



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**  
**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**  
**DOTTORATO IN BIOLOGIA, GENETICA UMANA E**  
**BIOINFORMATICA: BASI CELLULARI E MOLECOLARI DEL**  
**FENOTIPO-XXII CICLO**

**DIPARTIMENTO G.F. INGRASSIA**  
SEZIONE DI BIOLOGIA GENERALE, BIOLOGIA CELLULARE, GENETICA MOLECOLARE  
*G.SICHEL*  
UNITÀ DI BIOMEDICINA MOLECOLARE GENOMICA E DEI SISTEMI COMPLESSI,  
GENETICA, BIOLOGIA COMPUTAZIONALE

---

**Dott.ssa Laura Rita Duro**

---

**ANALISI DEL PROFILO DI ESPRESSIONE DEI**  
**MICRORNA IN CELLULE  $\alpha$  E  $\beta$  PANCREATICHE DI**  
**TOPO DOPO TRATTAMENTO CON CITOCHINE**

**Tesi di Dottorato**

---

Coordinatore e Tutor:  
Chiar.mo Prof. MICHELE PURRELLO

---

**Anno Accademico 2009 - 2010**

# INDICE

<b>Riassunto</b> .....	Pag. 1
<b>Introduzione</b> .....	Pag. 4
Il Diabete Mellito.....	Pag. 4
Epidemiologia .....	Pag. 7
Diabete Mellito di Tipo 1 (T1DM o IDDM).....	Pag. 10
<i>Genomica</i> .....	Pag. 12
<i>Patogenesi</i> .....	Pag. 15
Diabete Mellito di Tipo 2 (T2DM o NIDDM).....	Pag. 18
Le cellule $\alpha$ in condizioni fisiologiche e nel Diabete .....	Pag. 21
Le cellule $\beta$ in condizioni fisiologiche e nel Diabete.....	Pag. 25
Diabete e Apoptosi .....	Pag. 31
Le citochine .....	Pag. 34
Meccanismi molecolari nella distruzione mediata dalle citochine delle $\beta$ cellule.....	Pag. 36
Citochine pro-infiammatorie e apoptosi .....	Pag. 44
Nuovi regolatori dell'espressione genica.....	Pag. 45
<i>I microRNA</i> .....	Pag. 45
<i>Biogenesi dei microRNA</i> .....	Pag. 46
<i>Meccanismo d'azione dei microRNA</i> .....	Pag. 51
<i>Organizzazione genomica dei microRNA</i> .....	Pag. 54
Disfunzioni nella regolazione dei microRNA.....	Pag. 55

---

microRNA nel Diabete.....	Pag. 57
<b>Materiali e Metodi</b> .....	Pag. 64
Colture cellulari e trattamento con <i>cocktail</i> di citochine .....	Pag. 64
Estrazione di RNA e <i>Real-Time</i> PCR .....	Pag. 64
Analisi dei dati di espressione.....	Pag. 71
Analisi statistica .....	Pag. 71
Predizione dei <i>targets</i> dei microRNA, costruzione delle <i>networks</i> e analisi delle <i>pathways</i> alterate .....	Pag. 72
<b>Risultati</b> .....	Pag. 74
Induzione di apoptosi nelle linee cellulari $\alpha$ TC1 e $\beta$ TC1 .....	Pag. 74
Analisi del trascrittoma a <i>steady state</i> e dopo trattamento con citochine .....	Pag. 74
<i>Targets</i> dei microRNA e analisi delle <i>networks</i> .....	Pag. 85
<b>Discussione</b> .....	Pag. 90
<b>Conclusioni</b> .....	Pag. 97
<b>Bibliografia</b> .....	Pag. 99
<b>Ringraziamenti</b> .....	Pag. 122

# Riassunto

## Premessa

I microRNA occupano una posizione gerarchicamente critica nella regolazione delle *networks* cellulari e sono quindi candidati di rilievo per un coinvolgimento patogenetico in patologie sistemiche, quali le neoplasie e le malattie degenerative. Di conseguenza, queste molecole sono concordemente ritenute i biomarcatori di nuova generazione più promettenti per la diagnosi, per la prognosi ed il disegno di interventi terapeutici innovativi: è facile ipotizzare che la disponibilità di batterie di microRNA, ben caratterizzati dal punto di vista molecolare, strettamente associati alla patologia di interesse, e presenti nel siero, dovrebbe modificare in modo radicale le modalità operative e le prospettive di successo nell'ambito della Medicina clinica.

Obiettivo del nostro lavoro è stato quello di contribuire alla caratterizzazione del ruolo dei microRNA nella patogenesi del Diabete Mellito (DM), ed identificare e caratterizzare un *set* di microRNA da utilizzare quali biomarcatori molecolari e potenziali bersagli terapeutici di tale patologia, la cui incidenza è aumentata a livello mondiale a tal punto da giustificare l'utilizzo del termine "epidemia". Nonostante un'estesa bibliografia, è evidente che le basi molecolari del DM non sono state sufficientemente studiate a livello di sistema.

## Materiali e Metodi

Abbiamo sfruttato un sistema modello che mima gli eventi infiammatori occorrenti *in vivo* in pazienti diabetici. In particolare abbiamo analizzato il trascrittoma di 518 microRNA in cellule  $\alpha$  e  $\beta$  pancreatiche murine ( $\alpha$ TC1 e  $\beta$ TC1), mediante analisi *High Throughput* (HT) effettuata con *TaqMan Low Density Arrays* per la PCR *Real-Time*. Le cellule sono state analizzate sia a *steady state* che dopo induzione di apoptosi con un *cocktail* di citochine (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) per diversi tempi di esposizione (24h e 48h).

Sono stati considerati differenzialmente espressi (DE) i microRNA che presentavano variazioni nell'espressione (*Fold change*) di almeno 3 volte (verso

l'alto o verso il basso) nei trattati rispetto ai relativi controlli ( $FC \geq 3$  o  $\leq 0.33$ , equivalente a  $LN FC \geq +1$  e  $LN FC \leq -1$ ) e comuni a tre controlli endogeni (snoRNA135, snoRNA202 e MammalU6). I microRNA differenzialmente espressi ottenuti sono stati ulteriormente filtrati effettuando un *Paired T-Test*.

Una successiva analisi *in silico* ci ha permesso di individuare i *targets* predetti e validati dei miRNA DE.

## Risultati e Discussione

Le nostre analisi hanno permesso di verificare che l'esposizione prolungata e ad alte concentrazioni delle linee cellulari murine di glucagonoma ( $\alpha$ TC1) e di insulinoma ( $\beta$ TC1) al *cocktail* di citochine pro-infiammatorie induce marcati cambiamenti nell'espressione dei microRNA rispetto a quanto avviene nelle stesse cellule in condizioni non perturbate ed in misura maggiore nelle  $\beta$ TC1 piuttosto che nelle  $\alpha$ TC1. Abbiamo identificato, nel complesso, il 6,18% (32/518) di microRNA con espressione significativamente alterata in entrambe le linee cellulari (tra questi il miR-146a, il miR-21 e il miR-34a risultano essere già noti in letteratura come coinvolti nel processo di secrezione insulinica nelle  $\beta$  cellule e nella loro proliferazione e apoptosi).

Nelle  $\alpha$ TC1 sono risultati differenzialmente espressi 12 miRNA, di cui 4 risultano essere specifici del *time point* a 24h, 6 del *time point* a 48h, e 2 presentano una disregolazione costante durante l'intero *time course*. Nelle  $\beta$ TC1 mostrano espressione differenziale 25 miRNA, di cui 2 risultano essere specifici del *time point* a 24h, 13 del *time point* a 48h, e 10 mostrano un'espressione alterata sia a 24h che a 48h. La costante disregolazione nei due *time point* suggerisce che tali miRNA possano avere un importante ruolo nella cascata di segnali scatenata dalle citochine. Considerando l'intero *time course* si nota che 7 miRNA sono alterati in maniera specifica nelle  $\alpha$ TC1, 20 nelle  $\beta$ TC1 e 5 (miR-125b-5p, miR-146a, miR-155, miR-203 e miR-21) sono sovraespressi in entrambi i fenotipi cellulari. L'induzione di miRNA sia nelle  $\alpha$ TC1 che nelle  $\beta$ TC1 potrebbe rappresentare un meccanismo fisiologico di risposta all'azione delle citochine comune fra due fenotipi cellulari che condividono la stessa origine endodermica.

La nostra attenzione si è rivolta in modo particolare ai miRNA che presentano un'importante alterazione dell'espressione in una linea rispetto all'altra, considerando anche il confronto tra i due fenotipi cellulari a *steady state*; maggiore importanza è stata data ai microRNA che mostrano variazione di espressione di segno opposto nelle due linee cellulari dopo trattamento, e livelli di espressione opposti nella stessa linea cellulare prima e dopo l'esposizione a citochine. Da questo punto di vista miR-216a, miR-216b e miR-217 rappresentano microRNA particolarmente interessanti sui quali svolgere esperimenti di genomica funzionale ai fini di verificare un possibile coinvolgimento nel Diabete Mellito (in letteratura non è attualmente riportata alcuna correlazione tra questi miRNA e la malattia).

Inoltre alcuni tra i *targets* predetti e validati dei DE miRNA ottenuti mediante analisi *in silico* sono risultati appartenere al *set* di geni di seconda classe candidati per il Diabete ottenuto in un lavoro recentemente completato dal nostro gruppo di ricerca [Barbagallo *et al.*, in preparazione]: tra questi Stat3 (bersaglio dei miR-125b-5p e miR-21) e Bbc3, *target* del miR-148a.

## Conclusioni

I nostri dati hanno descritto per la prima volta l'assetto molecolare dei microRNA nelle  $\alpha$  cellule pancreatiche dopo loro esposizione ad un *cocktail* di citochine pro-infiammatorie, oltre che gettare le basi per una migliore comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della morte delle  $\beta$  cellule.

Prospettive future di questo lavoro sono: l'identificazione delle alterazioni di *pathways* e *networks* coinvolte dopo trattamento delle cellule *in vitro*; la validazione dei più credibili tra i microRNA candidati mediante trasfezione di anti- o di pre-miRNA per determinarne il silenziamento o l'attivazione funzionale. Mediante l'integrazione dei dati ottenuti verrà prodotta una lista completa di microRNA, dei loro potenziali bersagli proteici e delle *pathways* coinvolte nell'alterazione del fenotipo cellulare e molecolare delle cellule  $\alpha$  e  $\beta$  pancreatiche, in un sistema *in vitro* che riproduce in modo credibile le condizioni che si verificano *in vivo* nei pazienti durante l'insorgenza del Diabete Mellito.

# Introduzione

## Il Diabete Mellito

Il Diabete Mellito (DM) è una sindrome dismetabolica, derivante da una combinazione di fattori genetici e ambientali, diffusa a livello mondiale a tal punto da giustificare l'utilizzo del termine "epidemia": secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ne soffrono almeno 171 milioni di persone nel mondo [1-4].

Tenuto conto del drammatico impatto che il Diabete ha sulla salute pubblica (è associato frequentemente a complicanze micro- e macrovascolari che aumentano nei pazienti il rischio di infarto, insufficienza renale e cardiaca, ictus, cecità), la definizione di nuovi metodi che predicano il manifestarsi della malattia e la presenza di sue complicanze invalidanti merita la massima priorità [5].

L'aspetto fenotipico più evidente del Diabete è l'iperglicemia (Tabella 1).

	<b>IDEALE</b>	<b>ACCETTABILE</b>	<b>SCADENTE</b>
	<b>(mg/dl)</b>	<b>(mg/dl)</b>	<b>(mg/dl)</b>
<b>A digiuno</b>	60 – 110	110 - 130	> 130
<b>Postprandiale (1h)</b>	< 150	150 - 180	> 180
<b>Postprandiale (2h)</b>	< 130	130 - 150	> 150
<b>Postprandiale (3h)</b>	< 110	110 - 130	> 130

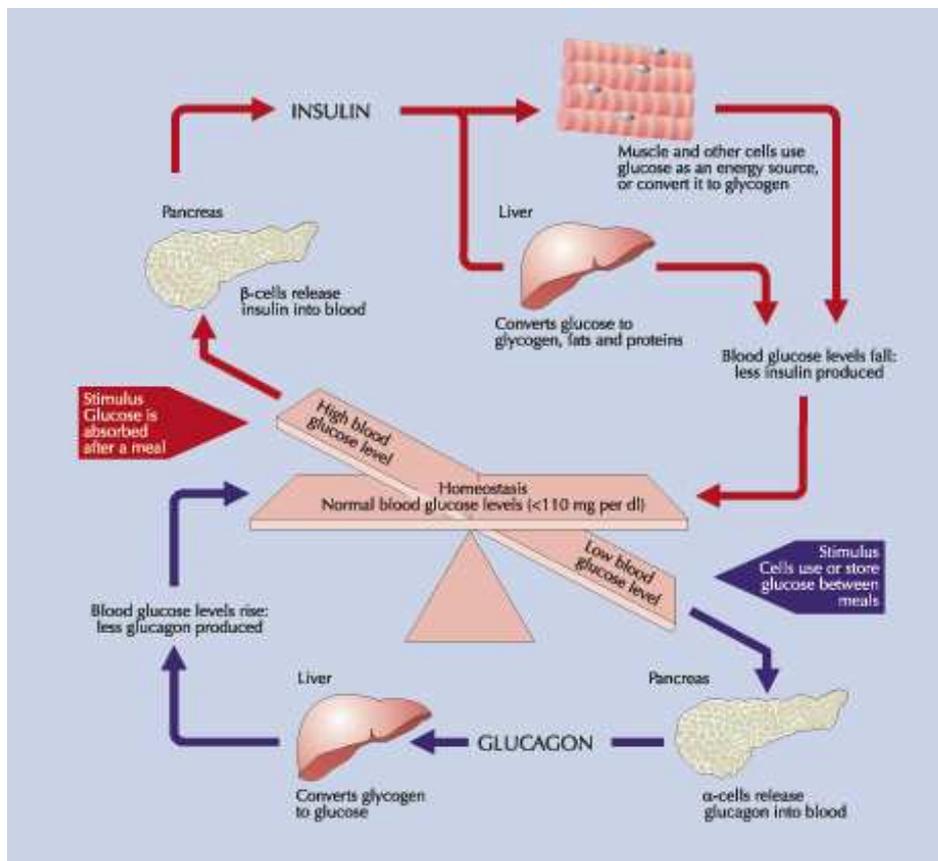
**Tabella 1 - Gradi di controllo glicometabolico (Tratta da [6]).**

Il mantenimento di appropriati livelli di glucosio ematico deriva da un corretto bilancio tra la secrezione dell'insulina, ormone polipeptidico secreto dalle  $\beta$  cellule pancreatiche, e del glucagone, secreto dalle  $\alpha$  cellule pancreatiche, e dalla loro azione a livello dei tessuti bersaglio.

L'insulina rappresenta un fattore chiave nel controllo dell'intero metabolismo corporeo. In condizioni fisiologiche, tale ormone prodotto in risposta ad un

aumento post-prandiale di glucosio ematico, svolge la sua azione ipoglicemizzante attivando i processi di glicolisi o di glicogenosintesi a livello epatico e muscolare, per la produzione immediata di energia o per l'immagazzinamento dello zucchero sotto forma di glicogeno. Contemporaneamente l'insulina esplica un'azione lipogenetica a livello del tessuto adiposo attivando la conversione in lipidi sia del glucosio in eccesso che dei grassi eventualmente assunti con il pasto. Tale ormone pancreatico svolge poi un'azione di stimolo anche sull'utilizzo delle proteine introdotte nell'organismo con la dieta: gli amminoacidi derivanti dalla digestione degli alimenti proteici vengono assorbiti nel circolo sanguigno e, sotto l'influenza dell'insulina, captati da parte del fegato e del muscolo scheletrico dove vengono utilizzati per la sintesi di nuove proteine.

Nei periodi lontani dai pasti il glucagone promuove il rilascio di glucosio dal fegato, evitando quindi che le concentrazioni di tale substrato energetico scendano al di sotto dei livelli normali [5] (Figura 1).



**Figura 1 - Omeostasi del glucosio: ruolo dell' insulina e del glucagone.**

Il rilascio d'insulina viene regolato da cambiamenti nella concentrazione di nutrienti, ormoni e neurotrasmettitori. Secrezione di quantitativi di insulina plasmatica insufficienti rispetto alla domanda metabolica innescano iperglicemia cronica e lo sviluppo del Diabete Mellito.

La mancata attività o la riduzione dell'efficacia biologica di tale ormone determinano un blocco delle vie metaboliche da esso regolate, con conseguente danneggiamento delle cellule dell'organismo. L'instaurarsi di una condizione cronica di iperglicemia fa sì che il glucosio, non venendo utilizzato e permanendo a lungo in circolo, da "fornitore di energia" diventi un fattore tossico per tutte le cellule; nei casi più gravi si giunge a completa compromissione della fisiologia di organi quali occhi, reni, nervi, cuore e vasi sanguigni. Venendo meno l'effetto lipogenetico dell'insulina, si verifica sia una maggiore permanenza di acidi grassi nel sangue dopo i pasti, sia una loro anomala liberazione dal tessuto adiposo (questi vanno poi a depositarsi nel fegato, provocando la steatosi, e nelle arterie, generando l'arteriosclerosi). La ridotta sintesi proteica a livello epatico e muscolare, conseguente al *deficit* insulinico, giustifica la perdita di peso corporeo ed il senso di astenia spesso denunciati dal paziente quale sintomatologia di esordio della patologia diabetica, soprattutto nella tipologia insulino-dipendente.

Nello sviluppo del Diabete sono coinvolti diversi processi patogenetici: dalla distruzione delle cellule  $\beta$  del pancreas in seguito all'instaurarsi di fenomeni di autoimmunità con conseguente perdita progressiva nella produzione di insulina, a dismetabolismi derivanti da una diminuita risposta dei tessuti "bersaglio" a tale ormone.

Classicamente sono state identificate diverse forme di DM: T1DM (o IDDM, Diabete Mellito di Tipo 1), ad esordio generalmente giovanile ed eziologia principalmente immuno-mediata [2]; T2DM (o NIDDM, Diabete Mellito di Tipo 2), ad esordio in età adulta, che rappresenta la forma più comune di Diabete [3]; un terzo gruppo rappresentato da un insieme eterogeneo di forme monogeniche, che comprendono diversi tipi di mutazioni genetiche espresse nelle cellule  $\beta$  del

pancreas [7]; ed un quarto tipo di DM classificato come Diabete Mellito Gestazionale (GDM) [8].

Nonostante i rapidi progressi nella cura del Diabete, sia in termini di terapia farmacologica [9] che di terapia rigenerativa mediante l'uso di cellule staminali [10], c'è ancora molto da conoscere circa la struttura e la funzione delle *networks* regolatorie geniche dei diversi fenotipi cellulari che costituiscono il pancreas endocrino e che sono implicati nella patogenesi di questa malattia.

Da recenti pubblicazioni scientifiche si evince che alla base della morte delle cellule  $\beta$  (il fenotipo cellulare più rappresentativo delle isole del Langherans), vi è uno stato infiammatorio cronico. Quest'ultimo può essere dovuto ad iperproduzione di citochine pro-infiammatorie (ad esempio IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) tanto ad opera di cellule del sistema immunitario (macrofagi e linfociti T in particolare) quanto ad opera di cellule costituenti l'isola stessa (cellule  $\alpha$ ,  $\beta$  ed endoteliali). Anche la prolungata esposizione ad alte concentrazioni di acidi grassi circolanti sembra avere effetti simili. Queste osservazioni, unite all'evidenza clinica di forme di Diabete classicamente definite come Diabete di Tipo 1 anche nell'adulto, stanno facendo seriamente ripensare la comunità scientifica ad una nuova classificazione della patologia [11].

## **Epidemiologia**

La prevalenza di DM a livello globale è aumentata in maniera preoccupante negli ultimi venti anni e si stima che questo *trend* nel 2030 arriverà a circa 366 milioni di persone (Tabella 2) [12].

Ranking	2000		2030	
	Country	People with diabetes (millions)	Country	People with diabetes (millions)
1	India	31.7	India	79.4
2	China	20.8	China	42.3
3	U.S.	17.7	U.S.	30.3
4	Indonesia	8.4	Indonesia	21.3
5	Japan	6.8	Pakistan	13.9
6	Pakistan	5.2	Brazil	11.3
7	Russian Federation	4.6	Bangladesh	11.1
8	Brazil	4.6	Japan	8.9
9	Italy	4.3	Philippines	7.8
10	Bangladesh	3.2	Egypt	6.7

**Tabella 2 - Paesi con il maggior numero di casi stimati di Diabete per il 2000 e il 2030 (Tratta da [12]).**

Tale malattia ha un impatto molto serio nella società anche dal punto di vista economico: negli Stati Uniti i costi sono saliti, complessivamente, dai 2,6 miliardi di dollari del 1969 ai 98,2 miliardi del 1997, con un picco di 137,7 miliardi di dollari nel 1995 (tra i costi diretti, ospedalizzazione, farmaci, indagini di laboratorio e strumentali, e indiretti, assenteismo, morti premature, mancato guadagno) [13].

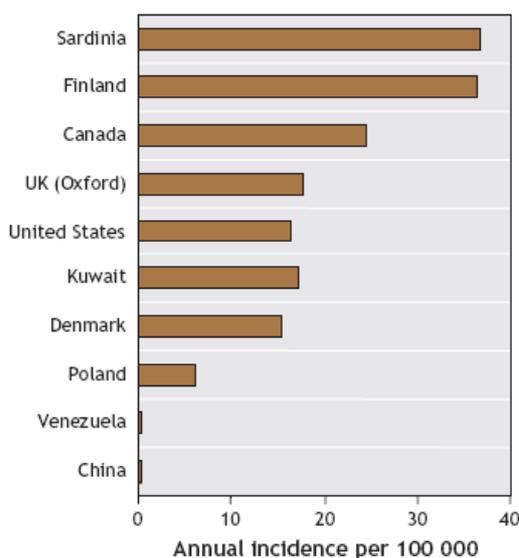
Se da un lato i rapidi cambiamenti nell'urbanizzazione, nell'industrializzazione e nella globalizzazione del mercato hanno aperto la strada verso il benessere socio-economico della popolazione, dall'altro, in associazione alla tendenza verso l'inattività fisica e l'obesità, hanno fornito il substrato ideale per lo sviluppo di disordini metabolici. Nel tempo, infatti, proporzionalmente all'enorme tasso di obesità si è verificata una crescita nell'incidenza dell'insulino-resistenza e del Diabete di tipo 2.

Il T1DM rappresenta circa il 5-10% di tutti i casi di DM, ed è principalmente diffuso tra le popolazioni occidentali (Europa e Nord America). Recentemente si è evidenziato che il 50-60% di pazienti con questa forma di Diabete sono al di sotto dei 16-18 anni e che la malattia può insorgere anche negli adulti, seppure con un'incidenza minore.

