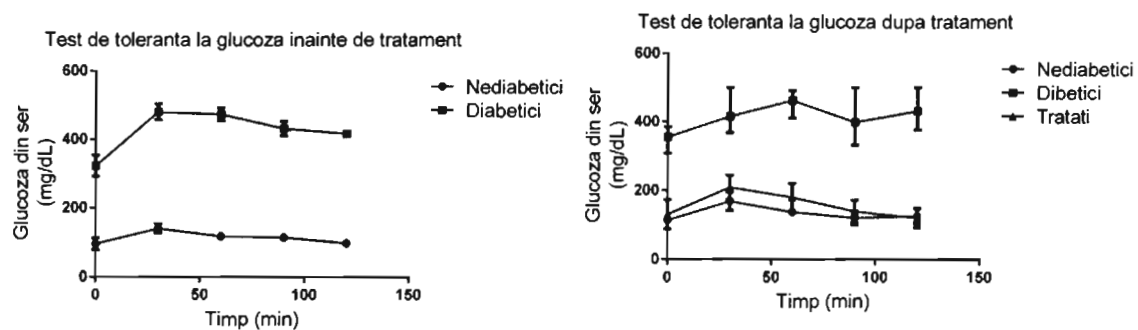
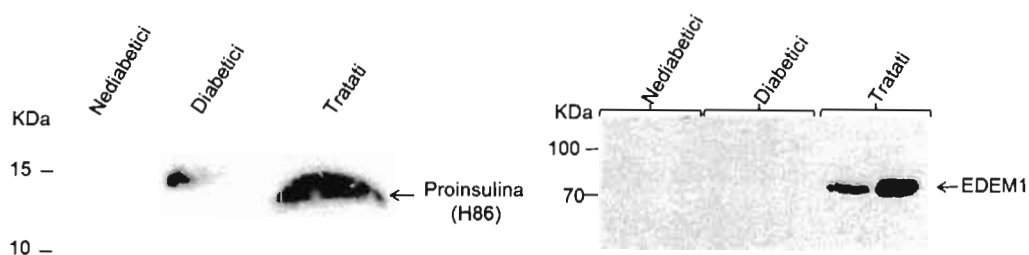


Fig.6

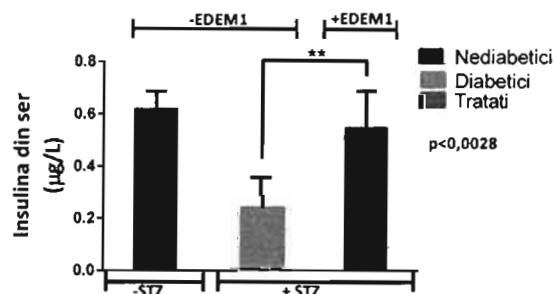
A)



B)



C)



D)