Nell'uomo l'incidenza del T1DM tra maschi e femmine è approssimativamente uguale, con una leggera prevalenza dei primi rispetto alle seconde. Dati forniti

dall'organo DIAMOND (DIABetes MONDiale) dell'Organizzazione Mondiale della Sanità indicano che l'incidenza del T1DM varia ampiamente tra diversi paesi ed all'interno di uno stesso paese [14]. Asia, Africa, Sud e Centro America mostrano tassi relativamente bassi di T1DM, al contrario di Europa del Nord, Nord America, Nuova Zelanda ed Australia che mostrano i tassi più alti di incidenza [15]. È possibile talora osservare marcate variazioni all'interno di una stessa nazione (ad esempio Italia, Portogallo, Nuova Zelanda). In Cina, addirittura ci sono differenze fino a 45 volte tra diverse regioni (con la più alta incidenza nel nord del paese). Le cause di tali differenze non sono ancora chiare ma potrebbero essere coinvolti elementi quali dieta, stili di vita e fattori genetici [16, 17]. In Europa, così come in America, si ravvisa un "gradiente" passando dal Nord al Sud [18]. La Finlandia ha il maggior tasso di incidenza europeo (40,9 per 100000/anno).

La prevalenza del T1DM in Italia risulta essere tra lo 0,4 e l'1 per mille. L'incidenza è compresa tra i 6 e i 10 casi per 100000 per anno nella fascia di età da 0 a 14 anni, mentre è stimata in 6,72 casi per 100000 per anno nella fascia di età da 15 a 29 anni. Fa assoluta eccezione la Sardegna che ha un'incidenza di Diabete giovanile tra le più alte del mondo, pari a 34 casi per 100000 per anno nella fascia di età di 0-14 anni [19] (Figura 2).



**Figura 2 - Variazione geografica nell'incidenza annuale del Diabete di tipo 1.**

La prevalenza di T2DM è in continua crescita a causa dell'aumento dell'obesità e della sedentarietà. La malattia nei primi anni è spesso asintomatica e non di rado la diagnosi viene posta in occasione di ricoveri per complicanze già in atto. Da questo deriva che la prevalenza della malattia nota è stimata intorno al 3-4%, mentre indagini mirate con curva da carico di glucosio forniscono percentuali sensibilmente più elevate, del 6-11% [20]. Sebbene la prevalenza complessiva del Diabete di tipo 2 stia aumentando negli Stati Uniti ed in tutti gli altri paesi occidentalizzati, sono state osservate rilevanti differenze tra diversi gruppi etnici. Per esempio, gli indiani asiatici (India, Pakistan, Bangladesh) hanno insolitamente un'elevata prevalenza di T2DM al confronto con i caucasici. Tuttavia, l'incidenza dell'obesità, un importante fattore di rischio per lo sviluppo del Diabete di tipo 2, è significativamente più bassa tra gli indiani asiatici rispetto ai caucasici. Benché le modificazioni nell'alimentazione e la scarsa attività fisica, possano giocare un ruolo nell'aumentata prevalenza di questo tipo di Diabete, negli indiani asiatici emigrati, vari studi epidemiologici hanno mostrato che questi fattori non sono da soli sufficienti a giustificare una simile tendenza. Un importante fattore che contribuisce all'aumento del T2DM negli indiani asiatici è l'eccessiva insulino-resistenza rispetto ai caucasici. Questa differenza nel livello di resistenza all'insulina può essere spiegata da un fattore genetico o ambientale, o dalla combinazione di entrambi [21].

## **Diabete Mellito di Tipo 1 (T1DM o IDDM)**

Il Diabete di Tipo 1 (che rappresenta il 5-10% dei casi di Diabete) è una malattia autoimmune caratterizzata da una risposta infiammatoria contro le isole pancreatiche che conduce ad una selettiva e progressiva morte delle  $\beta$  cellule che producono insulina [22]. Le cause della malattia non sono chiare, ma almeno due componenti principali sembrano contribuire allo stato patologico.

La prima è una componente genetica per cui certi individui hanno un'aumentata predisposizione alla malattia. Tale componente non è sufficiente di per sé a causare l'autoimmunità: è sempre più verosimile l'ipotesi che l'ambiente possa

svolgere un ruolo importante nell'eziologia del Diabete di tipo 1, almeno modulando in senso positivo e negativo l'espressione di fattori genetici predisponenti. Diverse osservazioni supportano l'importanza dei fattori ambientali [23] (1) il tasso di concordanza di T1DM in gemelli monozigoti è del 30-50%, sottolineando che almeno il 50% dell'eziologia non è spiegata da fattori genetici; (2) le popolazioni a basso rischio di Diabete acquisiscono alto rischio quando migrano in aree ad alta incidenza; (3) variazioni stagionali nell'incidenza del Diabete; (4) differenze d'incidenza tra popolazioni geneticamente comparabili.

I fattori ambientali presi in considerazione sono in primo luogo gli agenti infettivi, quindi gli agenti tossici e le abitudini alimentari (Tabella 3).

Agent	Type of study	No of participants	Outcome
Enterovirus	Prospective <sup>w1</sup>	155	Associated with diabetes autoantibodies
	Case-control <sup>w2</sup>	260	In utero infection associated with type 1 diabetes
	Prospective <sup>w3</sup>	65	No association with type 1 diabetes
Mumps	Case-control <sup>w4</sup>	127	All these studies found associations with diabetes autoantibodies
Rubella	Retrospective <sup>w5</sup>	386	
Rotavirus	Case control <sup>w6</sup>	54	
Chickenpox	Prospective <sup>w7</sup>	n/a	
Cow's milk*	Prospective <sup>w8</sup>	725	Positive association with autoimmunity
	Cross sectional <sup>w9</sup>	253	Lack of association with autoimmunity
	Prospective <sup>w10</sup>	317	Lack of association with autoimmunity
Common childhood vaccinations	Case-control <sup>w11</sup>	3202	No association with autoimmunity
	Case-control <sup>w12</sup>	317	No association with autoimmunity
	Prospective <sup>w13</sup>	823	No association with autoimmunity
	Prospective <sup>w14</sup>	4400	Positive association with autoimmunity
Nitrates, nitrites, or nitrosamines	Prospective <sup>w15</sup>	867	Both these studies showed circumstantial evidence suggesting an association between type 1 diabetes and consumption of food and water containing nitrates
	Retrospective <sup>w16</sup>	1280	

\*The data on cow's milk are conflicting. The TRIGR study (Finland) is under way to determine if elimination of cow's milk from infants' diet can prevent type 1 diabetes.

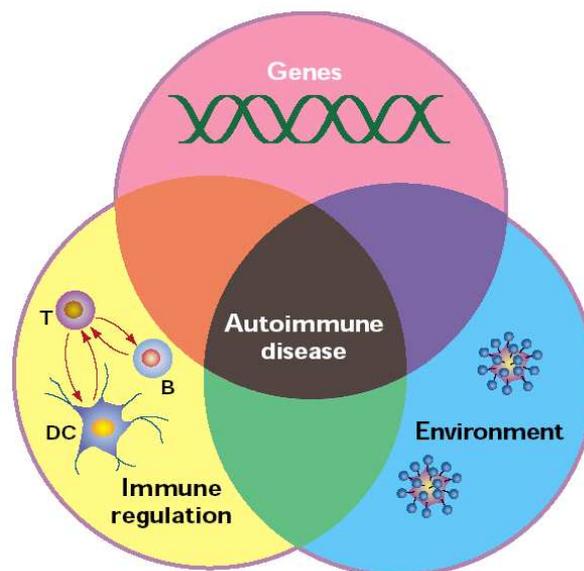
**Tabella 3 - Studi che analizzano l'associazione dei fattori ambientali potenzialmente implicati nell'eziopatogenesi del T1DM (Tratta da [24]).**

Una delle ipotesi attualmente presa in considerazione riguardo l'insorgenza del T1DM è la cosiddetta "ipotesi igienica", che vede nelle condizioni socio-

economico-ambientali una causa primaria; in particolare i bambini appartenenti alle famiglie meno abbienti e che sin dalla nascita entrano in contatto con un ambiente igienicamente meno controllato (con conseguenti esposizioni più frequenti ad agenti infettivi) di quanto normalmente non lo siano gli appartenenti a ceti sociali più elevati sarebbero naturalmente “vaccinati” contro diverse malattie autoimmuni. Tale ipotesi però vede un punto debole nel postulato di Gale [25] secondo cui l’effetto protettivo sarebbe mediato da linfociti T regolatori, proprio gli effettori del T1DM.

In ogni caso, la componente ambientale in qualche modo innesca la risposta autoimmune, determinando la distruzione delle cellule  $\beta$ .

Questi tre aspetti, nonostante vengano generalmente trattati separatamente, risultano strettamente interconnessi nel concorrere alla genesi della malattia (Figura 3).



**Figura 3 - Fattori genetici ed ambientali influiscono sul sistema immunitario coinvolto nella patogenesi del Diabete di tipo 1.**

### **Genomica**

Studi di *clustering* all’interno di famiglie hanno dimostrato l’importanza della componente genetica nel rischio di sviluppare il T1DM. Tali studi evidenziano

come il rischio di sviluppo della malattia in parenti di primo grado di soggetti diabetici sia del 5-6% contro il rischio in generale di circa lo 0,4% della popolazione di razza bianca [26]. Il tasso di co-occorrenza della malattia in gemelli monozigoti è del 30-40% contro il 6% dei gemelli dizigoti [27]. Sebbene questi dati siano a favore di un'importante contributo della genetica all'insorgere della malattia, il relativamente basso tasso di concordanza tra gemelli identici, come detto precedentemente, è indice di una bassa penetranza dei geni della suscettibilità: non tutti gli individui che, dunque, sono geneticamente a rischio svilupperanno la malattia.

Come le altre malattie autoimmuni organo-specifiche, il T1DM vede una stretta associazione genetica con l'Antigene Leucocitario Umano (HLA), localizzato nel cromosoma 6, all'interno della regione genomica di circa 3,5 Mb nota come Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC): questo è stato il primo *locus* ad essere scoperto associato con il T1DM [28] e pare che contribuisca almeno per metà alla base familiare di tale malattia [26].

Due combinazioni di geni HLA (o alplotipi) sono di particolare importanza: DR4-DQ8 e DR3-DQ2. Tali alplotipi si ritrovano nel 90% dei bambini affetti e, se presenti entrambi in uno stesso individuo, aumentano notevolmente le possibilità che questo sviluppi la patologia in età infantile [29]. Un terzo alplotipo, DR15-DQ6, è presente in circa l'1% dei bambini con T1DM e in circa il 20% della popolazione generale, e sembra avere un effetto protettivo nei confronti della malattia [30].

Ulteriori studi effettuati attraverso approcci basati sull'identificazione di geni candidati hanno portato alla scoperta del gene dell'insulina (INS) sul cromosoma 11 come il secondo più importante fattore di suscettibilità genetica, che contribuisce per un 10% alla predisposizione verso la malattia. Forme più corte di *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) nel promotore del gene per l'insulina sono infatti associate ad una maggiore suscettibilità verso il T1DM, mentre un maggior numero di tali elementi costituirebbe un fattore protettivo. Quest'ultima condizione è correlata ad una maggiore espressione dell'mRNA di INS nel timo, il che suggerisce una più efficiente delezione delle cellule T insulino-specifiche durante il processo che porta alla tolleranza immunologica

[31]. Negli ultimi 10 anni *screening* dell'intero genoma (*Genome Wide Associations, GWA*) hanno consentito di individuare parecchi nuovi loci associati al T1DM [32-35]. Tra questi, due geni sono strettamente correlati con l'attivazione delle cellule T: un allele del gene per un regolatore negativo dell'attivazione delle cellule T, il *cytotoxic T lymphocyte antigene 4* (CTLA-4) (cromosoma 2), considerato il terzo candidato associato al T1DM [36]; una variante del gene PTPN22 codificante per la proteina LYP, anch'esso correlato all'attivazione dei linfociti T, come CTLA-4, costituisce il quarto *locus* candidato [37]. Infine il gene ICAM1 sembra incrementare il rischio di sviluppo della malattia contribuendo all'*homing* e successiva attivazione delle cellule mononucleate nelle isole di Langerhans [38].

Oggi grazie all'avvento della tecnologia nano-fluidica e dei sequenziatori di terza generazione sono stati fatti passi da gigante nella ricerca di nuovi loci associati al T1DM. A Giugno del 2009 risale la pubblicazione su *Nature Genetics* del più grande studio di associazione e meta analisi che ha permesso di identificare su una coorte di oltre 7000 casi ed oltre 9000 controlli ben 40 loci associati al rischio di sviluppare il Diabete mellito di tipo 1 [39]. Il successo di questi studi *GWA* non proviene solamente dal grande numero di pazienti e controlli analizzati (e quindi dal conseguente maggiore apporto statistico) ma anche dalla disponibilità di piattaforme di genotipizzazione *HT* e dal completamento del progetto *HapMap* [40] che ha permesso di definire le aree di *linkage disequilibrium* (LD) lungo l'intero genoma consentendo così di ottenere la massima informazione genetica dall'analisi di un numero minimo di polimorfismi (Tabella 4).

Locus	Chromosome	Candidate genes or microsatellites
IDDM 1	6p21	HLA-DQ\DR
IDDM 2	11p15	InsulinVNTR
IDDM 3	15q26	D15s107
IDDM 4	11q13	MDU1, ZFM1, RT6, FADD/MORT1, LRP5
IDDM 5	6q24-27	ESR, MnSOD
IDDM 6	18q12-q21	D18s487, D18s64, JK (Kidd locus)
IDDM 7	2q31	D2s152, IL-1, NEUROD, GALNT3
IDDM 8	6q25-27	D6s264, D6s446, D6s281
IDDM 9	3q21-25	D3s1303
IDDM 10	10p11-q11	D10s193, D10s208, D10s588
IDDM 11	14q24.3-q31	D14s67
IDDM 12	2q33	CTLA-4, CD28
IDDM 13	2q34	D2s137, D2s164, IGFBP2, IGFBP5
IDDM 14	?	NCBI # 3413
IDDM 15	6q21	D6s283, D6s434, D6s1580
IDDM 16	?	NCBI # 3415
IDDM 17	10q25	D10s1750-D10s1773

**Tabella 4 - Loci di suscettibilità per il T1DM nell'uomo (Tratta da [24]).**

## Patogenesi

Il T1DM è causato da un'assoluta deficienza insulinica dovuta a distruzione delle cellule  $\beta$  pancreatiche, che si considera immuno-mediata, tranne in alcuni casi idiopatici nei quali non si ritrovano marcatori immuni, e che sono causati da altri meccanismi patogenetici come rare sindromi genetiche, infezioni da virus, o tossine [41]: può essere considerato una malattia infiammatoria delle isole pancreatiche [42]. L'infiammazione è definita come una risposta cellulare fisiologica locale a danni nei tessuti. È caratterizzata da invasione delle cellule e locali alterazioni metaboliche e circolatorie, a volte accompagnate da danni funzionali o strutturali dei tessuti invasi. Non è in se stessa una malattia ma piuttosto la manifestazione di una malattia. Inizialmente ha effetti benefici come la prevenzione della propagazione di infezioni, ma se prolungata o eccessiva può condurre all'insorgenza di malattie causate dalla distruzione dei tessuti dovuta a mediatori dell'infiammazione, ROS e componenti del complemento.

La reazione autoimmune nel T1DM è attivata dall'esposizione a fattori ambientali (descritti precedentemente). I soggetti che non hanno predisposizione genetica al Diabete, dopo esposizione a tali attivatori ambientali, possono avere una

transitoria autoimmunità anti-isole che si risolve senza alterazioni della funzione della cellula  $\beta$  pancreatica. Al contrario, i soggetti con predisposizione genetica alla malattia, subiscono un attacco flogistico autoimmune più grave che causa la distruzione delle cellule  $\beta$  pancreatiche e l'insorgenza del Diabete.

Oltre che con i geni della risposta immunitaria, il Diabete è associato anche con la comparsa di altre malattie autoimmuni organo-specifiche, che si manifestano da tre a sei volte più comunemente nei pazienti con T1DM. Tali osservazioni supportano l'idea che queste malattie costituiscano una famiglia di disordini immuno-mediati.

In pazienti con Diabete di tipo 1 sono state ritrovate sia autoimmunità cellulo-mediata che umorale; pazienti con insorgenza recente di T1DM mostrano infiltrazione di cellule mononucleari nelle isole pancreatiche e distruzione di  $\beta$  cellule (insulite). Evidenze più dirette per il coinvolgimento del sistema immunitario provengono da studi che utilizzano le ciclosporine, immunosoppressori delle cellule T [43, 44]. Tali lavori mostrano che l'immunosoppressione induce e mantiene remissione e preserva la funzione delle cellule  $\beta$  nel periodo di trattamento, e confermano (1) che il sistema immunitario è direttamente coinvolto nella distruzione delle  $\beta$  cellule (non è quindi la conseguenza di una attivazione immunitaria secondaria a tale distruzione causata da altri fattori primari), e (2) che la massa  $\beta$  cellulare può essere preservata intervenendo sulle funzioni immunitarie. Sfortunatamente, a causa degli effetti collaterali delle ciclosporine e degli altri immunosoppressori attualmente disponibili l'uso di tale terapia non è clinicamente attuabile.

Nonostante le recenti conoscenze abbiano contribuito a gettar sempre più luce nella comprensione dei meccanismi patogenetici del T1DM, non esiste a tutt'oggi una teoria unitaria che metta in evidenza le reali cause d'innescio di tali meccanismi. Studi più dettagliati nell'uomo sono stati ostacolati dalla inaccessibilità ai tessuti insulari di pazienti diabetici.

Gli avvenimenti immunologici che portano alla distruzione della  $\beta$  cellula insulare sono stati studiati dettagliatamente in modelli animali di Diabete. Il topo diabetico non obeso (NOD), uno dei modelli animali di riferimento per lo studio del T1DM, ha caratteristiche simili al DM di tipo 1 dell'uomo. Diversamente dalla nostra

specie, però, i topi NOD sviluppano spontaneamente la malattia in modo estremamente prevedibile consentendo lo studio dettagliato degli eventi immunologici precoci [45, 46]. Nell'uomo diversi tipi di cellule infiammatorie infiltrano le isole: cellule presentanti l'antigene, in particolar modo i macrofagi, cellule T-helper, cellule T citotossiche, linfociti B, cellule *natural killer* [47]. Nei modelli animali le prime cellule che infiltrano le isole sono cellule presentanti l'antigene, seguite da cellule T [48].

L'interazione tra questi tipi cellulari porta alla prolungata presenza, in alte concentrazioni, di mediatori dell'infiammazione, per esempio citochine, chemochine, specie reattive dell'ossigeno (ROS), e altri prodotti infiammatori [49].

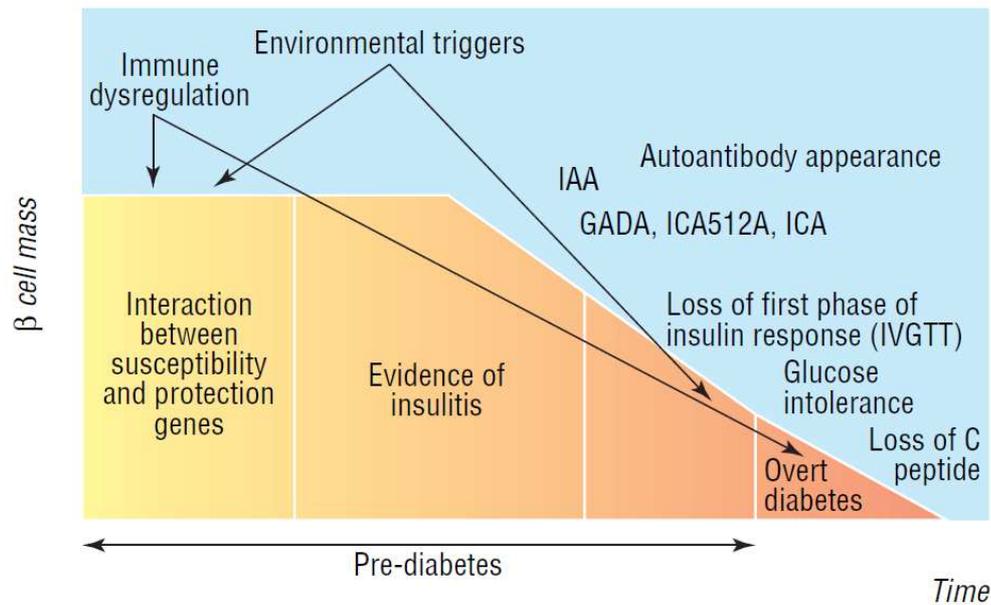
Sebbene i linfociti B possano agire come cellule che presentano l'antigene e possano essere richiesti per lo sviluppo del Diabete nei topi NOD, è stata osservata insorgenza di tale malattia anche in pazienti deficienti in linfociti B, confermando che tali cellule non sono indispensabili per lo sviluppo del T1DM nell'uomo [50].

Gli anticorpi non sono considerati essere gli effettori patogenetici ma piuttosto marcatori della malattia.

È comunque critico tenere in considerazione che ci sono numerose differenze nei meccanismi patogenetici che guidano l'inizio e la progressione del Diabete nei topi NOD e nell'uomo, come ad esempio la composizione delle cellule infiammatorie infiltranti nelle due specie, o l'aumentata espressione del Complesso Maggiore di Istocompatibilità I nell'uomo [51].

La distruzione delle  $\beta$  cellule comporta una progressiva perdita nella secrezione dell'ormone insulinico: si ha inizialmente una perdita della prima fase di produzione di insulina in risposta ad un *test* di tolleranza al glucosio per via intravenosa, seguita da DM manifesto clinicamente quando la produzione di insulina scende al di sotto di una soglia critica, fino ad arrivare alla condizione di totale assenza di insulina circolante.

In figura 4 è mostrato un modello generale di distruzione delle  $\beta$  cellule che porta al T1DM.



**Figura 4 - Modello di patogenesi e storia naturale del Diabete di tipo 1 (Tratta da [24]).**

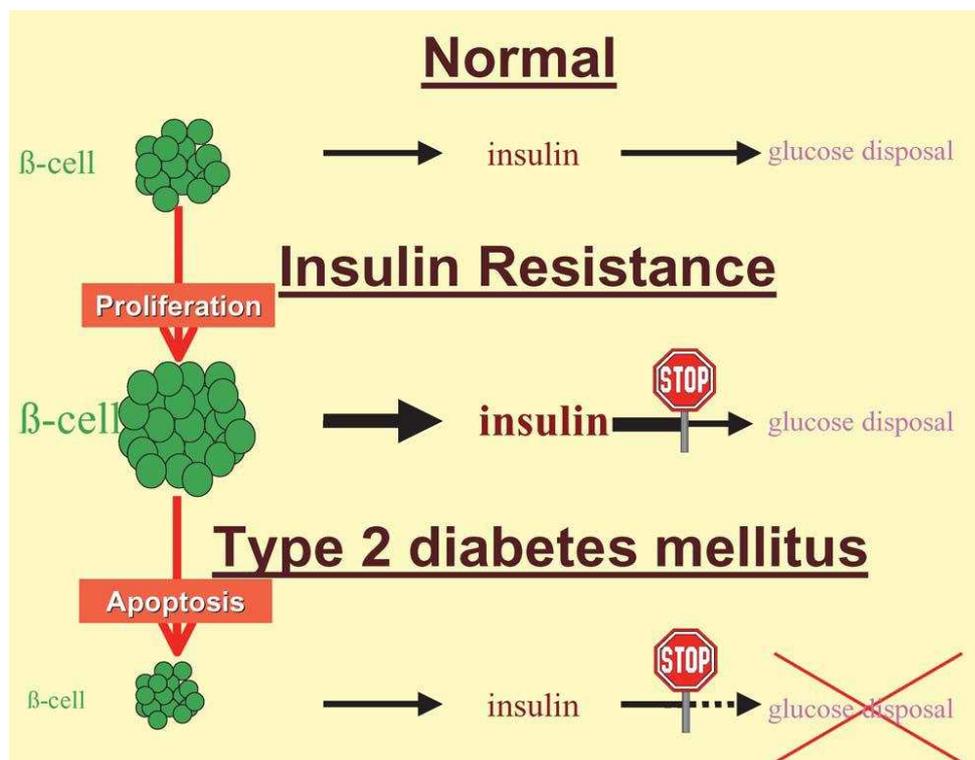
## Diabete Mellito di Tipo 2 (T2DM o NIDDM)

La forma più comune di Diabete è il T2DM (presente nel 90% della popolazione diabetica generale [52] con esordio generalmente più tardivo rispetto al tipo 1, interessando soggetti di 40-65 anni di età. E' caratterizzato, come detto precedentemente, dalla presenza di una ridotta sensibilità all'insulina da parte dei tessuti periferici (insulino-resistenza): i "bersagli" molecolari (muscolo, fegato e tessuto adiposo) dell'azione fisiologica di tale ormone non funzionano correttamente [53-56]. L'insulina non riesce ad attivare le vie metaboliche nelle cellule e a mantenere la glicemia a livelli normali [57].

Nel 1967 è stato proposto per la prima volta che il T2DM potesse essere dovuto non soltanto all'insulino resistenza ma anche ad un'incapacità da parte delle  $\beta$  cellule di secernere un'adeguata quantità di insulina [58].

Nella storia naturale del Diabete di tipo 2 è l'insulino-resistenza a comparire per prima, il che impone un lavoro aggiuntivo alle  $\beta$  cellule per compensare la ridotta efficacia dell'insulina prodotta. Quando poi le cellule  $\beta$  non riescono più a far fronte alle aumentate necessità, la produzione di tale ormone diminuisce e il

Diabete si evidenzia clinicamente [59-62]. Il pancreas endocrino possiede la capacità di adattarsi a condizioni di aumentata richiesta di insulina, come nei casi di obesità o gravidanza, incrementando la massa delle cellule  $\beta$ ; ciò coinvolge un bilancio tra replicazione e apoptosi (una particolare forma di morte programmata), così come lo sviluppo di nuove isole dai dotti del pancreas esocrino. Quando tale adattamento fallisce insorge il Diabete [63, 64] (Figura 5).



**Figura 5 - La capacità di secernere adeguate quantità di insulina dipende dalla massa  $\beta$  pancreatica. La resistenza all'insulina aumenta la richiesta per tale ormone, portando alla proliferazione e all'aumento della massa delle cellule  $\beta$ . Quando l'espansione di tali cellule è compensata da apoptosi, insorge una relativa deficienza insulinica che porta al Diabete.**

Due importanti lavori nei primi anni del 2000 hanno mostrato il ruolo centrale che ha il *deficit* di massa  $\beta$  cellulare (oltre alla diminuzione della funzionalità di tali cellule) nella patofisiologia del T2DM, e suggerito che il meccanismo responsabile sia l'aumentata apoptosi delle cellule  $\beta$  [65, 66].

Il T2DM ha un'eziologia multifattoriale, in quanto è causato dal concorso di più fattori, sia genetici che ambientali. È spesso associato con una forte predisposizione familiare anche se le caratteristiche genetiche di questa forma di Diabete sono complesse e non chiaramente definite. L'esistenza di una predisposizione genetica è suggerita dal fatto che, nel caso di gemelli, il T2DM è presente in entrambi in una elevatissima percentuale, molto superiore rispetto a quanto accade per il T1DM. Probabilmente intervengono difetti a carico di più geni coinvolti nella produzione di insulina e nel metabolismo del glucosio; il tipo di *deficit* varierebbe da un paziente all'altro, dal momento che fino ad oggi non è stato possibile identificare anomalie genetiche comuni a tutti i pazienti di tipo 2 [67].

La sensibilità all'insulina può essere migliorata dalla perdita di peso, dall'incremento dell'attività fisica e/o dal trattamento farmacologico dell'iperglicemia, ma non viene riportata alla normalità. Il rischio di sviluppare il Diabete di Tipo 2 aumenta con l'obesità e la mancanza di attività fisica. Anche l'età favorisce la comparsa di tale patologia, poiché essa si accompagna ad una riduzione fisiologica della sensibilità dei tessuti periferici all'insulina.

Come ipotizzato inizialmente circa 30 anni fa e confermato da più recenti evidenze, anche il glucagone, prodotto dalle cellule  $\alpha$  delle isole pancreatiche, sembra svolgere un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione di questa forma di Diabete. Non a caso, quindi, la ricerca di nuovi farmaci in ambito diabetologico si è focalizzata su molecole potenzialmente capaci di modulare l'attività metabolica del pancreas endocrino.

La figura 6 mostra la progressione nella patogenesi del Diabete di tipo 2.

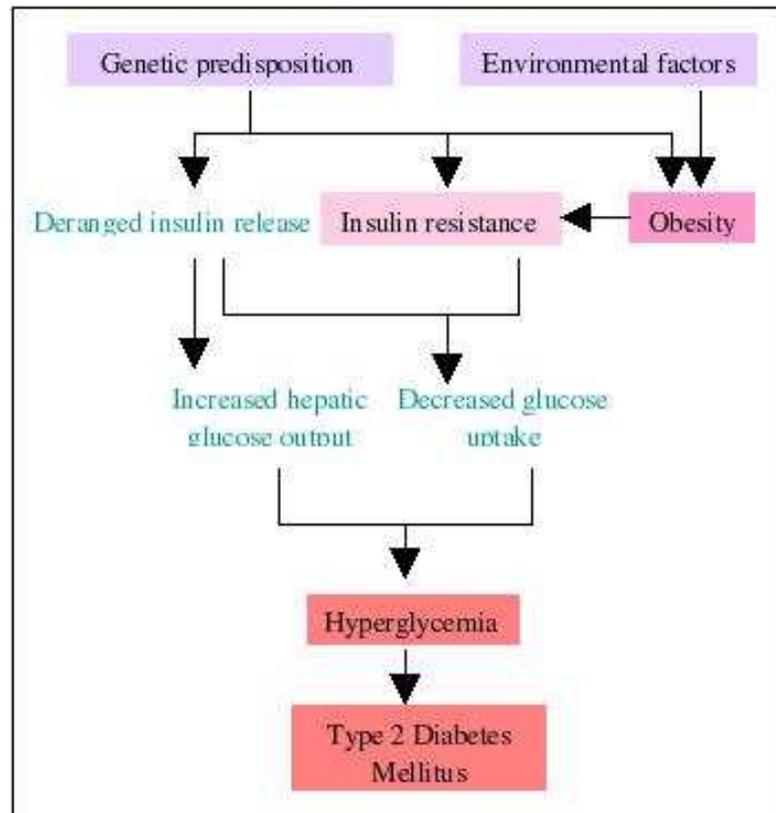
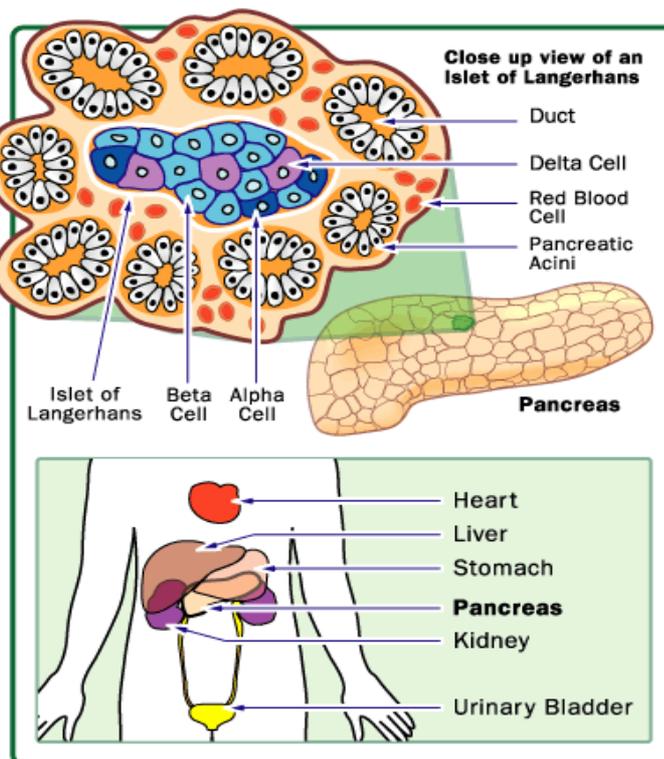


Figura 6 - Patogenesi del T2DM.

## Le cellule $\alpha$ in condizioni fisiologiche e nel Diabete

Il pancreas endocrino è composto da gruppi di cellule, le isole del Langerhans (dal nome dello studioso che le individuò verso la fine del XIX secolo), che rappresentano non più dell'1-2% della massa totale dell'organo (Figura 7).



**Figura 7 - Tipi cellulari presenti nel pancreas endocrino.**

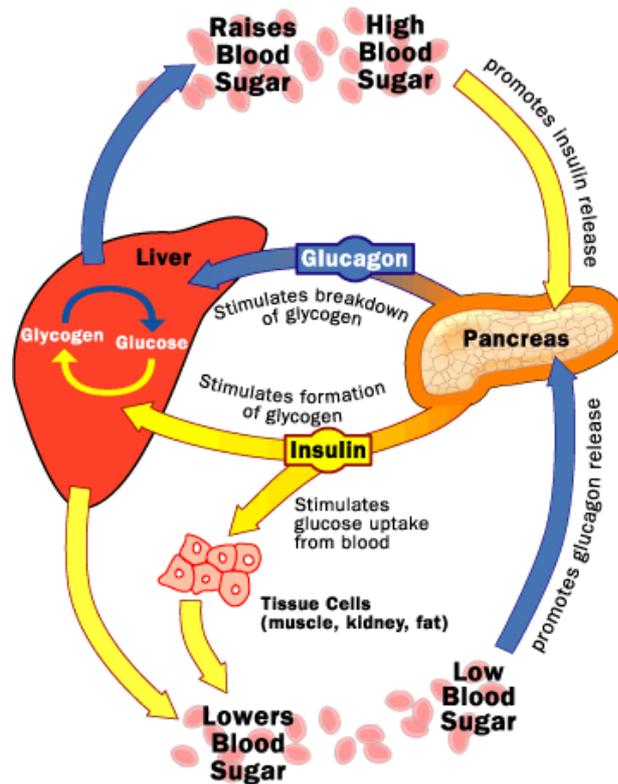
All'analisi istologica tali strutture appaiono rotondeggianti od ovali con dimensioni che vanno, nell'uomo, da pochi a 200-300  $\mu\text{m}$  di diametro. Le isole contengono vari tipi di cellule endocrine, di cui le più rappresentate sono le cellule  $\beta$  che producono insulina (60-70%) e le cellule  $\alpha$  che producono glucagone (20-30%) (Tabella 5).

Tipo	Percentuale relativa	Ormone prodotto
Cellule alfa	20-30%	Glucagone
Cellule beta	60-70%	Insulina
Cellule delta	5-15%	Somatostatina
Cellule PP	5-10%	Polipeptide pancreatico

**Tabella 5 - Composizione cellulare delle isole di Langerhans.**

A differenza di quanto avviene nelle isole di roditori, in cui le cellule  $\beta$  sono disposte a costituire il *core* dell'isola e sono circondate da un mantello di cellule endocrine non- $\beta$  (prevalentemente  $\alpha$ ), nelle isole umane la distribuzione delle cellule endocrine è certamente meno compartimentalizzata [59].

Le cellule  $\alpha$  sintetizzano e rilasciano il glucagone, risultato finale di una serie di modifiche a carico del proglucagone da parte di enzimi proteolitici con specificità tissutale [68]. Il ruolo principale del glucagone è quello di promuovere il rilascio di glucosio dal fegato nei periodi lontani dai pasti, evitando quindi che le concentrazioni di tale substrato energetico scendano al di sotto dei livelli normali. È quindi un ormone ad azione “iperglicemizzante” (Figura 8).



**Figura 8 - Azione dell'insulina e del glucagone.**

Il glucagone si lega a specifici recettori di membrana a livello delle cellule bersaglio attivando l'enzima adenilato-ciclastasi. Questo, a sua volta, catalizza la conversione dell'ATP (adenosin-trifosfato) ad AMP (adenosin-monofosfato) ciclico (cAMP), che è in grado di attivare varie proteine chinasi (dette, appunto,

cAMP dipendenti). Queste ultime promuovono a cascata una serie di fosforilazioni degli enzimi intracellulari responsabili degli effetti del glucagone. Numerosi fattori regolano la secrezione di tale ormone. Tra questi, i più importanti sono gli aminoacidi (in particolare l'arginina), che inducono il suo rilascio, e il glucosio e l'insulina, che invece ne inibiscono la secrezione [69].

Nei pazienti con T2DM le concentrazioni circolanti di glucagone si sono rivelate più elevate di quanto atteso in presenza dei corrispondenti livelli glicemici, particolarmente a digiuno [70]. Ovviamente, questo contribuisce a far aumentare la produzione epatica di glucosio in tali soggetti. Inoltre, nel T2DM è stata documentata una ridotta capacità, da parte delle cellule  $\alpha$ , di riconoscere in maniera congrua l'effetto inibitorio dell'iperglicemia. In effetti, la riduzione della secrezione di glucagone in risposta a glucosio endovena, glucosio orale o pasto ricco di carboidrati è significativamente minore in caso di pazienti diabetici di tipo 2 rispetto ai soggetti normali. Addirittura, nei pazienti in cattivo controllo glicemico si può assistere a un aumento paradossale della secrezione dell'ormone [42]. Qualche autore ha suggerito che le cellule  $\alpha$  diabetiche potrebbero essere resistenti all'azione dell'insulina, e quindi non riconoscerne l'effetto inibitorio, ma questa ipotesi è ancora da dimostrare [67].

La massa delle cellule  $\alpha$  nelle isole pancreatiche sembra aumentare in soggetti affetti da T2DM relativamente al volume pancreatico totale con un'aumentata proporzione delle cellule  $\alpha$  rispetto alle  $\beta$  nelle isole diabetiche rispetto ai controlli [49]. Quest'ultimo dato deve essere comunque considerato con cautela, vista la ridotta massa  $\beta$  cellulare consistentemente osservata nel T2DM.

È recente l'ipotesi che la sopravvivenza delle cellule  $\alpha$  nel Diabete possa rappresentare un processo fisiologico attivato nel tentativo di compensare la perdita di massa  $\beta$  cellulare tramite il possibile transdifferenziamento delle cellule  $\alpha$  in cellule  $\beta$  [71].

In sintesi, sebbene sia necessario approfondire con ulteriori studi le caratteristiche di risposta delle cellule  $\alpha$  al glucosio, all'insulina e ad altre molecole (in particolare l'arginina), è verosimile che tali cellule presentino alterazioni funzionali che possono contribuire, insieme ad un aumento della loro quantità proporzionale, allo sviluppo e alla progressione del T2DM.

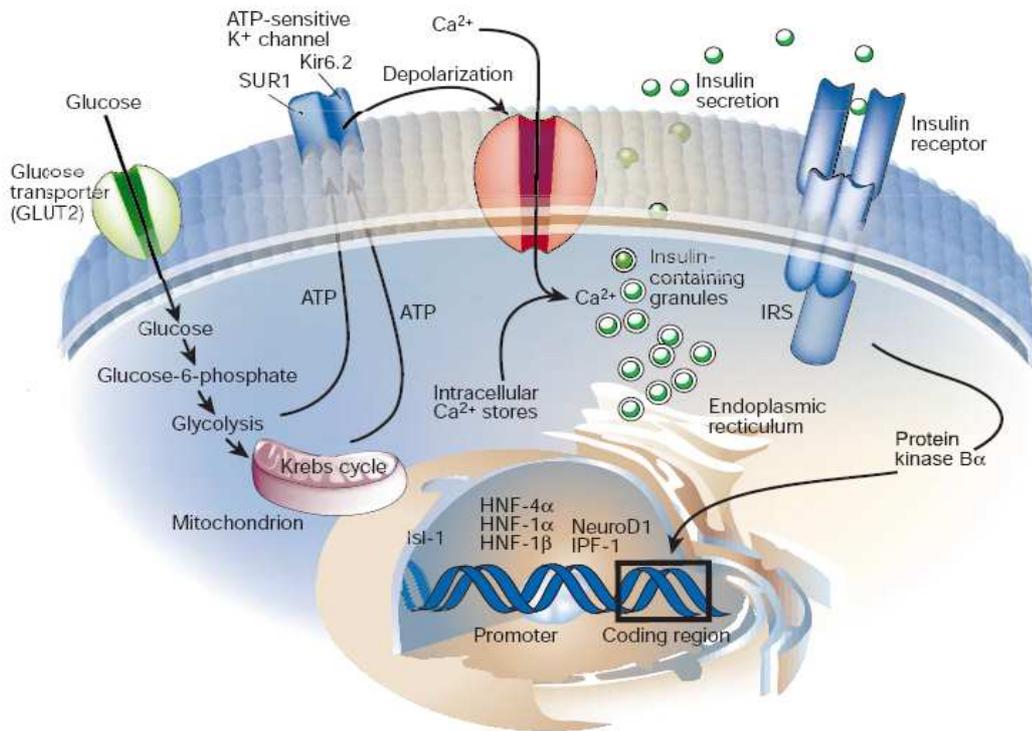
Per quanto riguarda le cellule  $\alpha$  nel T1DM, non vi sono ancora evidenze certe, ma si pensa che presentino insulino-resistenza come avviene nel Diabete di tipo 2.

## **Le cellule $\beta$ in condizioni fisiologiche e nel Diabete**

Le cellule  $\beta$  rappresentano circa il 70% delle cellule insulari. Esse producono e secernono insulina in maniera controllata, in modo da mantenere le concentrazioni circolanti di glucosio nel loro intervallo fisiologico. È stato calcolato che in un'isola di medie dimensioni (100-150 micron) ci sono circa 1000-1500 cellule  $\beta$ , ciascuna delle quali contiene circa 10000 granuli di insulina. Poiché il numero di insule in un pancreas normale è stimato essere 500000-1000000, il patrimonio complessivo di queste cellule è notevole in condizioni normali.

La normale funzione  $\beta$  cellulare dipende essenzialmente dall'integrità dei meccanismi che regolano la sintesi e il rilascio dell'insulina, nonché dalla massa complessiva delle cellule  $\beta$ . Il regolatore più importante della secrezione insulinica è proprio il glucosio, anche se numerosi altri nutrienti, così come vari ormoni, neurotrasmettitori e farmaci possono influenzare il suo rilascio.

Si ritiene che il glucosio, dopo essere entrato nella cellula  $\beta$  ad opera di specifici gluco-trasportatori (in particolare il GLUT2 e, nell'uomo, anche il GLUT1), venga fosforilato dall'enzima glucochinasi e quindi avviato lungo la cascata glicolitica. Il piruvato che ne deriva entra nel mitocondrio, e attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici ed i successivi eventi a livello della catena respiratoria mitocondriale si arriva alla produzione di ATP. L'aumento del rapporto ATP/ADP (adenosin-difosfato) induce la chiusura, a livello della membrana cellulare, dei canali del potassio ATP-dipendenti, cui conseguono depolarizzazione della membrana, apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, ingresso nella cellula di ioni calcio. Quest'ultimo evento determina, infine, attraverso meccanismi complessi e non ancora del tutto identificati, l'esocitosi dei granuli di insulina (Figura 9).



**Figura 9 - Metabolismo del glucosio.**

Il metabolismo del glucosio determina inoltre a livello mitocondriale anche la produzione di altri metaboliti che, attraverso meccanismi ancora poco noti, contribuiscono all'esocitosi dei granuli di insulina. Nel percorso che porta al rilascio di tale ormone, alcuni secretagoghi agiscono distalmente. Le sulfaniluree, per esempio, legandosi a recettori specifici che si trovano sui canali del potassio ATP-dipendenti, determinano direttamente la chiusura di tali canali [72]. L'aminoacido arginina entrando nella  $\beta$  cellula causa, per la presenza di cariche negative nella sua struttura, depolarizzazione della membrana cellulare e conseguente apertura del canali del calcio voltaggio-dipendenti [73].

Dal punto di vista dinamico il rilascio di insulina riconosce principalmente una prima fase, rapida, della durata di pochi minuti, e una seconda fase, più prolungata [74, 75].

I principali meccanismi che regolano la massa  $\beta$  cellulare sono: l'apoptosi, le dimensioni delle singole cellule  $\beta$ , la replicazione (cioè mitosi di cellule  $\beta$  pre-esistenti), e la neogenesi (cioè formazione di nuove cellule  $\beta$  da precursori) [76,

77]. Quanto a lungo sopravviva una cellula  $\beta$  nell'uomo non è noto, ma si comincia a pensare che l'aspettativa di vita normale possa essere di alcuni anni (da 2 a 5). Peraltro, è stato dimostrato che nei primi anni di vita la massa  $\beta$  cellulare aumenta notevolmente, grazie a marcati fenomeni replicativi e di neogenesi. Successivamente, si raggiunge una sorta di equilibrio, che viene poi mantenuto, di solito, durante la vita adulta.

Con l'avanzare dell'età, i fenomeni apoptotici tendono a prevalere su quelli rigenerativi, e la massa cellulare si riduce leggermente. La plasticità delle  $\beta$  cellule può essere apprezzata in alcune situazioni fisiologiche o patologiche. Durante la gravidanza, per esempio, la massa  $\beta$  cellulare quasi raddoppia per far fronte alle esigenze metaboliche e ormonali. Ciò è sostanzialmente dovuto a fenomeni replicativi mediati dalla prolattina e dal lattogeno placentare. Dopo il parto il tasso di replicazione diminuisce mentre aumenta quello dell'apoptosi, così da raggiungere di nuovo l'equilibrio. In caso di sovrappeso/obesità, l'insulino-resistenza che ne deriva viene compensata da un accentuato tasso di replicazione e neogenesi, e dall'aumento di dimensioni delle singole  $\beta$  cellule [69, 78].

Come detto precedentemente la morte delle  $\beta$  cellule pancreatiche avviene sia nel T1DM che nel T2DM, portando ad una assoluta o relativa deficienza d'insulina: nel primo caso è dovuta principalmente ad autoimmunità, mentre nel secondo insorge come conseguenza combinata di un aumento del glucosio in circolo e acidi grassi saturi, insieme con gli adipociti. In entrambi i tipi di Diabete i mediatori dell'infiammazione conducono all'apoptosi delle  $\beta$  cellule.

La natura degli effettori immunologici che indurrebbero l'apoptosi delle  $\beta$  cellule pancreatiche nel T1DM è ancora oggetto di discussione. Ci sono due teorie a riguardo: (1) la distruzione delle  $\beta$  cellule è mediata dalle cellule T citotossiche attraverso il meccanismo di Fas/FasL o il sistema perforine/granzima; (2) la distruzione delle  $\beta$  cellule è causata principalmente dai mediatori dell'infiammazione come le citochine *Interleukin 1* (IL-1), *Tumour Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) e *Interferon  $\gamma$*  (INF $\gamma$ ) che, essendo rilasciate in alte concentrazioni nel microambiente insulare, a causa dell'interazione tra cellule presentanti l'antigene e cellule T nelle isole infiltrate, inducono apoptosi.

Nessuno dei due meccanismi può essere da solo responsabile della completa distruzione delle  $\beta$  cellule nel Diabete di tipo 1: probabilmente contribuiscono sia i mediatori dell'infiammazione che il sistema delle cellule T. È stato dimostrato che le citochine sono essenziali per l'induzione di Fas nelle  $\beta$  cellule, rendendole sensibili alla distruzione mediata dalle cellule T [79]: sia individualmente che in combinazione causano apoptosi nelle  $\beta$  cellule umane e murine [48, 49].

Nel T2DM fattori genetici e acquisiti, non del tutto noti, concorrono nel determinare il danno di funzione e di massa  $\beta$  cellulare. Sono stati proposti vari meccanismi che possano spiegare le cause del progressivo fallimento cui vanno incontro le cellule  $\beta$  nel produrre adeguate quantità di insulina, tra i quali stress del Reticolo Endoplasmatico, stress ossidativo, lipotossicità (causata da eccessivi livelli di acidi grassi), glucotossicità (dovuta a prolungata esposizione ad elevate concentrazioni di glucosio). Sembra che in tutti i casi anche nel Diabete di tipo 2 sia coinvolto il processo infiammatorio. Un numero elevato di cellule immunitarie sono state ritrovate nelle isole di pazienti con T2DM, insieme ad aumentati livelli di citochine e chemochine [80].

Tra i fattori acquisiti, certamente la glucotossicità e la lipotossicità svolgono un ruolo importante nell'influenzare la sopravvivenza delle  $\beta$  cellule [81].

Numerosi studi hanno dimostrato che entrambe queste condizioni dismetaboliche inducono alterazioni della secrezione insulinica, aumentata apoptosi, modifiche della trascrizione di geni importanti per la cellula  $\beta$ , e interferiscono con i processi rigenerativi  $\beta$  cellulari [82].

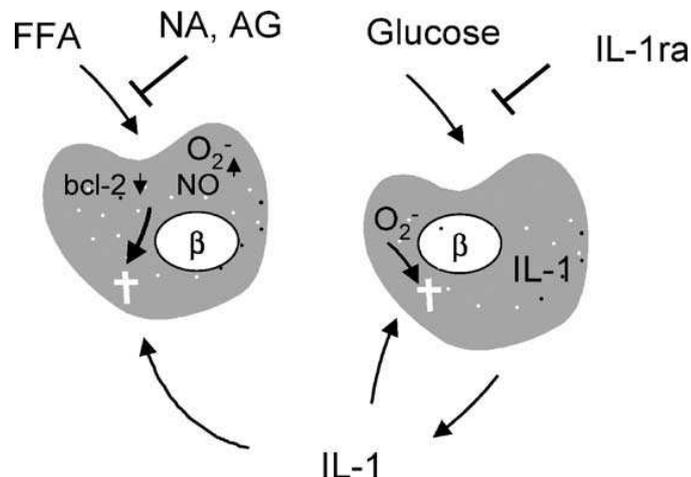
Alte concentrazioni di glucosio inducono il recettore Fas, che a sua volta è sovra-regolato dalla produzione di interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) glucosio-indotta [83]. L'iperglicemia può indurre apoptosi tramite attivazione di NF $\kappa$ B, attivazione della caspasi 3 mediata dal citocromo c, sovraespressione del recettore Fas e formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [84, 85].

Similmente, recenti studi mostrano che anche gli acidi grassi (FFA) promuovono una risposta infiammatoria. L'apoptosi indotta da acidi grassi implica la formazione di ceramide, l'aumentata produzione di ossido nitrico (NO) (sebbene il suo coinvolgimento sia controverso) e la *pathway* mitocondriale [82, 86, 87].

La combinazione di FFA ed elevate concentrazioni di glucosio incrementa ulteriormente l'espressione dell'IL-1 $\beta$  e il rilascio di varie citochine e chemochine [88].

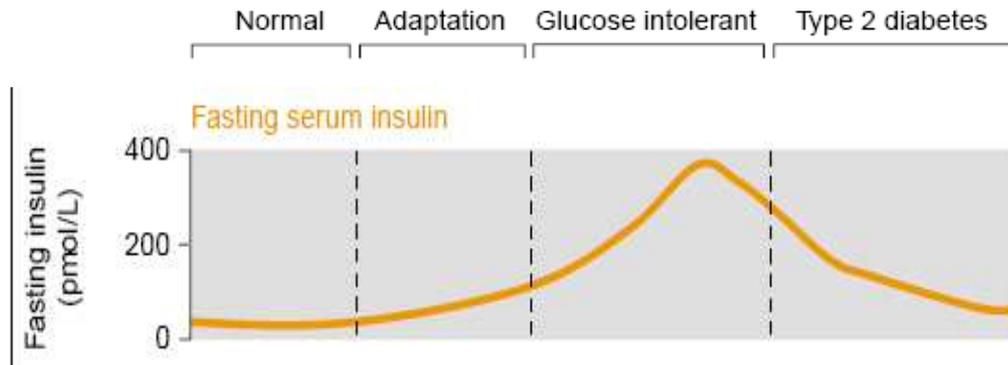
Il *deficit* funzionale sembra possa dipendere, almeno in parte, dalla situazione che si viene a creare a livello mitocondriale. Infatti in presenza di elevate concentrazioni di FFA il mitocondrio tende a ossidare questo substrato piuttosto che il glucosio. A questa ridotta ossidazione del glucosio segue un minor rilascio di insulina.

L'evento finale è accompagnato dalla diminuzione dell'espressione di proteine capaci di proteggere la cellula dagli eventi apoptotici (quali Bcl-2), ed è mediato dall'attività degli enzimi proteolitici caspasi (Figura 10).



**Figura 10 - Modello di apoptosi delle  $\beta$  cellule nel T2DM. Le cellule  $\beta$  esposte ad alte concentrazioni di glucosio esprimono IL-1 $\beta$ . L'effetto pro-apoptotico del glucosio potrebbe essere bloccato dall'antagonista naturale dell'azione di IL-1, *interleukin-1 receptor antagonist* (IL-1Ra). Questi eventi sono associati con l'attivazione di NF $\kappa$ B, la frammentazione del DNA e la compromessa funzione delle cellule  $\beta$ . Anche aumento nella concentrazione di FFA può influenzare direttamente la vitalità delle  $\beta$  cellule. (FFA (Free fatty acids), O $_2^-$  (oxygen radicals), NO (nitric oxide), NA (nicotinamide), AG (aminoguanidine), IL-1Ra (interleukin-1 receptor antagonist) (Tratta da [89]).**

Dal punto di vista funzionale, il comportamento della secrezione insulinica da parte della cellula  $\beta$  nel corso della storia naturale del T2DM è variabile, con livelli di insulinemia che, in termini assoluti, possono essere aumentati, normali, o ridotti, ma che, relativamente alle concentrazioni circolanti di glucosio, sono, per definizione, insufficienti a garantire una normale glicemia (Figura 11).



**Figura 11 - Variazione nella secrezione insulinica in diverse condizioni normali e patologiche.**

Il difetto funzionale più precoce è la progressiva riduzione, fino alla scomparsa, della prima fase della secrezione insulinica cui, nel tempo, si aggiunge un *deficit* anche a carico della seconda fase del rilascio dell'ormone. Di rilievo è il fatto che la secrezione di insulina in risposta a stimoli diversi dal glucosio (ad esempio arginina e sulfaniluree) è in parte conservata, sia nella quantità sia nella dinamica, anche a vari anni dalla diagnosi, a dimostrazione che nelle cellule  $\beta$  dei pazienti T2DM i granuli che contengono l'ormone ci sono ancora (almeno in parte) e sono pronti ad essere rilasciati al di fuori della cellula, ma il glucosio non riesce a far giungere il giusto segnale.

Un ulteriore aspetto relativo al *deficit* funzionale della cellula  $\beta$  nel T2DM è l'aumentato rapporto tra proinsulina e insulina. Nelle cellule  $\beta$  la proinsulina è efficientemente convertita a insulina e C-peptide, cosicché nel granulo maturo la quantità di proinsulina è minima. Probabilmente perché sollecitata in maniera anomala, la cellula  $\beta$  nel T2DM non riesce a procedere adeguatamente alla

trasformazione della proinsulina, che viene rilasciata in quantità significativamente più elevata.

La trasfezione di linee cellulari di ratto produttrici di glucagone con il fattore di trascrizione *pancreatic duodenal homeobox factor (Pdx) 1* porta ad un fenotipo  $\beta$  cellulare che presenta alta sensibilità alla tossicità indotta dalle citochine ed è correlato con un'attivazione di MAP/SAPK dopo trattamento con IL-1 $\beta$ . Questo suggerisce che l'aumentata suscettibilità a stimoli pro-apoptotici potrebbe essere una diretta conseguenza del differenziamento delle  $\beta$  cellule; ciò potrebbe spiegare il motivo per cui le  $\beta$  cellule sono così vulnerabili agli stimoli citotossici e in particolare alle citochine [90].

## **Diabete e Apoptosi**

Evidenze crescenti collegano il T1DM ed il T2DM [83, 91-95]. Le classiche definizioni di Diabete di tipo 2 causato dall'azione difettosa dell'insulina e Diabete di tipo 1 dall'insufficiente produzione di tale ormone non rispecchiano del tutto la realtà. Questi meccanismi che portano a riduzione o delezione degli effetti biologici dell'insulina sono coinvolti nella patogenesi di entrambi i tipi di Diabete.

La morte delle  $\beta$  cellule pancreatiche per apoptosi è un denominatore comune nel T1DM e nel T2DM. Sebbene il Diabete di tipo 1 e quello di tipo 2 mostrino differenze eziologiche e patogenetiche, la distruzione di tali cellule avviene in entrambi i casi, portando alla manifestazione clinica di assoluta o relativa deficienza insulinica. La dipendenza da tale ormone pancreatico si manifesta rapidamente nel primo caso e in tempi più lunghi nel secondo: ciò riflette una differenza nella rapidità della distruzione delle  $\beta$  cellule ma non nella caratteristica della malattia, l'apoptosi di tale popolazione cellulare [94].

Dati la vitale necessità dell'insulina ma anche il rischio che comporta il suo rilascio in eccesso rispetto alla norma, sia la funzione che la massa delle  $\beta$  cellule sono strettamente regolate. Tali cellule, come detto precedentemente, sono sensibili a un variabile numero di stimoli apoptotici: citochine proinfiammatorie, ossido nitrico (NO), specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel T1DM, acidi grassi

liberi (FFA), glucosio, sulfanilurea e anilina nel T2DM [96, 97]. Ci sono evidenze sulla convergenza delle *pathways* dei comuni effettori inducenti l'apoptosi nelle  $\beta$  cellule, sia nella patogenesi del T1DM che nel T2DM [97] (Figura 12).

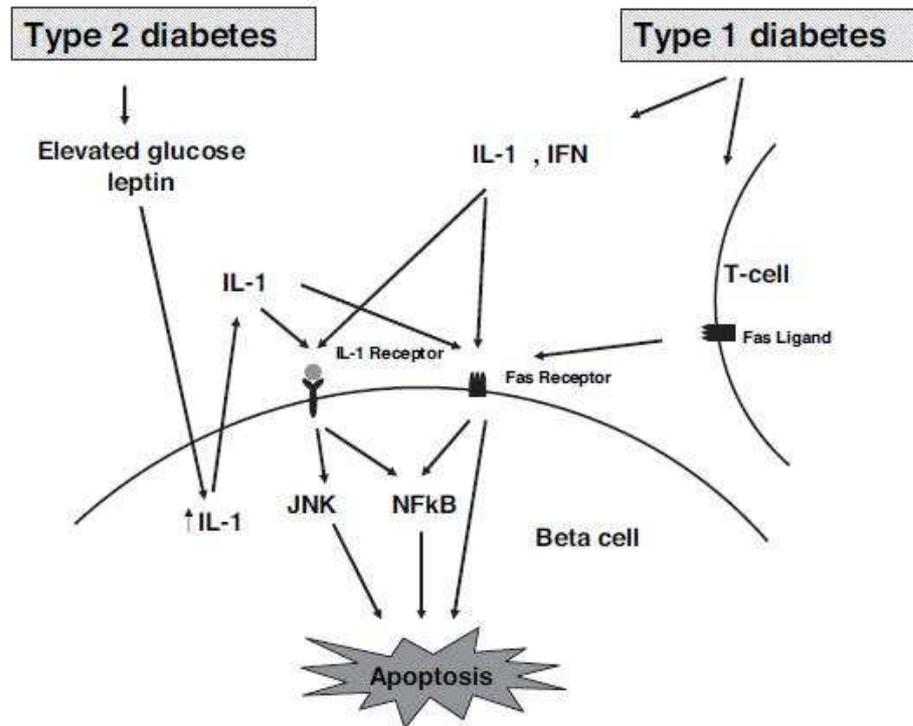


Figura 12 - T1DM: le citochine, in particolare IL-1 $\beta$ , inducono l'espressione di Fas nelle  $\beta$  cellule. Questo sensibilizza tali cellule alla morte mediata da Fas ligand. Le citochine infiammatorie (IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ ) possono anche indurre apoptosi tramite attivazione delle *pathways* NF $\kappa$ B e MAPK/JNK. T2DM: elevati livelli di glucosio e leptina inducono le cellule  $\beta$  a produrre IL-1 $\beta$ , che attiverà le medesime *pathways* descritte nel caso del Diabete di tipo 1 (Tratta da [96]).

L'apoptosi è un processo fisiologico, geneticamente controllato e altamente conservato nel corso dell'evoluzione che permette il corretto sviluppo embrionale ed il normale *turnover* tissutale nell'organismo adulto: svolge un ruolo centrale nella morfogenesi, nel differenziamento sessuale, nella formazione del sistema immunitario e del sistema nervoso; è anche coinvolto nell'eliminazione delle cellule danneggiate o anormali e nella difesa contro le infezioni.

È un processo attivo che conduce all'eliminazione di una cellula bersaglio senza indurre una risposta infiammatoria (diversamente da quanto avviene per la necrosi). La cellula viene condensata in "corpi apoptotici" (o *blebs*), che vengono prontamente rimossi da parte del sistema macrofagico.

Il fenomeno dell'apoptosi è caratterizzato dalla condensazione del citoplasma che porta alla riduzione del volume cellulare, condensazione della cromatina, frammentazione del nucleo, evaginazioni della membrana plasmatica che conferiscono alla cellula un aspetto a bolle (*blebs*); la cellula non subisce modificazioni degli organelli citoplasmatici. Lo stadio finale sarà la frammentazione della cellula nei corpi apoptotici, preceduta dall'esposizione sulla faccia esterna della membrana plasmatica della fosfatidilserina, un segnale necessario affinché avvenga la fagocitosi dei corpi apoptotici da parte di cellule specializzate.

Una delle funzioni dell'apoptosi all'interno di un organismo pluricellulare è quello di contribuire, insieme alla mitosi, al mantenimento dell'omeostasi numerica cellulare. È evidente che i due processi si devono equilibrare tra loro in ogni tessuto e in ogni momento della vita dell'organismo e che un loro squilibrio ha potenzialmente conseguenze molto gravi.

Nei mammiferi esistono due principali *pathways* che conducono alla morte cellulare per apoptosi: una attivata da "segnali di morte" che giungono a specifici recettori di superficie (via recettoriale o estrinseca), l'altra attivata da segnali endogeni e regolata dal mitocondrio (via mitocondriale o intrinseca) (Figura 13). Entrambe le *pathways* convergono nell'attivazione di proteasi specifiche, le caspasi, che determina una cascata di eventi proteolitici preordinati, che amplificano il segnale e portano alle tipiche modificazioni morfologiche dell'apoptosi.

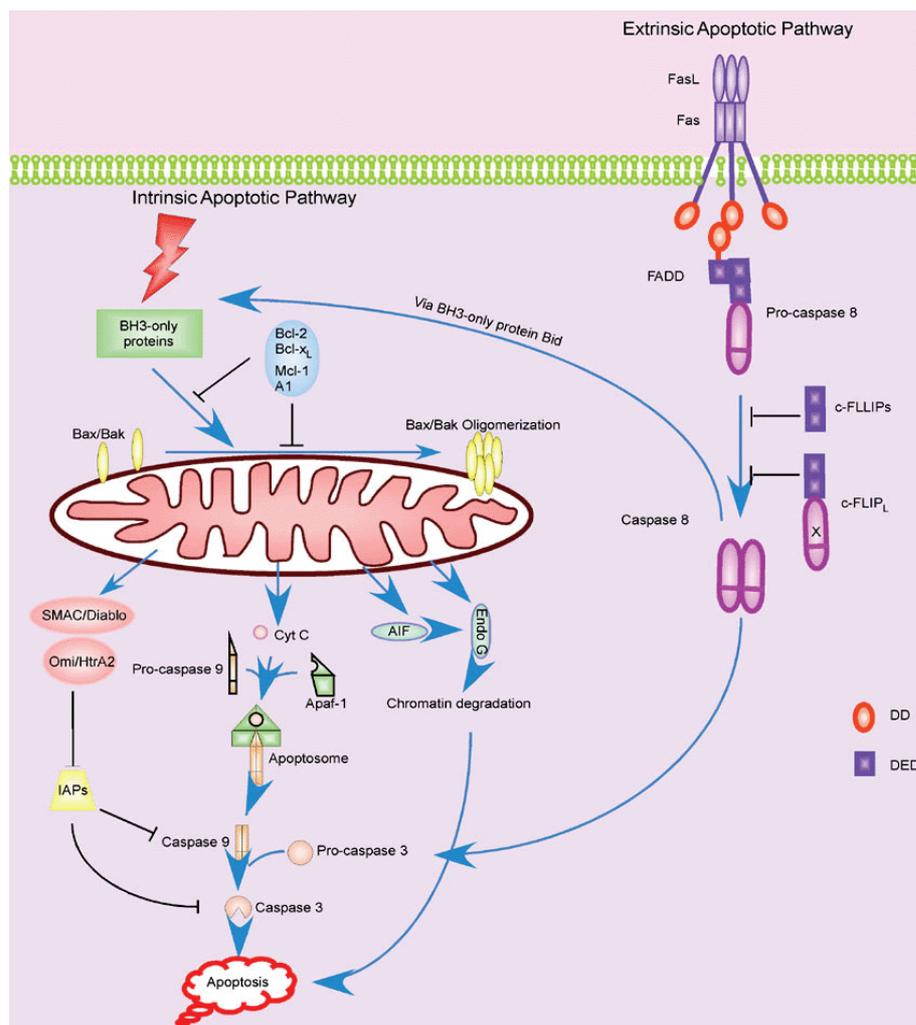


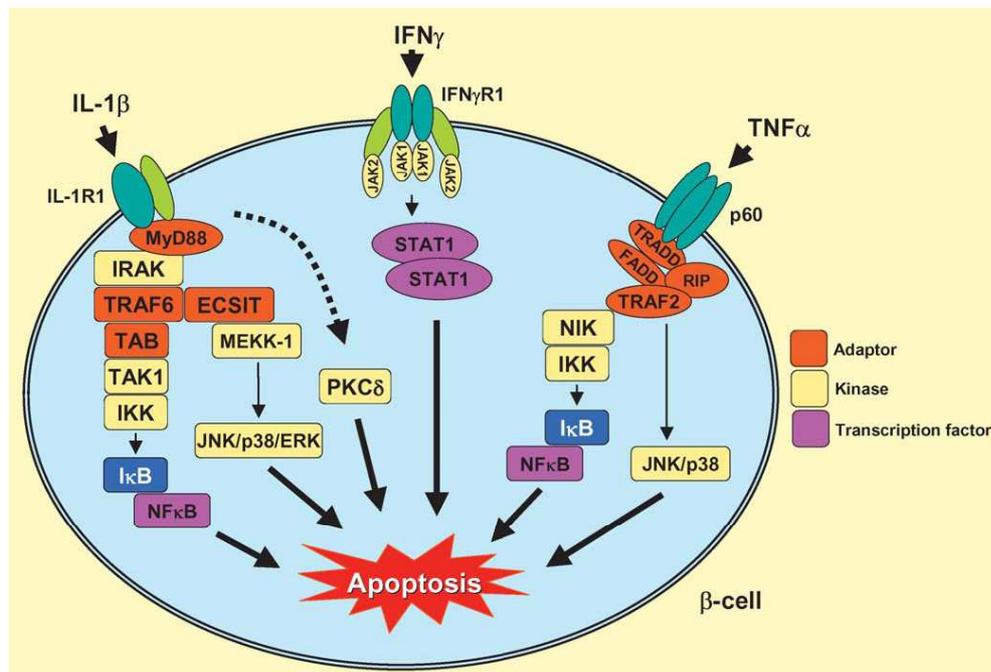
Figura 13 - Le vie estrinseca ed intrinseca dell'apoptosi.

## Le citochine

Le citochine proinfiammatorie, ed in particolare IL-1 $\beta$ , sono considerate importanti effettori patogenetici responsabili dell'induzione dell'apoptosi delle  $\beta$  cellule in entrambi i tipi di Diabete [97]. Tre principali citochine agiscono chiaramente in sinergia per indurre danneggiamento e morte di tale popolazione cellulare nel T1DM: IL-1 $\beta$  (*interleukin-1 $\beta$* ), TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) e IFN $\gamma$  (*interferon- $\gamma$* ).

IL-1 è secreta dai macrofagi e paradossalmente in qualche circostanza dalle  $\beta$  cellule [98]. Anche TNF $\alpha$  è secreto dai macrofagi, mentre IFN $\gamma$  è secreto dalle

cellule *T-helper*. IL-1 $\beta$  è la citochina più citotossica, sufficiente a causare l'inibizione delle  $\beta$  cellule e a promuoverne spesso l'apoptosi. Comunque, per ottenere *in vitro* apoptosi nelle  $\beta$  cellule viene generalmente utilizzato un *cocktail* di IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  e/o TNF $\alpha$  (Figura 14).



**Figura 14 - Signalling delle citochine (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) che inducono apoptosi nelle  $\beta$  cellule mediante l'attivazione delle *pathways* di NF $\kappa$ B e STAT1.**

Classicamente le citochine sono definite come molecole di segnalazione utilizzate nei meccanismi di comunicazione cellulare dal sistema immunitario. Recenti studi tuttavia hanno mostrato che virtualmente tutte le cellule, comprese quelle componenti le isole pancreatiche, sono potenziali produttori di citochine. Di conseguenza, una risposta infiammatoria può essere iniziata da qualsiasi tessuto e non richiede un difetto immunologico o l'identificazione di un particolare agente infettivo da parte delle cellule del sistema immunitario; la produzione di citochine non è quindi limitata esclusivamente ad un meccanismo difensivo e può sottintendere il tentativo di rispondere ad un'azione perturbante quale ad esempio un processo di stress metabolico.

Crescenti evidenze puntano al ruolo delle citochine come regolatori chiave dei cambiamenti adattativi delle isole pancreatiche soggette ad una elevata domanda metabolica; in questo contesto alcune citochine determinano ad esempio la proliferazione delle  $\beta$  cellule ed un' aumentata produzione di insulina, mentre altre regolano la massa delle  $\alpha$  cellule e il rilascio del glucagone. In ogni caso se lo stress eccede il potenziale adattativo operato dalle isole questa risposta infiammatoria coordinata e vantaggiosa può diventare deleteria per il sistema.

Gli effetti citotossici esercitati sulle  $\beta$  cellule appaiono essere il risultato di uno scontro tra l'azione anti-apoptotica e quella pro-apoptotica di geni regolati dalle citochine, dipendente dalla loro concentrazione e dalla durata dell'esposizione.

Il danno di funzione alle  $\beta$  cellule pancreatiche è indotto già dopo una breve esposizione alle citochine, ed è caratterizzato da una diminuita espressione di importanti geni come INS (*insulin*), GLUT2 (*glucose transporter 2*), PC1/3 (*proconvertase*) e del fattore di trascrizione specifico delle  $\beta$  cellule pancreatiche Pdx-1 (*pancreatic duodenal homeobox-1*) [99, 100].

## **Meccanismi molecolari nella distruzione mediata dalle citochine delle $\beta$ cellule**

### ***IL-1 signaling***

La famiglia di recettori e ligandi IL-1 è associata ai processi infiammatori più di qualsiasi altra famiglia di citochine. Degli 11 membri che la compongono, l'interleuchina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) è risultata il principale *target* terapeutico per un numero sempre crescente di condizioni infiammatorie denominate malattie "autoinfiammatorie".

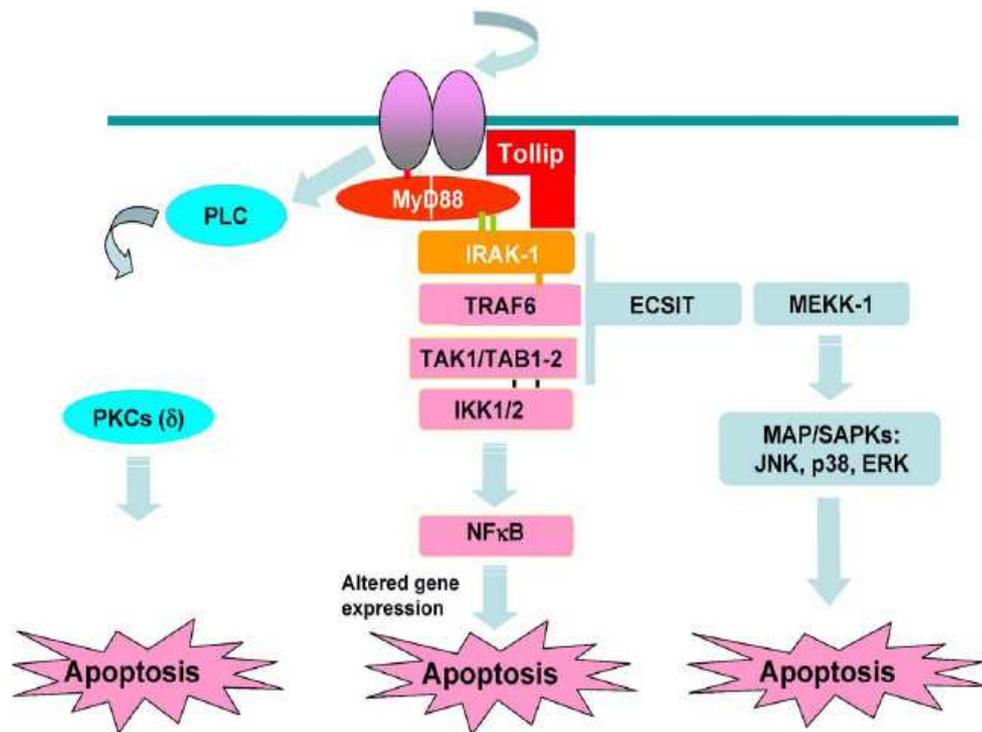
L'IL-1 $\beta$  esercita sia effetti positivi che negativi su vari tipi cellulari, comprese le  $\beta$  cellule [101]. La doppia azione di questa citochina sull'espressione dei suoi geni *targets* è largamente dipendente dalle dinamiche di attivazione di NF $\kappa$ B, il maggiore effettore a valle del recettore per la citochina, e più specificatamente dall'azione regolatoria operata da I $\kappa$ B, così come dalla *pathway* di ERK/MAPK

[102]. Il doppio ruolo di IL-1 $\beta$  sul rilascio di insulina è noto da tempo. L'attivazione transiente dei recettori delle citochine infiammatorie ed in particolare del recettore IL-1R (IL-1 *receptor*) stimola infatti la trascrizione della pre-proinsulina e la sua secrezione, e la proliferazione delle  $\beta$  cellule, consentendo così all'organismo di rispondere efficacemente all'aumentata richiesta di insulina che si instaura in uno stato di infiammazione sistemica e di stress associato ad alti livelli di IL-1 circolanti.

In tale contesto cellulare, le dinamiche di attivazione di NF $\kappa$ B e l'interazione con ERK1/2 determinano se il ruolo della citochina sarà anti- o pro-apoptotico. Basse concentrazioni di IL-1 $\beta$  ed esposizioni limitate nel tempo portano ad un aumento della secrezione insulinica, replicazione delle  $\beta$  cellule e diminuzione dell'apoptosi. L'esatto opposto si verifica dopo lunga esposizione ad alte concentrazioni di IL-1 $\beta$ . È ipotizzabile che in condizioni fisiologiche l'IL-1 $\beta$  prodotta localmente dalle cellule insulari, comprese le  $\beta$  cellule, giochi un importante ruolo nel mantenimento di massa e funzione cellulare, mentre elevati livelli di IL-1 $\beta$  associati con infiammazione delle isole portano le cellule  $\beta$  a diminuzione della loro funzione e massa nel Diabete.

L'apoptosi delle  $\beta$  cellule indotta dall'IL-1 $\beta$  è il risultato di una complessa *network* di eventi determinata dal legame dell'interleuchina al suo specifico recettore, IL-1R. Quando IL-1 $\beta$  si lega al recettore vengono reclutate diverse proteine adattatrici e chinasi: la cascata di eventi converge infine nell'attivazione di due principali *pathways* molecolari, MAPK e NF $\kappa$ B, le quali determinano i cambiamenti nell'espressione genica che stanno alla base delle disfunzioni che interessano le  $\beta$  cellule ed innescano lo sviluppo del programma apoptotico.

Oltre che mediante attivazione di queste due principali *pathways*, l'interleuchina-1 $\beta$  può determinare la morte delle  $\beta$  cellule anche attivando PLC (*phospholipase C*) e di conseguenza PKC, in particolare PKC $\delta$ , che è stato dimostrato essere coinvolta nell'apoptosi delle  $\beta$  cellule (Figura 15).



**Figura 15 - Principali *pathways* molecolari innescate dal legame di IL-1 $\beta$  al recettore e determinanti la morte delle  $\beta$  cellule pancreatiche per apoptosi (Tratta da [89]).**

Un evento (tardivo) indotto da IL-1 $\beta$  che ha suscitato molto interesse è l'induzione di iNOS (*inducible nitric oxide synthase*). La stimolazione di tale enzima avviene approssimativamente dopo 4-6 ore e risulta in una massiva produzione di NO. Sebbene il preciso contributo di NO nella morte delle cellule  $\beta$  rimanga poco chiaro, si ritiene che sia responsabile degli effetti deleteri di IL-1 $\beta$  nelle  $\beta$  cellule murine, mentre non è necessario per l'apoptosi di tali cellule nell'uomo.

NF $\kappa$ B sembra essere essenziale per l'espressione di iNOS indotto dalle citochine sia nei roditori che nell'uomo, anche se il promotore di iNOS contiene molti potenziali siti di legame per altri fattori di trascrizione inclusi *activator protein 1* (AP-1) e *signal transducer and activator of transcription* (STAT), suggerendo che un numero di differenti *pathways* possano regolare la sua trascrizione. A supporto di tale ipotesi il fatto che iNOS non può essere indotto solamente da IL-1 $\beta$  nelle isole umane, ma richiede un *cocktail* di citochine [90].

### **IFN $\gamma$ signaling**

La trasduzione del segnale da parte di IFN $\gamma$  sembra essere più lineare e coinvolge l'attivazione delle *pathways* di JAK e STAT-1. STAT-1 si lega a membri della famiglia di fattori di trascrizione *interferon regulatory factor* (IRF) attivandoli (è stato dimostrato che IFN $\gamma$  induce sovraespressione di IRF-1 nelle  $\beta$  cellule). IFN $\gamma$  non stimola traslocazione nucleare e legame con il DNA di NF $\kappa$ B nelle cellule  $\beta$ , nè influisce sull'attivazione di NF $\kappa$ B da parte di IL-1 $\beta$ . In alcune cellule IFN $\gamma$  attiva ERK-MAPK attraverso JAK, ma ciò non sembra avvenire nelle  $\beta$  cellule: tale citochina infatti può portare a decremento dell'attività costitutiva di MAP/SAPK nelle isole di ratto [90].

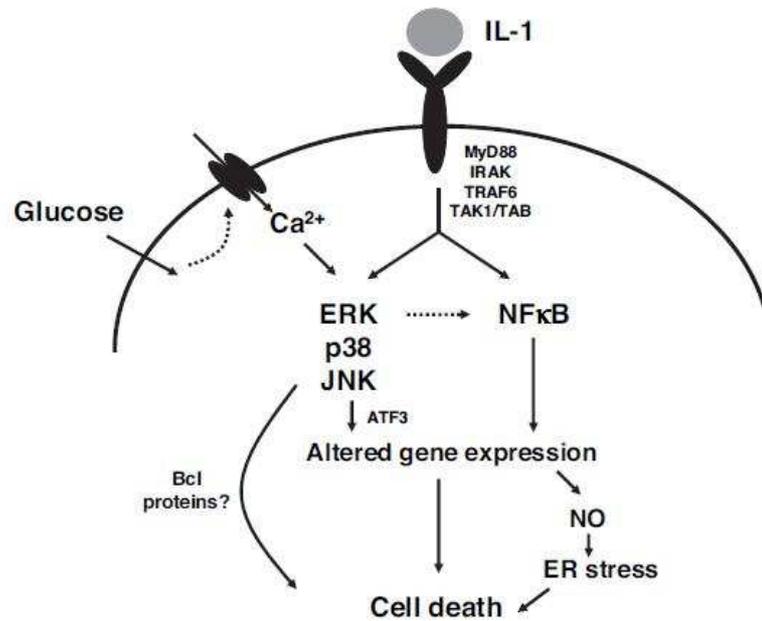
### **TNF $\alpha$ signaling**

La *pathway* di segnalazione del TNF coinvolge due differenti recettori, p60 (che contiene nella sua porzione intracellulare un dominio di morte) e p80. Il dominio di morte di p60 interagisce con lo stesso dominio presente nel recettore TRADD, che a sua volta recluta FADD. La cascata di eventi converge infine nell'attivazione di fosfolipasi e sfingomielinasi, attivazione di NF $\kappa$ B e stimolazione delle *pathways* JNK e p38 MAP/SAPK. TNF è in grado di avviare direttamente il programma apoptotico mediante una cascata di caspasi innescata dal clivaggio della caspasi 8 da parte di FADD. Comunque l'attivazione delle caspasi da parte di TNF $\alpha$  non sembra essere indotta nelle cellule  $\beta$ , cosicché TNF $\alpha$  da solo non è sufficiente a causare danno alla funzione  $\beta$  cellulare. Al contrario, nelle isole di ratto è stata dimostrata attivazione di MAP/SAPK da parte di TNF $\alpha$  e induzione di NF $\kappa$ B.

IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  agiscono sinergicamente aumentando gli effetti citotossici dell'IL-1 $\beta$  mediante la via MAP/SAPK nelle cellule  $\beta$  di ratto [103].

### **MAP/SAPK pathway**

È stato dimostrato che nelle  $\beta$  cellule pancreatiche IL-1 $\beta$  attiva tutti e tre i principali membri della famiglia MAPK: ERK, p38 e JNK (*c-jun N-terminal kinase*) (Figura 16).



**Figura 16 - Schema degli eventi molecolari che si verificano nelle  $\beta$  cellule pancreatiche dopo il legame di IL-1 $\beta$  al suo specifico recettore (Tratta da [104]).**

Mediante approcci farmacologici si è evidenziato come p38 ed ERK agiscono insieme per determinare l'espressione IL-1 $\beta$ -indotta di iNOS, l'enzima responsabile della produzione di ossido nitrico (NO) il quale contribuisce fortemente alla morte cellulare per apoptosi mediata dalle citochine nelle  $\beta$  cellule di roditore [105]. Studi successivi hanno mostrato che il parziale blocco di ERK o di p38 diminuisce l'apoptosi indotta da citochine in tali cellule.

ERK è inoltre essenziale per la trans-attivazione di NF $\kappa$ B indotta da citochine dal momento che è coinvolto nella fosforilazione della subunità p65 dello stesso NF $\kappa$ B, anch'esso implicato nell'espressione di iNOS [106]. Il legame che intercorre tra p38 ed NF $\kappa$ B rimane invece poco chiaro.

Per quanto riguarda il ruolo di JNK, esperimenti di trasfezione hanno mostrato che l'inibizione della *pathway* di tale membro della famiglia MAPK conferisce

protezione quasi totale dall'apoptosi indotta da IL-1 $\beta$  nelle cellule secernenti insulina [107].

Un potenziale meccanismo attraverso cui JNK determinerebbe l'apoptosi delle  $\beta$  cellule pancreatiche vedrebbe l'attivazione del fattore di trascrizione ATF3 (*activating transcription factor 3*), un membro della famiglia ATF/CREB (*c-Amp responsive element binding protein*): l'induzione di ATF3 stimolata dalle citochine è ridotta quando è contemporaneamente inibito JNK, e le isole pancreatiche di topi *knockout* per ATF3 sono meno sensibili alla morte cellulare [108].

Uno studio recente suggerisce che JNK è anche un componente critico nella soppressione della trascrizione del gene dell'insulina indotta da stress ossidativo. Questi studi supportano un ruolo chiave per JNK nella regolazione della funzione e morte delle cellule  $\beta$ .

## NF $\kappa$ B

Il fattore di trascrizione NF $\kappa$ B gioca un ruolo chiave in un'ampia varietà di processi fisiologici e patologici. È stato dimostrato che tale complesso controlla l'espressione di numerosi geni coinvolti nella risposta cellulare allo stress, nella proliferazione, nella sopravvivenza e nell'apoptosi [109]. Nelle  $\beta$  cellule pancreatiche è stato dimostrato che l'IL-1 $\beta$ , da sola o in sinergia con IFN $\gamma$ , induce la traslocazione nucleare di NF $\kappa$ B. A livello del nucleo esso regolerebbe l'attività di numerosi geni la cui espressione risulta alterata a seguito del trattamento con citochine; tra questi svolgono un ruolo di primo piano nell'induzione dello stato flogistico il gene iNOS, il recettore Fas che a seguito dell'interazione con Fas *ligand* induce l'apoptosi, la chemochina MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) che attira le cellule mononucleate al sito dell'insulite e la proteina *scavenger* di radicali liberi MnSOD (*Mn*<sup>2+</sup> *superoxide dismutase*) che potrebbe partecipare alla difesa delle  $\beta$  cellule.

Il ruolo di NF $\kappa$ B nella morte delle  $\beta$  cellule innescata dalle citochine è stato ampiamente studiato, principalmente esprimendo in tali cellule una forma non degradabile di I $\kappa$ B, inibitore di NF $\kappa$ B, chiamato "I $\kappa$ B *super-respressor*".

L'infezione di colture primarie di  $\beta$  cellule di ratto con adenovirus codificante per il repressore I $\kappa$ B determinava infatti un blocco nell'espressione genica citochino-mediata di iNOS, Fas e MnSOD ed una sostanziale riduzione nell'apoptosi indotta da un *mix* di IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  [110]. Similmente, esperimenti condotti su isole pancreatiche umane hanno dimostrato che l'inibizione di NF $\kappa$ B protegge le cellule dall'apoptosi stimolata da IL-1 $\beta$  e Fas-dipendente [111]. L'utilizzo di I $\kappa$ B e di tecnologie *microarray* ha rivelato che cambiamenti indotti dalle citochine in molti geni sono dipendenti da NF $\kappa$ B nelle cellule  $\beta$ . Tale fattore di trascrizione è quindi un importante punto di controllo nel destino delle  $\beta$  cellule a seguito di un attacco infiammatorio.

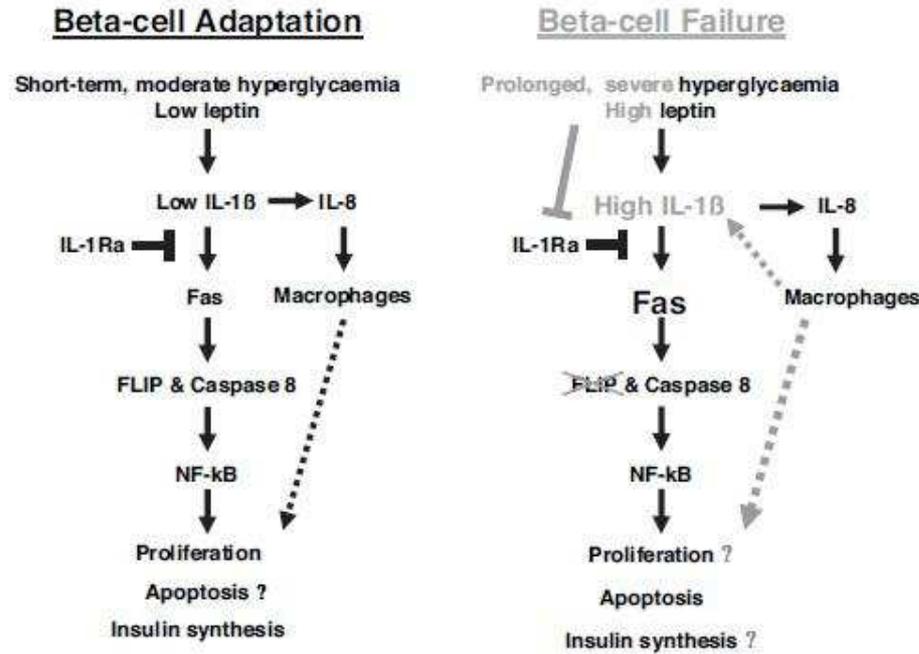
Contrariamente a quanto mostrato in diversi esperimenti *in vitro* che associano ad NF $\kappa$ B una funzione pro-apoptotica, altri studi indicano che la sua inattivazione in isole pancreatiche di topo e in cellule di insulinoma potenzia la morte cellulare indotta dalle citochine infiammatorie TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  [108, 112]. In linea con queste scoperte, l'espressione  $\beta$  cellula-specifica del super-repressore I $\kappa$ B in topi NOD accelera significativamente lo sviluppo del Diabete, indicando come NF $\kappa$ B potrebbe avere un ruolo protettivo nel T1DM.

L'esatto ruolo di NF $\kappa$ B nel controllare l'apoptosi delle  $\beta$  cellule sembra essere quindi strettamente dipendente dal contesto sperimentale e dalla specifica combinazione di citochine utilizzata.

### **Fas-FLIP pathway**

Il recettore Fas è un membro della superfamiglia di recettori di morte TNF, che presenta un dominio di morte nella sua porzione intracellulare responsabile per la trasduzione del segnale apoptotico. La sua attivazione è stimolata da Fas *ligand* (FasL). Tale interazione porta ad una cascata di eventi che converge infine nell'attivazione della caspasi 8 e alla morte cellulare per apoptosi. Normalmente le  $\beta$  cellule non esprimono Fas ma dopo esposizione a citochine diventano suscettibili all'apoptosi indotta da FasL. L'esposizione delle  $\beta$  cellule umane ad alte concentrazioni di glucosio induce sovra-espressione di Fas.

FLIP (*FADD like IL-1 converting enzyme inhibitory protein*), inibitore della caspasi 8, sembra dirigere il *signaling* di Fas dall'apoptosi alla proliferazione. Nelle  $\beta$  cellule umane FLIP è costitutivamente espresso ma la presenza eccessiva di glucosio o leptina determina un decremento nella sua espressione e indirizza la *pathway* di Fas verso la distruzione delle  $\beta$  cellule ed il Diabete (Figura 17).



**Figura 17 - Meccanismi molecolari fisiologici e patologici innescati nei confronti delle  $\beta$  cellule dall'IL-1 $\beta$  in risposta alle sue concentrazioni (Tratta da [104]).**

La *pathway* Fas-FLIP regola anche la funzione secretoria delle  $\beta$  cellule (l'iperglicemia cronica infatti oltre che agire sul *turnover*  $\beta$  cellulare inibisce il rilascio di insulina [113]. L'espressione di Pdx-1, un fattore di trascrizione specifico delle  $\beta$  cellule che regola l'espressione genica dell'insulina e il metabolismo mitocondriale, diminuisce nelle  $\beta$  cellule Fas-deficienti. Come conseguenza l'insulina e la produzione di ATP sono severamente ridotte e solo in parte compensate dall'imponente aumento della massa delle  $\beta$  cellule. La sovraespressione di FLIP incrementa l'attività di NF $\kappa$ B; questi eventi determinano

un aumento di Pdx-1 e della produzione di insulina, indipendentemente dai cambiamenti nel *turnover* cellulare.

Sembra quindi che Fas non sia semplicemente un recettore di morte ma un regolatore chiave del ciclo cellulare che può indurre morte o proliferazione in dipendenza da cofattori intracellulari.

## **Citochine pro-infiammatorie e apoptosi**

La combinazione di risultati sperimentali, epidemiologici e analisi computazionali ha portato di recente all'identificazione da parte del nostro gruppo di ricerca di un *set* di geni appartenenti al Macchinario Apoptotico (MA) coinvolti nella patogenesi del Diabete Mellito. Attraverso tecnologia *high-throughput* (HT) abbiamo analizzato le variazioni del trascrittoma e di nodi proteici critici del MA in due linee cellulari murine derivanti dalle cellule  $\alpha$  e  $\beta$  di isole pancreatiche di topo dopo loro esposizione ad un *cocktail* di citochine (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) in un *time course* di 48h, mimando *in vitro* gli eventi molecolari che coinvolgono *in vivo* i due tipi cellulari più rappresentati delle isole pancreatiche durante le fasi precoci di insulite. I geni candidati sono risultati essere: DDIT3, MAP3K14, STAT3 e diversi membri del complesso NF $\kappa$ B. In particolare, la ricostruzione delle corrispondenti *networks* regolatorie ha evidenziato il ruolo critico delle *pathways* di NF $\kappa$ B, P53, STAT3, insieme ai loro regolatori a monte, nella risposta differenziale dei due fenotipi cellulari alle citochine [Barbagallo *et al.*, in preparazione].

Il ruolo delle citochine pro-infiammatorie nella regolazione genica ed in particolare nell'espressione di geni pro-apoptotici è stato di recente dimostrato anche da Thomas Mandrup-Poulsen *et al.* in un lavoro del 2009 [114]: si evidenzia che l'azione concertata delle citochine pro-infiammatorie IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  su cellule INS-1 di ratto e su isole pancreatiche umane e di ratto induce l'attivazione di Bad (un evento che inibisce l'attività delle proteine anti-apoptotiche Bcl-xL e Bcl-2), il rilascio Bax-dipendente del citocromo c, stress mitocondriale, attivazione delle caspasi 9 e caspasi 3 e frammentazione del DNA.

Le citochine determinerebbero anche l'espressione di geni coinvolti nella risposta infiammatoria in relazione all'espressione differenziale di IRF-7 (*IFN regulatory factor-7*), la sottoespressione di geni coinvolti nel mantenimento del fenotipo  $\beta$  cellulare, nella progressione del ciclo cellulare e nella proliferazione [115].

È stata inoltre riscontrata un'espressione differenziale di più di 20 geni coinvolti nello *splicing* che inducono regolazione post-trascrizionale in più di 50 geni risultati differenzialmente espressi dopo il trattamento con il *mix* citochinico.

Oltre a geni coinvolti direttamente nel processo apoptotico, nei meccanismi di *splicing*, nella proliferazione e nella risposta infiammatoria, una classe di piccoli RNA non codificanti, i microRNA, subirebbe cambiamenti nell'espressione in risposta agli stimoli operati dalle citochine pro-infiammatorie sia *in vitro* che *in vivo* [116].

## **Nuovi regolatori dell'espressione genica**

L'attenzione della comunità scientifica nel corso degli anni si è focalizzata sempre più sullo studio dei meccanismi molecolari che stanno alla base delle patologie e verso il disegno di nuove strategie terapeutiche.

E' divenuto evidente che molecole regolatorie agenti a monte o in associazione ai fattori di trascrizione determinano le alterazioni nell'espressione genica osservate nelle  $\beta$  cellule non funzionali e che probabilmente sono coinvolte nello sviluppo del Diabete: i microRNA stanno emergendo come nuovi regolatori della secrezione e dell'azione insulinica e sono stati definiti come "ribo-regolatori dell'omeostasi del glucosio" [117].

### **I microRNA**

Negli ultimi anni diversi studi hanno portato alla scoperta all'interno delle cellule eucariotiche di numerosi piccoli RNA endogeni non codificanti a singolo filamento, di lunghezza compresa tra i 21 e i 25 nucleotidi, chiamati microRNA (miRNA) il cui ruolo fondamentale è quello di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale; essi svolgono la loro azione appaiandosi parzialmente ad una o più sequenze nel 3'UTR (*3' untranslated*

*region*) di un mRNA bersaglio (*target*) al fine di determinarne la degradazione o la repressione trascrizionale [118].

I miRNA sono tra le più abbondanti molecole regolative presenti nelle cellule animali. I membri fondatori della famiglia dei miRNA, *lin-4* e *let-7*, sono stati identificati nel 1993 in *C. elegans* dove controllano i tempi dello sviluppo larvale [119, 120]. Da allora, il numero dei miRNA conosciuti ha continuato a crescere ed è diventato sempre più evidente il ruolo fondamentale di queste molecole in svariati processi biologici.

La conservazione evolutiva di molti miRNA, anche attraverso i phyla, suggerisce che queste molecole abbiano un ruolo antico e importante nell'evoluzione e nella regolazione di processi cellulari come l'apoptosi, la crescita cellulare, il *signaling*, il controllo dello sviluppo embrionale, la risposta a particolari condizioni di stress ambientale, il differenziamento neuronale, il differenziamento degli adipociti, la secrezione dell'insulina, il differenziamento delle  $\beta$  cellule, il destino delle cellule staminali neuronali, il controllo della funzione immunitaria: è chiaro come la disregolazione di questi RNA non codificanti possa essere implicata nell'insorgenza di malattie come neoplasie e Diabete [121].

Molti miRNA sono espressi in maniera differenziale nel corso dello sviluppo e nel differenziamento [122] e si ritiene che ogni tipo cellulare possa avere un suo unico profilo di espressione di miRNA.

Dai risultati ottenuti grazie ad approcci computazionali si stima che i geni che codificano per i miRNA costituiscano 1-5% dei geni contenuti nel genoma, e che circa il 30% dei geni codificanti proteine sia regolato da questi RNA [121].

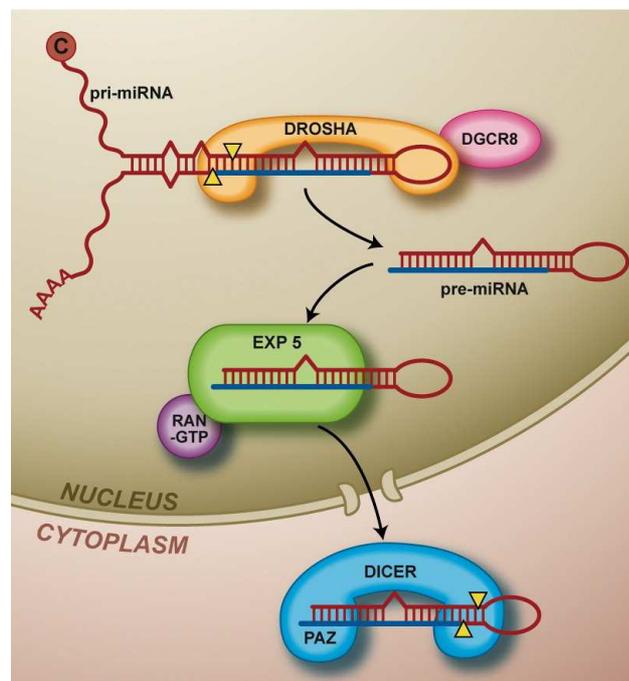
### **Biogenesi dei microRNA**

Affinché i microRNA possano svolgere la loro funzione è necessario che subiscano un processo di maturazione, un meccanismo altamente compartimentalizzato che prende inizio a livello nucleare per poi concludersi nel citoplasma, e che è costituito da numerosi passaggi che lo rendono talmente complesso da essere considerato una vera e propria *pathway*.

Negli ultimi anni i meccanismi molecolari che stanno alla base della biogenesi dei microRNA sono stati oggetto di intense ricerche [123].

I miRNA sono trascritti nel nucleo dalla RNA polimerasi II o, in alcuni casi, dalla RNA polimerasi III, generando trascritti primari detti pri-miRNA, normalmente lunghi alcune chilobasi che si ripiegano a formare strutture a forcina (*hairpin*) a doppio filamento: il pri-miRNA possiede un *loop* ed uno *stem* a doppio filamento di circa 33 coppie di basi complementari, dalla cui estremità sporgono due lunghi frammenti a singolo filamento (Figura 18).

Il pri-miRNA viene processato da una RNase III nucleare ad attività endonucleasica, Drosha, una grossa proteina di circa 160kDa, che agendo in cooperazione con il cofattore DGCR8 (*Di George syndrome critical region gene 8*) si lega alla struttura a *stem-loop*, effettuando dei tagli in siti specifici che determinano il rilascio del pre-miRNA. Questa fase specificatamente nucleare prende il nome di *cropping*. Il pre-miRNA, lungo circa 60-80 nucleotidi, possiede uno *stem* a doppio filamento di circa 33 nucleotidi complementari tra loro ed un *loop*, ed è caratterizzato da 2-3 nucleotidi sporgenti al 3' ed un gruppo fosfato al 5' [123-125] (Figura 18).

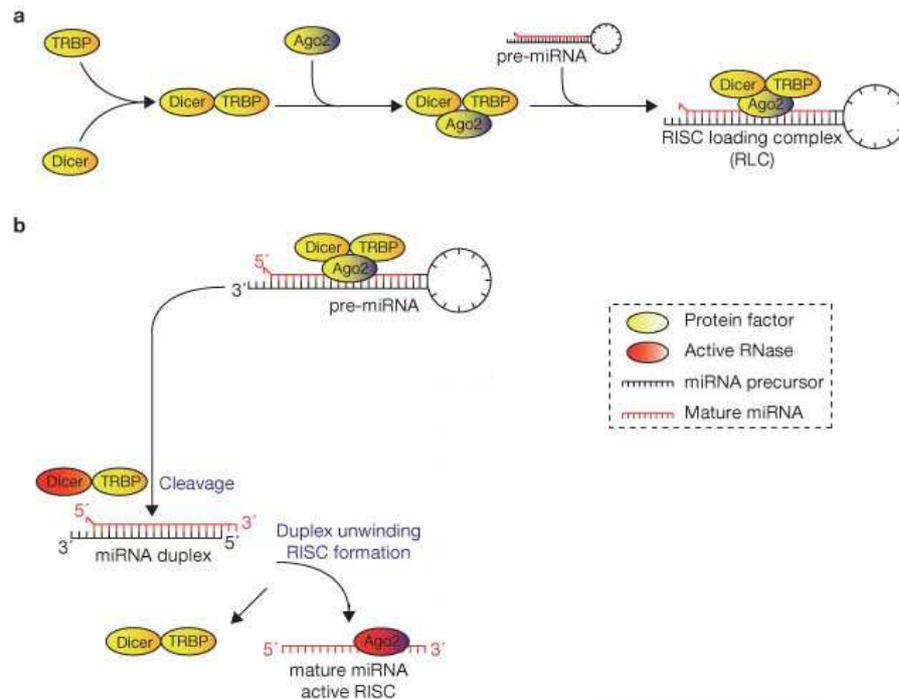


**Figura 18 - Fasi principali della biogenesi dei miRNA. Il miRNA maturo è indicato in blu mentre i triangoli gialli indicano i siti di taglio (Tratta da [126]).**

Il pre-miRNA viene successivamente esportato dal nucleo al citoplasma, dove subisce un ulteriore clivaggio specifico, denominato *dicing*, dal nome dell'endonucleasi che entra in gioco, Dicer.

L'Esportina-5 (Exp5), un membro della famiglia dei trasportatori nucleari che funziona in associazione alla GTPasi Ran [127], è la proteina che trasporta i pre-miRNA fuori dal nucleo.

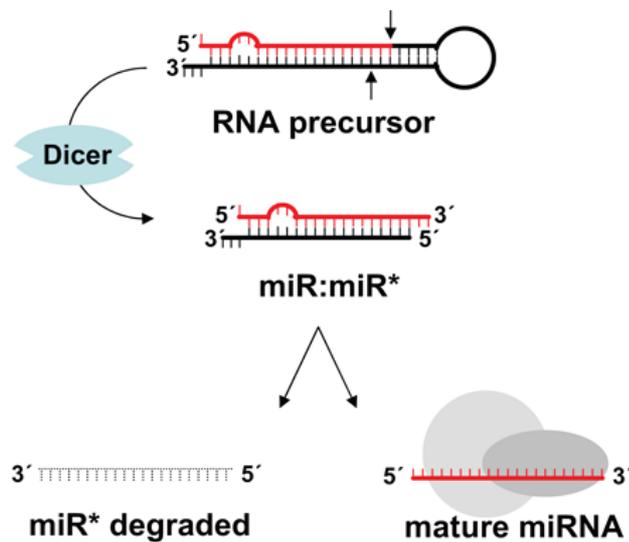
Una volta nel citoplasma, tali molecole vengono processate da un complesso multiproteico che prende il nome di *RISC loading complex* (RLC) e che comprende l'RNasi Dicer, la proteina TRBP legante l'RNA (*trans-activation response (TAR) RNA-binding protein*) e Ago2 (*Argonaute-2*) [128-130] (Figura 19).



**Figura 19 - (a) Dicer e TRBP interagiscono prima di reclutare Ago2 con il quale formano un complesso ternario che si lega al pre-miRNA, il *RISC loading complex* (RLC). (b) Dopo aver legato il pre-miRNA, Dicer rilascia il miRNA duplex.**

Dicer è una grossa proteina di circa 200 kDa, coinvolta esclusivamente nel processo di maturazione del pre-miRNA: quest'ultimo viene tagliato generando un microRNA duplex di circa 22 nucleotidi, con 2 nucleotidi protrudenti alle

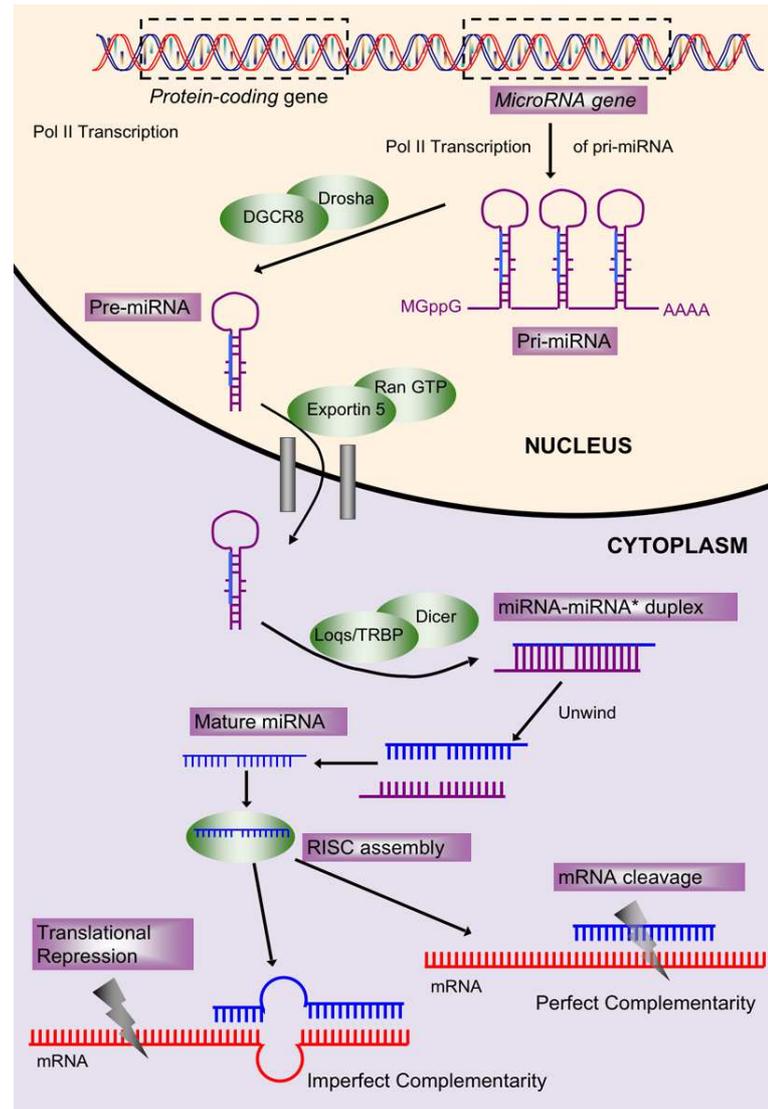
rispettive estremità 3'. Dopo il clivaggio, Dicer e TRBP si dissociano dal complesso e il *duplex* di miRNA viene separato in due filamenti: quello funzionale, che è complementare all'mRNA *target*, viene caricato sulla proteina Ago2 e successivamente incorporato nel complesso del RISC (*miRNA-containing RNA-induced silencing complex*), effettore della repressione mediata da microRNA [129], l'altro, chiamato miRNA\* *strand*, viene invece solitamente degradato (Figura 20).



**Figura 20 - Selezione del filamento che costituirà il miRNA maturo.**

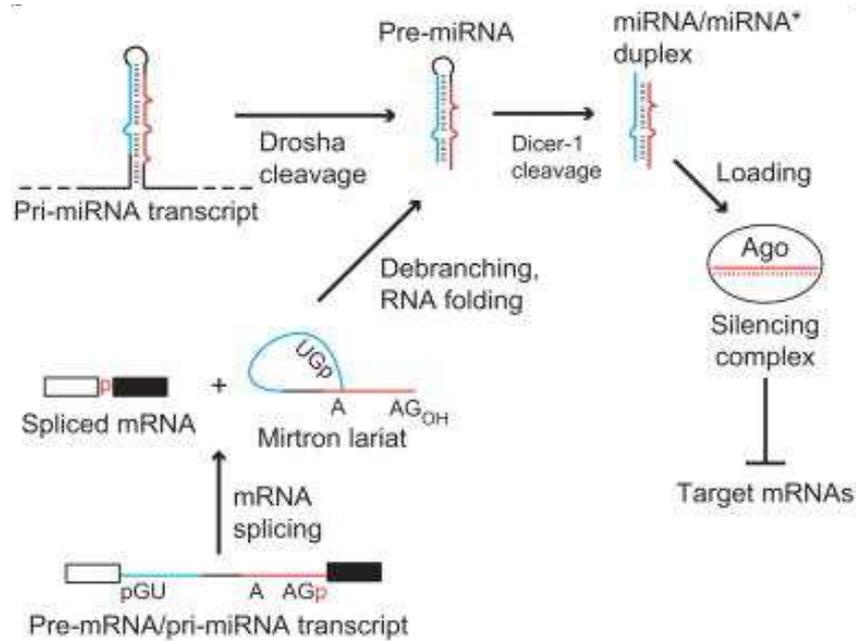
I due filamenti del *duplex* presentano una stabilità differente da un punto di vista termodinamico a livello dell'estremità 5'; sebbene il miRNA maturo possa essere localizzato in uno o nell'altro filamento in modo indistinto, esso si origina quasi sempre dal filamento che presenta l'estremità 5' più instabile [131]. Nei rari casi in cui le due estremità 5' presentano una stabilità paragonabile, ognuno dei due filamenti può con la stessa probabilità andare a costituire il miRNA maturo dotato di attività biologica [124, 129, 132].

La figura 21 riassume schematicamente la biogenesi dei miRNA.



**Figura 21 - Biogenesi e meccanismo d'azione dei microRNA.**

Sebbene sia solitamente questa la *pathway* biogenetica che porta alla produzione dei miRNA, il processamento mediato da Drosha non è uno *step* obbligatorio. È stato infatti scoperto di recente che alcuni miRNA sono generati a partire da corte sequenze introniche aventi la capacità di formare strutture a forcina, i *mirtrons*: questi usano lo *splicing* come meccanismo alternativo per *bypassare* la normale *pathway* biogenetica attuata da Drosha (Figura 22) [133].



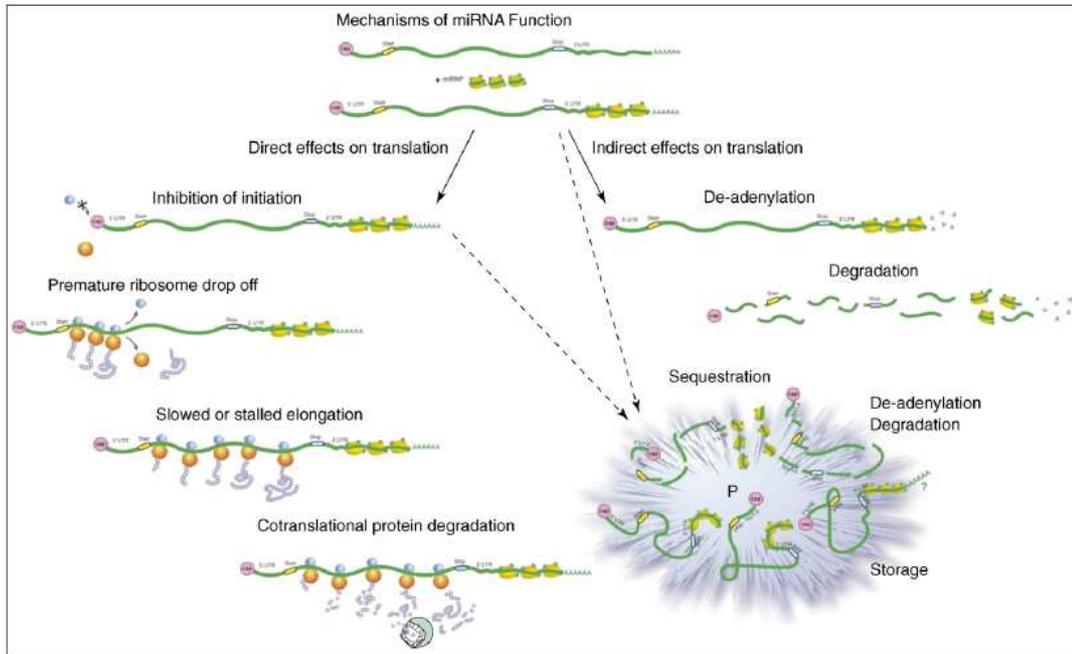
**Figura 22 - Pathway alternativa in cui lo *splicing*, piuttosto che Drosha, da origine al pre-miRNA (Tratta da [133]).**

### Meccanismo d'azione dei microRNA

Il meccanismo molecolare attraverso il quale il RISC regola l'espressione dei geni bersaglio è oggetto di intense ricerche. Nei mammiferi la chiave di tale meccanismo d'azione dei microRNA è la complementarità tra una specifica regione presente nella loro sequenza (di circa 2-7 nucleotidi, chiamata *seed*) e il 3'UTR dell'mRNA *target*, che può contenere siti multipli di legame per il microRNA (recentemente diversi studi hanno identificato siti di legame dei miRNA anche a livello di regioni 5'UTR o in regioni codificanti); ciò determina l'inibizione della traduzione o la degradazione dell'mRNA a seconda che il *match* sia perfetto o meno: nel caso di perfetta complementarità il miRNA determina la degradazione dell'mRNA mediata dalle proteine AGO, che secondo alcuni studi avverrebbe nei cosiddetti *p-bodies* (*processing Bodies*), in cui si accumulerebbero ingenti quantità di mRNA non tradotti, proteine Argonata, microRNA maturi, e repressori trascrizionali [134-136].

Un *match* imperfetto comporta invece l'inibizione della traduzione dell'mRNA *target* attraverso repressione allo stadio di inizio, repressione dell'allungamento

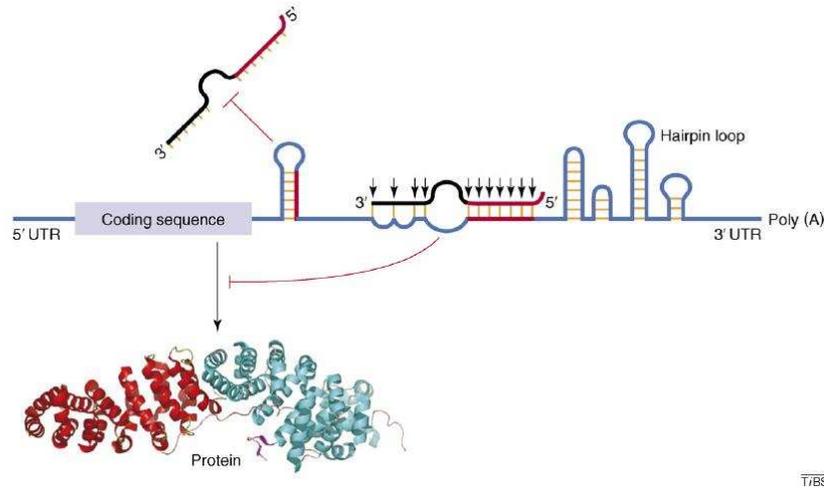
della catena proteica o della terminazione della traduzione, o mediante proteolisi del peptide nascente (Figura 23) [137, 138].



**Figura 23 - Rappresentazione grafica di alcuni dei possibili meccanismi di repressione mediata dai miRNA. Il messaggero *target* può essere deadenilato e degradato, oppure può essere inibita la sua traduzione.**

In ogni caso il risultato finale sarà la mancata traduzione del trascritto e quindi l'inibizione della sintesi proteica [139] (Vedi figura 21).

Il *matching* tra le due sequenze tuttavia non è una condizione sufficiente per ottenere il silenziamento del gene bersaglio da parte del miRNA; è necessario infatti che la sequenza *target* sia accessibile al microRNA: una sfavorita energia di legame tra l'mRNA ed il microRNA può inibire la repressione malgrado l'alto grado di complementarità tra le due sequenze [140] (Figura 24).



**Figura 24 - I miRNA possono silenziare i loro *targets* solo se questi sono fisicamente accessibili.**

Ogni singolo microRNA può potenzialmente interagire con centinaia di differenti *targets* e, viceversa, ogni mRNA può essere bersaglio di più microRNA.

L'identificazione dei geni bersaglio rappresenta uno *step* critico per studiare la funzione dei miRNA nello sviluppo di piante ed animali, ma non facile come dimostrato dal limitato numero di *targets* che sono stati sperimentalmente validati fino ad ora. Nel corso degli anni sono stati utilizzati diversi approcci per la loro identificazione, sia di tipo bioinformatico che sperimentale.

Sono stati sviluppati diversi *softwares* come miRanda, TargetScan, RNAhybrid, PicTar [141-144] che si basano principalmente sull'identificazione di regioni di complementarità tra i miRNA e i corrispondenti geni *targets*, sulla conservazione di siti *targets* tra differenti specie o sulla stabilità termodinamica del *duplex* miRNA/mRNA.

Tali *softwares*, sebbene in grado di predire centinaia di *targets* per ogni miRNA, presentano alti tassi di falsi positivi [118].

Recentemente è stato suggerito [145] che lo studio dei profili di espressione di mRNA potrebbe rappresentare una strategia più efficiente per la ricerca di geni bersaglio dei miRNA dal momento che ci sono crescenti evidenze che molti miRNA causano la degradazione dei loro *targets* [146-148]. Essi possono quindi determinare sui loro bersagli effetti significativi a livello trascrizionale, facilmente rilevabili tramite tecnologie *microarray* e RT-PCR quantitativa. Tali metodi però

non sono in grado di identificare i *targets* dei miRNA che agiscono attraverso repressione traduzionale.

I risultati ottenuti con l'approccio bioinformatico vengono poi validati tramite approccio sperimentale (come ad esempio il saggio della luciferasi).

Negli ultimi anni il numero di *targets* identificati computazionalmente e poi validati sperimentalmente è cresciuto sempre di più, fino a raggiungere circa 1000 *targets* nell'uomo.

### **Organizzazione genomica dei microRNA**

Tutte le informazioni riguardanti i microRNA (ad esempio la localizzazione genomica e l'organizzazione dei geni codificanti per i microRNA sui cromosomi) sono disponibili su *database* pubblici accessibili via *internet* come *The miRBase Sequence Database*. Attualmente sia mediante approcci sperimentali che computazionali, sono stati identificati in piante ed animali circa 15000 microRNA di cui 1048 nell'uomo, numeri destinati ad aumentare con l'utilizzo di tecniche di sequenziamento *high-throughput*.

I geni codificanti per i microRNA sono distribuiti in tutti i cromosomi umani, fatta eccezione per il cromosoma Y. Circa il 50% dei geni per microRNA conosciuti sono stati ritrovati in *clusters*, e sono trascritti come unici trascritti primari policistronici che vengono successivamente tagliati in diversi microRNA. In molti casi i miRNA policistronici condividono lo stesso *pattern* di espressione. È ancora da verificare la possibilità che i miRNA in *clusters* siano funzionalmente correlati in virtù del fatto che targettano lo stesso gene o geni differenti nella stessa *pathway*.

Prendendo in considerazione la loro localizzazione genomica, essi possono essere distinti in miRNA intergenici, miRNA intronici in unità trascrizionali codificanti, miRNA intronici in trascritti non codificanti, miRNA esonici in trascritti non codificanti [149]. I geni codificanti per i miRNA in alcuni casi contengono propri promotori ed *enhancers* indipendenti: mentre i miRNA intronici possono essere trascritti simultaneamente con i loro geni ospiti, quelli intergenici possono derivare da unità trascrizionali indipendenti [150, 151].

## Disfunzioni nella regolazione dei microRNA

Nonostante il mondo scientifico abbia solo da poco iniziato ad apprezzare l'enorme potenzialità funzionale di queste molecole regolatorie, è noto, come già detto, che il preciso controllo della funzione dei miRNA è essenziale per una grande varietà di processi cellulari tra cui la proliferazione, l'apoptosi ed il differenziamento.

Non è quindi sorprendente che disfunzioni nell'azione regolatoria operata dai miRNA siano associate a numerose condizioni patologiche come neoplasie, malattie cardiovascolari, disordini neurologici, infezioni virali, asma e diabete [152].

Alterazioni nella funzione dei miRNA possono derivare da anomalie nel processo di trascrizione e/o maturazione che determinano livelli di espressione non appropriati o mancata interazione tra il microRNA e il suo *target* (Figura 25).

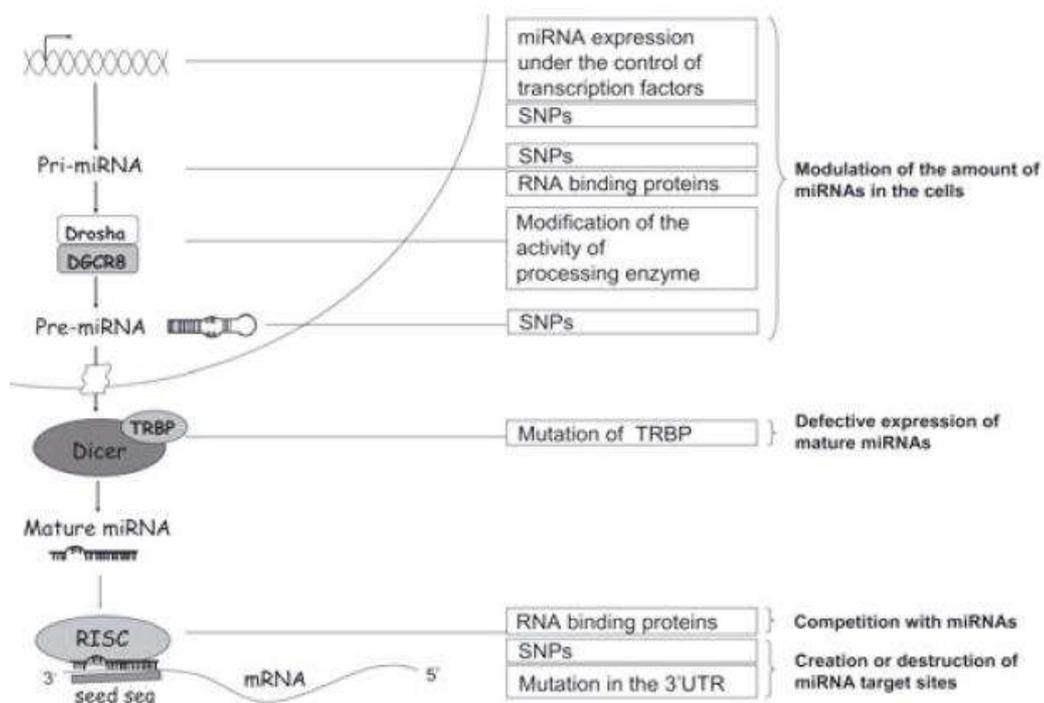


Figura 25 - Biogenesi dei miRNA e possibili eventi che portano alla modulazione della loro attività (Tratta da [153]).

Il processamento dei microRNA può essere regolato a diversi *step* e portare ad aumento o diminuzione dei loro livelli di espressione. Alterazione nei livelli di miRNA può essere causata ad esempio da proteine regolatrici che ne influenzano la biogenesi e da cambiamenti nell'efficienza del trasporto nucleare. Anche la presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) può avere effetti pronunciati sull'efficienza del macchinario di processamento dei miRNA.

La maggior parte dei miRNA sono generati a partire da proprie unità trascrizionali e la loro espressione può essere controllata da fattori di trascrizione attivati in particolari condizioni fisiologiche o patologiche (ad esempio, il fattore di trascrizione *myogenin and myoblast determination 1*, MYOD1, regola l'espressione di miR-1 e miR-133 durante la miogenesi [154], il fattore di trascrizione *myocyte-enhancing factor 2*, mef2, controlla l'espressione del *cluster* di miRNA cervello-specifici durante la dendriocitogenesi [155]. Alcuni miRNA sono controllati da fattori di trascrizione che giocano nell'uomo un ruolo importante nello sviluppo di stati patologici; ad esempio, l'espressione di miR-34a è controllata dal gene oncosoppressore p53 e l'oncogene MYC induce diversi miRNA coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e nell'apoptosi [156].

Come detto prima, la quantità di miRNA maturi presenti nelle cellule non dipende solo dal tasso di trascrizione genica ma può essere modulata anche dall'efficienza con cui gli enzimi coinvolti nella fase di maturazione dei microRNA svolgono l'attività di processamento. L'espressione del miR-21, ad esempio, aumenta dopo la stimolazione dell'attività di Drosha in risposta al *signalling* BMP (*bone morphogenetic protein*)/TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) [157].

La funzione dei miRNA può inoltre essere influenzata anche da proteine leganti l'RNA (RBP) che possono associarsi ai messaggeri e prevenire il loro legame con i microRNA, o interagire con i precursori dei miRNA. Una di queste proteine, hnRNP-A1 (*heterogeneous ribonucleoprotein A1*) si associa con un *cluster* di pri-miRNA e specificatamente favorisce il processamento del miR-18a [158].

Alterazioni nella biogenesi dei miRNA possono derivare anche da difetti genetici a carico del gene codificante il miRNA o in geni codificanti proteine coinvolte nella sintesi, maturazione e azione del miRNA (mutazioni in TRBP2 danneggiano, ad esempio, il processamento dei miRNA e la funzione di DICER1)

[159]. La biogenesi dei miRNA può essere influenzata dalla presenza di SNP all'interno della loro sequenza genica; queste mutazioni che caratterizzano il genotipo di ogni individuo possono influenzare fortemente la maturazione del trascritto e il legame del microRNA ai messaggeri bersaglio; ad esempio la sostituzione di una Guanina con una Citosina determina alterazioni nella maturazione del miR-146 e allo stesso tempo porta alla formazione di un miRNA funzionalmente attivo a partire dal *passenger strand* (miR\*) che può potenzialmente interagire con specifici mRNA *target* [160].

La presenza di SNP o mutazioni all'interno del 3'UTR del *target* o del microRNA può prevenire il legame tra le due strutture determinando un incremento nella traduzione del messaggero o introdurre un nuovo sito di riconoscimento che determina un'inappropriata repressione della traduzione.

## **microRNA nel Diabete**

Numerosi lavori sono presenti in letteratura circa il coinvolgimento di parecchi microRNA nel T1DM e nel T2DM.

Evidenze crescenti suggeriscono che i microRNA possano giocare un ruolo significativo nella produzione, azione e secrezione di insulina, e che siano coinvolti in diversi aspetti del metabolismo del glucosio e dei lipidi.

Importanti difetti di sviluppo sono stati osservati in tutti i tipi di cellule pancreatiche quando Dicer è condizionalmente deletato ad uno stadio precoce dello sviluppo pancreatico. Ulteriori studi sono stati condotti per identificare il preciso ruolo che specifici miRNA svolgono nello sviluppo e funzione del pancreas e nel Diabete.

La prima indicazione di un coinvolgimento dei miRNA nella regolazione della funzione delle  $\beta$  cellule è stata fornita da un lavoro pubblicato su *Nature* nel 2004 di Stoffel *et al.* che ha identificato due miRNA selettivamente espressi nelle isole pancreatiche.

Uno di questi, il miR-375, risulta giocare un ruolo di primo piano nella fisiologia delle  $\beta$  cellule dal momento che la sua sovraespressione regola negativamente la secrezione di insulina glucosio-dipendente agendo sui livelli di miotrofina (Mtpn),

una proteina implicata nell'esocitosi [161]. Sebbene l'esatto ruolo di tale proteina nel processo secretorio delle  $\beta$  cellule rimanga tuttora poco chiaro, la riduzione della sua espressione mediante RNA *interference* ha sulla secrezione dell'insulina effetti sovrapponibili a quelli determinati dal miR-375. È stato dimostrato che la miotrofina interagisce con la proteina CapZ, che a sua volta inibisce l'assemblaggio dell'actina F; è possibile quindi che la miotrofina determini cambiamenti nel *network* actinico tali da inibire il legame e la fusione dei granuli contenenti insulina [117].

Uno studio del 2008 ha dimostrato che il miR-375 modula anche l'espressione di PDK1 (*3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*), componente essenziale nella cascata di segnalazione di PI3K che gioca un ruolo chiave nel mediare l'azione dell'insulina sulla crescita e lo sviluppo cellulare; la caduta nei livelli di espressione di PDK1 nelle cellule  $\beta$  ad opera del miR-375 porta a Diabete e riduzione della massa cellulare [162]. Al contrario, l'inibizione del miR-375 porta ad un incremento nei livelli di PDK1 e di insulina e alla proliferazione delle cellule  $\beta$ . Il glucosio è un potenziale modulatore negativo di miR-375 e porta all'aumento dei livelli della proteina PDK1.

Poy *et al.* hanno mostrato che topi *knockout* per il miR-375 sono iperglicemici perché presentano alte quantità di  $\alpha$  cellule, alti livelli di glucagone nel plasma e diminuzione nella massa delle  $\beta$  cellule, a causa di una loro aberrante proliferazione [163]; queste evidenze sperimentali suggeriscono come il miR-375 oltre ad avere un ruolo nella secrezione dell'insulina è implicato anche nello sviluppo delle  $\beta$  cellule. La delezione del gene per il miR-375 in topi *ob/ob* obesi conduce ad un forte decremento nella capacità del pancreas endocrino di compensare l'aumentata richiesta di insulina con la conseguenza di un severo stato diabetico [163].

È stato recentemente suggerito che gli effetti del miR-375 sull'espressione di Mtpn e sulla secrezione dell'insulina possono essere dipendenti dal fattore di trascrizione NF $\kappa$ B [117]: l'attivazione di quest'ultimo è associata ad aumentata secrezione dell'insulina stimolata dal glucosio [164] mentre la sua inattivazione risulta in un decremento nella secrezione di insulina da parte delle  $\beta$  cellule [117]. È stato dimostrato che la miotrofina funziona come attivatore trascrizionale di

NFκB nei cardiomiociti, suggerendo che la regolazione operata da miR-375 sui livelli di miotrofina potrebbe portare a cambiamenti nell'attività di NFκB [165]. Oltre che per Mtpn, miR-375 può anche svolgere un ruolo di regolazione dell'espressione di Usp1 (proteasi ubiquitina specifica 1), di Jak2 (*Janus kinase 2*) e di Adipor2 (recettore dell'adiponectina) [117, 144].

Attraverso approcci bioinformatici diversi microRNA oltre al miR-375, tra cui il miR-124a e let-7b, i più abbondanti nella linea murina di insulinoma MIN6, sono stati predetti legarsi al 3'UTR dell'RNA messaggero della miotrofina.

Altri miRNA sono in grado di influenzare l'attività delle β cellule: livelli appropriati del miR-9 sono richiesti, ad esempio, per un ottimale rilascio di insulina in risposta al glucosio e ad altri segretagoghi [166]. Questo microRNA è espresso principalmente nei tessuti neuronali e, in quantità minore, a livello delle isole pancreatiche; quando il miR-9 è sovraespresso nelle β cellule fino ad arrivare agli stessi livelli presenti nel cervello si verifica un danno nell'esocitosi dell'insulina stimolata dal glucosio, causato dalla riduzione dell'espressione del fattore di trascrizione Onecut-2 (OC2), *target* del miR-9. Il silenziamento di Onecut-2 determina un'aumentata espressione di Granufilina/Slp4, che associandosi ai granuli secretori, esercita una forte azione inibitoria sul rilascio di insulina [166].

Anche il miR-96 è stato dimostrato regolare negativamente la secrezione di insulina attraverso la sovraespressione di Granufilina; in questo caso però il meccanismo non coinvolge cambiamenti nell'espressione di Onecut-2. Tale microRNA determina anche un decremento nell'espressione di Noc2, una proteina coinvolta nella secrezione insulinica [167].

Un altro miRNA capace di modulare l'espressione di diversi componenti governanti l'esocitosi dell'insulina è il miR-124a; come nel caso del miR-9 questo miRNA è espresso preferenzialmente nelle cellule neuronali e nelle isole pancreatiche. Uno dei *target* del miR-124a è FoxA2 (*forkhead box protein A2*), un fattore di trascrizione implicato nel differenziamento β cellulare, nello sviluppo del pancreas, nel metabolismo del glucosio e nella secrezione di insulina. La sovraespressione e il silenziamento del miR-124a nelle cellule MIN6 causano cambiamenti nei livelli di espressione di FoxA2 e dei suoi geni *targets* a valle

Pdx-1, Kir6.2 (*inwardly-rectifying potassium channel*), e Sur-1 (*sulfonylurea receptor*) [168]. La sua sovraespressione nelle MIN6 determina un incremento nella quantità di insulina rilasciata in condizioni basali, ma una diminuzione nella sua quantità rilasciata ad alte concentrazioni di glucosio. L'effetto di miR-124a sulla secrezione dell'ormone pancreatico sembra essere mediato da aumentati livelli di SNAP25, Rab3A e Sinapsina-1A e da un concomitante decremento di Rab27A e Noc2. Rab27A è l'unico *target* diretto del miR-124a, mentre sembrerebbe che tutti gli altri geni coinvolti nella secrezione dell'insulina siano regolati dal miRNA in maniera indiretta [167].

L'incubazione prolungata delle  $\beta$  cellule in condizioni che simulano stati patologici (elevate concentrazioni di glucosio e/o FFA) determina marcati cambiamenti nell'espressione genica ed effetti negativi sulla fisiologia cellulare; tra i cambiamenti osservati dopo trattamento delle  $\beta$  cellule con alte concentrazioni di FFA si riscontra induzione di due miRNA: miR-34a e miR-146a [116]. Incremento nei livelli di questi due miRNA sono stati osservati anche in isole pancreatiche isolate da topi obesi diabetici *db/db*. Il miR-34a nelle  $\beta$  cellule è indotto dall'attivazione della *pathway* di p53, che conduce ad apoptosi in diverse patologie. La sovraespressione di tale miRNA porta ad una diminuzione nei livelli di espressione della proteina VAMP2 e della proteina anti-apoptotica Bcl2, e a difetti nella secrezione inulinica glucosio-indotta. Inoltre, una crescita nei livelli del miR-34a e del miR-146a promuove l'apoptosi delle  $\beta$  cellule mentre il blocco della loro funzione riduce la morte innescata da FFA [116]. Ciò suggerisce che almeno in parte gli effetti deleteri degli FFA sulle  $\beta$  cellule possano essere mediati dall'alterazione nei livelli di specifici microRNA.

Uno studio condotto sulla linea cellulare di insulinoma MIN6 ha mostrato come i miR-124a, miR-107, miR-30d sono significativamente *up*-regolati in presenza di alte concentrazioni di glucosio mentre altri, tra cui miR-296, miR-484, miR-612, miR-638, miR-663 e miR-690, sono significativamente *down*-regolati dopo il trattamento delle  $\beta$  cellule con alte concentrazioni di tale substrato energetico. Tra questi miRNA differenzialmente espressi il miR-30d è stato ulteriormente indagato: è emerso che la sua sovra-regolazione determina un aumento nell'espressione del gene dell'insulina, mentre la sua inibizione abolisce

completamente l'espressione glucosio-indotta di tale gene. L'azione del miR-30d è stata testata inoltre su due fattori di trascrizione  $\beta$  cellula-specifici, Pdx-1 e NeuroD1, ed è emerso che la sovraespressione di tale microRNA non altera i loro livelli di espressione; di conseguenza, l'azione del miR-30d sull'espressione del gene dell'insulina coinvolge l'inibizione di un fattore di trascrizione non ancora identificato [169].

I miRNA non sono coinvolti solo nella produzione e nella secrezione dell'insulina ma controllano anche il *signaling* di tale ormone pancreatico a livello dei suoi tessuti bersaglio.

Studi sull'espressione dei miRNA nel muscolo scheletrico di ratti Goto-Kakizaki (GK), un modello non obeso di Diabete di tipo 2, hanno identificato due miRNA membri della famiglia del miR-29, ed in particolare il miR-29a e il miR-29b, come *up-regolati* in questi animali diabetici rispetto ai ratti controllo. Ulteriori analisi mediante *Northern blot* hanno rivelato che questi miRNA presentavano alti livelli di espressione in tutti e tre i tessuti *target* dell'insulina (muscolo, tessuto adiposo e fegato) di ratti diabetici. Inoltre la sovraespressione dei miR-29a/b/c nella linea adipocitaria murina 3T3-L1 inibiva l'*uptake* del glucosio stimolato dall'insulina. Alti livelli del miR-29 mimano l'insulino-resistenza di cellule incubate con alte concentrazioni di glucosio ed insulina [170].

Il miR-143 è stato dimostrato essere sovraespresso durante il differenziamento degli adipociti. La riduzione dei livelli di questo microRNA mediata dalla transfezione di RNA antisenso inibisce l'espressione di geni adipocita-specifici (il trasportatore del glucosio insulino-sensibile GLUT4, l'ormone lipasi sensibile HSL, la proteina legante gli acidi grassi aP2 e PPAR2) e l'accumulo di trigliceridi [171]. Il *knockdown* di miR-143 determina *up-regolazione* di uno dei suoi *targets* predetti, la proteina chinasi attivata da mitogeni ERK5/BMK1/MAPK7, suggerendo che il miR-143 possa agire attraverso il gene *target* ERK5.

Nonostante sia stato dimostrato che numerosi microRNA sono differenzialmente espressi nelle  $\beta$  cellule pancreatiche produttrici di insulina e ne regolano funzione e sviluppo, il loro esatto ruolo in questo tipo cellulare e le dinamiche di regolazione a cui sottostanno necessitano ulteriori indagini.

Un recente studio condotto sfruttando la tecnologia *microarray* evidenzia l'importanza funzionale di tre microRNA, miR-34a, miR-146a (già precedentemente citati) e miR-21, nella produzione e nella secrezione insulinica nonché nell'apoptosi delle cellule  $\beta$  pancreatiche. In particolare viene dimostrato che IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  inducono l'espressione di questi microRNA nelle cellule MIN6, in isole pancreatiche umane e in isole di topi NOD durante lo sviluppo di insulite. Il miR-21 è fortemente *up*-regolato nelle  $\beta$  cellule trattate con citochine e nei topi NOD durante l'infiammazione delle isole; la sua sovraespressione nelle cellule MIN6 conduce ad una difettiva secrezione dell'insulina indotta dal glucosio; come nel caso del miR-34a si affianca a questo evento la caduta nei livelli della proteina VAMP2. Il 3'UTR dell'RNA messaggero di VAMP2 non contiene siti di riconoscimento per il miR-21 e quindi si suppone che i meccanismi che correlano il microRNA alla proteina siano indiretti. La sovraespressione di tale microRNA non influenza la sopravvivenza delle cellule MIN6 ma il suo *knockdown* promuove l'apoptosi.

Il blocco della loro funzione mediante molecole antisense, non ristabilisce l'attività del promotore dell'insulina ma previene la riduzione della sua secrezione glucosio-indotta osservata dopo esposizione a IL-1 $\beta$ . Inoltre il trattamento con anti-miR-34a e anti-miR-146a protegge le cellule MIN6 dalla morte cellulare innescata dalle citochine. Tali dati identificano quindi questi miRNA come protagonisti nella perdita di funzionalità delle  $\beta$  cellule causata da citochine infiammatorie, in modo particolare durante lo sviluppo di peri-insulite che precede la manifestazione del Diabete nei topi NOD [172].

È comunque opportuno concludere questa sezione citando un lavoro di Zampetaki *et al.* del 2010 che riguarda la ricerca di biomarcatori tra la frazione di microRNA circolanti nel sangue di pazienti affetti da T2DM [173].

È stato infatti recentemente scoperto che i microRNA possono ritrovarsi al di fuori della cellula, nei fluidi extracellulari come il sangue. I livelli di espressione di specifici miRNA circolanti possono essere alterati in alcuni stati patologici. In questo lavoro Zampetaki *et al.* hanno isolato RNA da campioni di sangue di una coorte di individui monitorati nel corso di 20 anni e hanno evidenziato che un consistente numero di miRNA erano differenzialmente espressi tra pazienti

diabetici e controlli. E' emerso che un marcatore molto interessante è rappresentato dal miR-126, proprio delle cellule endoteliali dove svolge un ruolo protettivo della *pathway* di VEGF, i cui livelli diminuiscono in soggetti T2DM o pre-diabetici dapprima all'interno delle cellule endoteliali stesse e poi, per effetto indiretto, nelle vescicole circolanti da esse stesse prodotte. L'effetto "paracrino" di tale microRNA viene dunque meno e le cellule endoteliali tendono a morire causando tanto nel soggetto pre-diabetico, quanto nel diabetico le basi per l'insorgenza dell'aterosclerosi, una delle maggiori complicanze di questa malattia. È interessante il fatto che una riduzione nei livelli di questi microRNA è già evidenziabile anni prima della manifestazione della malattia. Ciò suggerisce che i livelli di miRNA nel plasma possono essere utilizzati per valutare la probabilità che si manifesti il Diabete in individui ad alto rischio.

Insieme ad altri studi pubblicati recentemente, il lavoro di Zampetaki *et al.* annuncia l'inizio di una nuova era nella ricerca biomedica nella quale i microRNA promettono di ricoprire un ruolo centrale.

## Materiali e Metodi

### Colture cellulari e trattamento con *cocktail* di citochine

Abbiamo utilizzato per i nostri esperimenti due linee cellulari derivanti da  $\alpha$  e  $\beta$  cellule di isole pancreatiche murine: le  $\alpha$ TC1 clone 6 (cellule di glucagonoma) [174] e le  $\beta$ TC1 (cellule di insulinoma) [175] provenienti dall'*American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA) forniteci dal gruppo di ricerca coordinato dal Prof. Francesco Purrello, Dipartimento Medicina Interna e Medicina Specialistica del Presidio Ospedaliero "Garibaldi-Nesima" di Catania.

Le cellule sono state coltivate a 37°C in capsule di Petri (diametro 100 mm, area di crescita 55 cm<sup>2</sup>) in *Dulbecco-Modified Eagle Medium* (DMEM) addizionato con 10% di FBS (siero bovino fetale), 1% di Penicillina/Streptomicina, 1% di L-glutamina.

Entrambi i fenotipi sono stati stimolati con un *cocktail* di citochine costituito da IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (ad una concentrazione di 50 UI/mL, 1000 UI/mL, 1000 UI/mL, rispettivamente) per un *time course* di 24h e 48h. In particolare ciascun *time point* (TP) ha previsto la presenza di un controllo (non trattato) ed un corrispondente campione stimolato per linea cellulare. Come riportato in letteratura [11] queste condizioni sperimentali mimano *in vitro* ciò che avviene *in vivo* durante gli eventi iniziali responsabili dell'instaurarsi della patologia diabetica.

La percentuale di cellule apoptotiche o necrotiche nei controlli e nei trattati è stata determinata tramite FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*), dopo trattamento delle cellule con una soluzione contenente annessina-V coniugata con fluoresceina isotiocianato (FITC) e Ioduro di Propidio (PI) [176].

### Estrazione di RNA e *Real-Time* PCR

La *Taqman*® *microRNA Low density arrays* (TLDA, Applied Biosystems, Foster City, CA) è stata scelta nel nostro studio come piattaforma per il *profiling* dei

microRNA nelle linee cellulari pancreatiche. Questa consiste di due *arrays*: TLDA pannello A, comprendente i microRNA caratterizzati in letteratura e TLDA pannello B, comprendente microRNA la cui funzione non è ancora completamente definita; tali *arrays* consentono di individuare e quantificare con estrema sensibilità esclusivamente la forma matura del microRNA. Ogni *array* include, tra altri controlli endogeni, U6 di mammifero (MammU6) ripetuto quattro volte, un controllo positivo ed un *assay* non specifico dei mammiferi, ath-miR159a, come controllo negativo.

L'RNA totale delle cellule  $\alpha$ TC1 e  $\beta$ TC1 controllo e trattato è stato estratto attraverso l'utilizzo del *kit* commerciale *TriZol* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) secondo quanto specificato nel relativo protocollo. La quantità e la qualità di tale RNA sono state stimate rispettivamente utilizzando il *kit* commerciale *Qubit*<sup>TM</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e PCR qualitativa.

180 ng di RNA totale estratto da entrambe le linee cellulari per ciascun TP sono stati retro-trascritti usando *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* ed i *primers* per l'RT *Megaplex*<sup>TM</sup> *Primer Pools* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

2.5  $\mu$ l di prodotto di RT sono stati pre-amplificati utilizzando *TaqMan*<sup>®</sup> *PreAmp Master Mix, 2X* e *Megaplex PreAmp Primers* e successivamente diluiti mediante aggiunta di 75  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O. La reazione di pre-amplificazione (consigliata soprattutto se la quantità dell'RNA di partenza è compresa tra 1 e 350 ng) consente di incrementare la quantità di cDNA disponibile per l'ultima tappa di analisi dell'espressione genica.

La sintesi del cDNA e la pre-amplificazione sono state effettuate in *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystem, USA).

I campioni di cDNA ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi del trascrittoma dei miRNA in *Real Time PCR*: 9  $\mu$ l del prodotto di pre-amplificazione di ogni singolo campione per ognuno dei due *pools* di *primers* (A e B) sono stati miscelati con *TaqMan Universal PCR Master Mix II* (Applied Biosystems, USA) e caricati in *micro-fluidic cards TaqMan Rodent miRNA Arrays A & B v2.0* (Applied Biosystems, USA). Tutti i saggi sono pre-caricati nella *micro-fluidic card*

costituita da otto *lanes* con i rispettivi canali di caricamento, ognuno dei quali è connesso a 48 pozzetti contenenti altrettante sonde.

La *PCR Real Time* è stata eseguita su *7900HT Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystem, USA) con il seguente profilo termico: 94.5°C, 10'; 40 cicli a 97°C, 30''; 59.7°C, 1'.

Abbiamo utilizzato un totale di 32 *TaqMan Rodent miRNA Arrays A & B v2.0* (ogni esperimento è stato condotto in duplicato tecnico).

In tabella 6 è mostrato l'elenco completo degli *Arrays A e B*.

Array A				Array B			
assay ID	description	assay ID	description	assay ID	description	assay ID	description
000378	mmu-let-7b	001334	rno-miR-347	2495	mmu-miR-31*	1656	mmu-miR-718
000379	mmu-let-7c	001335	rno-miR-349	2506	mmu-miR-322*	1657	mmu-miR-721
002283	mmu-let-7d	002530	mmu-miR-350	1060	mmu-miR-325*	1661	mmu-miR-678
002406	mmu-let-7e	002063	rno-miR-351	2136	mmu-miR-33*	1665	mmu-miR-681
002282	mmu-let-7g	000554	mmu-miR-361	1062	mmu-miR-330*	1667	mmu-miR-449c
002221	mmu-let-7i	002616	mmu-miR-362-3p	2584	mmu-miR-34c*	1673	mmu-miR-719
002222	mmu-miR-1	001271	mmu-miR-363	2043	mmu-miR-374*	1675	mmu-miR-688
002064	rno-miR-1	001020	mmu-miR-365	2482	mmu-miR-376a*	1677	mmu-miR-690
000268	mmu-miR-7a	000555	mmu-miR-367	1727	Y1	1678	mmu-miR-691
002555	mmu-miR-7b	000557	mmu-miR-369-3p	1727	Y1	1679	mmu-miR-692
99999920	Mamm U6	001021	mmu-miR-369-5p	1973	Mamm U6	1680	mmu-miR-693-5p
99999920	Mamm U6	002275	mmu-miR-370	1973	Mamm U6	1681	mmu-miR-694
000583	mmu-miR-9	000564	mmu-miR-375	1230	snoRNA 135	1954	mmu-miR-673-5p
000387	mmu-miR-10a	001069	mmu-miR-376a	1230	snoRNA 135	2017	mmu-miR-592
002218	mmu-miR-10b	002452	mmu-miR-376b	567	mmu-miR-378*	2022	mmu-miR-801
000389	mmu-miR-15a	002450	mmu-miR-376c	2486	mmu-miR-382*	2025	mmu-miR-758
000390	mmu-miR-15b	000566	mmu-miR-377	2238	mmu-miR-411*	2028	mmu-miR-762
000391	mmu-miR-16	001320	rno-miR-377	1104	mmu-miR-425*	2030	mmu-miR-761
002078	rno-miR-17-3p	001138	mmu-miR-379	2312	mmu-miR-431*	2031	mmu-miR-764-5p
002422	mmu-miR-18a	001071	mmu-miR-380-3p	1078	mmu-miR-433*	2032	mmu-miR-764-3p
002466	mmu-miR-18b	002601	mmu-miR-380-5p	1280	mmu-miR-455*	2033	mmu-miR-763
000395	mmu-miR-19a	000571	mmu-miR-381	2582	mmu-miR-463*	2034	mmu-miR-759
000396	mmu-miR-19b	000572	mmu-miR-382	1826	mmu-miR-467a*	2036	mmu-miR-693-3p
000580	mmu-miR-20a	001767	mmu-miR-383	1684	mmu-miR-467b*	2044	mmu-miR-804
001014	mmu-miR-20b	002603	mmu-miR-384-3p	2569	mmu-miR-467e*	2045	mmu-miR-805
002052	rno-miR-20b-3p	002602	mmu-miR-384-5p	2589	mmu-miR-470*	2050	rno-miR-463
000397	mmu-miR-21	002332	mmu-miR-409-3p	2560	mmu-miR-483*	2056	rno-miR-743a
000400	mmu-miR-23b	002331	mmu-miR-409-5p	1943	mmu-miR-485*	2058	rno-miR-148b-5p

000402	mmu-miR-24	001274	mmu-miR-410	2014	mmu-miR-488*	2203	mmu-miR-875-5p
000403	mmu-miR-25	001610	mmu-miR-411	2536	mmu-miR-503*	2243	mmu-miR-378
000405	mmu-miR-26a	001343	rno-miR-421	1956	mmu-miR-674*	2255	mmu-miR-149
000407	mmu-miR-26b	002340	mmu-miR-423-5p	1958	mmu-miR-676*	2263	mmu-miR-190b
000408	mmu-miR-27a	001516	mmu-miR-425	1727	Y1	2291	mmu-miR-877
000409	mmu-miR-27b	001077	mmu-miR-429	1727	Y1	2292	mmu-miR-653
99999920	Mamm U6	001727	Y1	1973	Mamm U6	2328	mmu-miR-760
99999920	Mamm U6	001979	mmu-miR-431	1973	Mamm U6	2449	mmu-miR-673-3p
000411	mmu-miR-28	001028	mmu-miR-433	1230	snoRNA135	2481	mmu-miR-327
000413	mmu-miR-29b	002604	mmu-miR-434-3p	1230	snoRNA135	2483	mmu-miR-343
000587	mmu-miR-29c	002581	mmu-miR-434-5p	2342	mmu-miR-708*	2500	mmu-miR-466b-3-3p
000602	mmu-miR-30b	001029	mmu-miR-448	1961	mmu-miR-712*	2501	mmu-miR-466c-5p
000419	mmu-miR-30c	001030	mmu-miR-449a	2542	mmu-miR-872*	2525	mmu-miR-450a-3p
000420	mmu-miR-30d	002539	mmu-miR-449b	2548	mmu-miR-877*	2531	mmu-miR-101b
002109	mmu-miR-32	002303	mmu-miR-450a-5p	2473	mmu-miR-879*	2534	mmu-miR-466d-5p
000426	mmu-miR-34a	001962	mmu-miR-450b-5p	2475	mmu-miR-881*	2535	mmu-miR-466d-3p
000428	mmu-miR-34c	001141	mmu-miR-451	2231	mmu-miR-9*	2538	mmu-miR-291b-3p
001090	mmu-miR-93	002484	mmu-miR-453	2496	mmu-miR-92a*	2541	mmu-miR-878-3p
000186	mmu-miR-96	002455	mmu-miR-455	2139	mmu-miR-93*	2586	mmu-miR-466a-3p
000577	mmu-miR-98	002040	mmu-miR-465a-3p	2196	mmu-miR-99b*	2590	mmu-miR-290-5p
000435	mmu-miR-99a	001082	mmu-miR-465a-5p	2407	rno-let-7e*	2478	mmu-let-7a*
000436	mmu-miR-99b	002485	mmu-miR-465b-5p	1351	rno-miR-1*	2404	mmu-let-7b*
000437	mmu-miR-100	002066	rno-miR-466b	2074	rno-miR-125b*	2479	mmu-let-7c-1*
002253	mmu-miR-101a	002067	rno-miR-466c	2075	rno-miR-135a*	1178	mmu-let-7d*
000439	mmu-miR-103	002516	mmu-miR-466h	2100	rno-miR-136*	2417	mmu-let-7f*
002465	mmu-miR-105	002587	mmu-miR-467a	2076	rno-miR-204*	2492	mmu-let-7g*
000443	mmu-miR-107	002517	mmu-miR-467c	1712	U87	2172	mmu-let-7i*
002245	mmu-miR-122	002518	mmu-miR-467d	1712	U87	2507	mmu-miR-101a*
001182	mmu-miR-124	002568	mmu-miR-467e	1232	snoRNA202	2380	mmu-miR-106b*
002199	mmu-miR-125a-3p	002588	mmu-miR-470	1232	snoRNA202	2288	mmu-miR-10a*
002198	mmu-miR-125a-5p	001821	mmu-miR-484	1240	snoRNA429	2572	mmu-miR-10b*
000449	mmu-miR-125b-5p	001278	mmu-miR-486	1240	snoRNA429	2197	mmu-miR-124*
002228	mmu-miR-126-3p	001285	mmu-miR-487b	1336	rno-miR-20a*	2508	mmu-miR-125b*
000451	mmu-miR-126-5p	001302	mmu-miR-489	338	ath-miR159a	2229	mmu-miR-127*
000452	mmu-miR-127	001630	mmu-miR-491	2080	rno-miR-25*	2460	mmu-miR-130b*
002216	mmu-miR-128a	002519	mmu-miR-493	2446	rno-miR-28*	1637	mmu-miR-133a*
001184	mmu-miR-129-3p	002365	mmu-miR-494	2082	rno-miR-29b-1*	2232	mmu-miR-135a*
000454	mmu-miR-130a	001663	mmu-miR-495	2166	rno-miR-29b-2*	2512	mmu-miR-136*
000456	mmu-miR-130b	001346	mmu-miR-497	2305	rno-miR-30d*	2554	mmu-miR-138*
000457	mmu-miR-132	001352	mmu-miR-499	1283	rno-miR-363*	2513	mmu-miR-141*
002246	mmu-miR-133a	002606	mmu-miR-500	2081	rno-miR-379*	2514	mmu-miR-145*
002247	mmu-miR-133b	001651	mmu-miR-501-3p	1354	rno-miR-382*	2453	mmu-miR-146b*
001186	mmu-miR-134	002456	mmu-miR-503	2062	rno-miR-7a*	2134	mmu-miR-148a*

000460	mmu-miR-135a	002084	mmu-miR-504	2073	rno-miR-99a*	2570	mmu-miR-150*
002261	mmu-miR-135b	001655	mmu-miR-505	2439	rno-miR-23a*	478	mmu-miR-154*
002511	mmu-miR-136	002521	mmu-miR-509-3p	2079	rno-miR-24-1*	2488	mmu-miR-15a*
001129	mmu-miR-137	002520	mmu-miR-509-5p	2451	mmu-miR-376b*	2173	mmu-miR-15b*
002284	mmu-miR-138	002549	mmu-miR-511	2523	mmu-miR-376c*	2489	mmu-miR-16*
002546	mmu-miR-139-3p	002355	mmu-miR-532-3p	2325	mmu-miR-744*	2543	mmu-miR-17*
002289	mmu-miR-139-5p	001518	mmu-miR-532-5p	1338	mmu-miR-7a*	516	mmu-miR-181a-1*
001187	mmu-miR-140	002051	rno-miR-532-5p	1712	U87	2270	mmu-miR-183*
000463	mmu-miR-141	001286	mmu-miR-539	1712	U87	2574	mmu-miR-186*
000464	mmu-miR-142-3p	001310	mmu-miR-540-3p	1232	snoRNA202	2490	mmu-miR-18a*
002248	mmu-miR-142-5p	002561	mmu-miR-540-5p	1232	snoRNA202	2576	mmu-miR-191*
001230	snoRNA135	000338	ath-miR159a	1240	snoRNA429	2577	mmu-miR-193*
002278	mmu-miR-145	001284	mmu-miR-542-3p	1240	snoRNA429	2477	mmu-miR-196a*
000468	mmu-miR-146a	002563	mmu-miR-542-5p	2557	mmu-miR-302c*	1131	mmu-miR-199b*
001097	mmu-miR-146b	002376	mmu-miR-543	416	mmu-miR-30a*	2544	mmu-miR-19a*
002262	mmu-miR-147	002065	rno-miR-543	2498	mmu-miR-30b*	1011	mmu-miR-200a*
000470	mmu-miR-148a	002550	mmu-miR-544	2108	mmu-miR-30c-1*	2274	mmu-miR-200b*
000471	mmu-miR-148b	001535	mmu-miR-551b	2110	mmu-miR-30c-2*	2286	mmu-miR-200c*
000473	mmu-miR-150	002349	mmu-miR-574-3p	422	mmu-miR-30e*	2491	mmu-miR-20a*
001190	mmu-miR-151-3p	002567	mmu-miR-582-3p	2557	mmu-miR-302c*	2524	mmu-miR-20b*
000475	mmu-miR-152	002566	mmu-miR-582-5p	416	mmu-miR-30a*	2493	mmu-miR-21*
001191	mmu-miR-153	001984	mmu-miR-590-5p	2498	mmu-miR-30b*	2293	mmu-miR-214*
000477	mmu-miR-154	002476	mmu-miR-598	2108	mmu-miR-30c-1*	2552	mmu-miR-218-1*
000480	mmu-miR-181a	002053	rno-miR-598-5p	2110	mmu-miR-30c-2*	2294	mmu-miR-218-2*
000482	mmu-miR-181c	001960	mmu-miR-615-3p	422	mmu-miR-30e*	2301	mmu-miR-22*
002599	mmu-miR-182	002353	mmu-miR-615-5p	2478	mmu-let-7a*	488	mmu-miR-24-1*
002269	mmu-miR-183	002239	mmu-miR-654-3p	2404	mmu-let-7b*	2494	mmu-miR-24-2*
000485	mmu-miR-184	002522	mmu-miR-654-5p	2479	mmu-let-7c-1*	2444	mmu-miR-26b*
002271	mmu-miR-185	002607	mmu-miR-665	1178	mmu-let-7d*	2445	mmu-miR-27a*
002285	mmu-miR-186	001952	mmu-miR-666-5p	2417	mmu-let-7f*	2174	mmu-miR-27b*
000489	mmu-miR-190	001683	mmu-miR-669a	2492	mmu-let-7g*	2545	mmu-miR-28*
002299	mmu-miR-191	002322	mmu-miR-671-3p	2172	mmu-let-7i*	2594	mmu-miR-293*
000491	mmu-miR-192	002327	mmu-miR-672	2507	mmu-miR-101a*	2595	mmu-miR-294*
002250	mmu-miR-193	002054	rno-miR-673	2380	mmu-miR-106b*	2454	mmu-miR-297a*
002467	mmu-miR-193b	002021	mmu-miR-674	2288	mmu-miR-10a*	600	mmu-miR-299*
000493	mmu-miR-194	002341	mmu-miR-708	2572	mmu-miR-10b*	2447	mmu-miR-29a*
000494	mmu-miR-195	002457	mmu-miR-741	2197	mmu-miR-124*	2497	mmu-miR-29b*
002215	mmu-miR-196b	002038	mmu-miR-742	2508	mmu-miR-125b*	1818	mmu-miR-29c*
002049	rno-miR-196c	002055	rno-miR-742	2229	mmu-miR-127*	2613	mmu-miR-300*
000497	mmu-miR-197	002471	mmu-miR-743b-3p	2460	mmu-miR-130b*	2615	mmu-miR-302a*
002304	mmu-miR-199a-3p	002470	mmu-miR-743b-5p	1637	mmu-miR-133a*	1307	mmu-miR-302b*
000498	mmu-miR-199a-5p	002469	mmu-miR-743a	2232	mmu-miR-135a*	191	mmu-miR-300
000502	mmu-miR-200a	002068	rno-miR-743b	2512	mmu-miR-136*	398	mmu-miR-22

002251	mmu-miR-200b	002324	mmu-miR-744	2554	mmu-miR-138*	510	mmu-miR-206
002300	mmu-miR-200c	001990	rno-miR-758	2513	mmu-miR-141*	1036	mmu-miR-485
002578	mmu-miR-201	002057	rno-miR-760-5p	2514	mmu-miR-145*	1055	mmu-miR-292-5p
001195	mmu-miR-202-3p	002027	mmu-miR-770-3p	2453	mmu-miR-146b*	1061	mmu-miR-326
002579	mmu-miR-202-5p	002029	mmu-miR-802	2134	mmu-miR-148a*	1202	mmu-miR-291a-5p
000507	mmu-miR-203	002354	mmu-miR-871	2570	mmu-miR-150*	1282	rno-miR-493
000508	mmu-miR-204	002069	rno-miR-871	478	mmu-miR-154*	1319	mmu-miR-374
000509	mmu-miR-205	002264	mmu-miR-872	2488	mmu-miR-15a*	1323	rno-miR-664
001198	mmu-miR-207	002356	mmu-miR-873	2173	mmu-miR-15b*	1326	rno-miR-20b-5p
001315	rno-miR-207	002268	mmu-miR-874	2489	mmu-miR-16*	1339	rno-miR-352
000511	mmu-miR-208	002547	mmu-miR-875-3p	2543	mmu-miR-17*	1353	rno-miR-489
002290	mmu-miR-208b	002464	mmu-miR-876-3p	516	mmu-miR-181a-1*	1356	mmu-miR-501-5p
000512	mmu-miR-210	002463	mmu-miR-876-5p	2270	mmu-miR-183*	1627	mmu-miR-695
001199	mmu-miR-211	002070	rno-miR-878	2574	mmu-miR-186*	1628	mmu-miR-696
002306	mmu-miR-214	002540	mmu-miR-878-5p	2490	mmu-miR-18a*	1629	mmu-miR-720
001200	mmu-miR-215	002472	mmu-miR-879	2576	mmu-miR-191*	1631	mmu-miR-697
001232	snoRNA202	002609	mmu-miR-881	2577	mmu-miR-193*	1632	mmu-miR-698
002220	mmu-miR-216a	002072	rno-miR-881	2477	mmu-miR-196a*	1633	mmu-miR-699
002326	mmu-miR-216b	002461	mmu-miR-883a-3p	1131	mmu-miR-199b*	1634	mmu-miR-700
002556	mmu-miR-217	002565	mmu-miR-883b-3p	2544	mmu-miR-19a*	1635	mmu-miR-701
000521	mmu-miR-218	002611	mmu-miR-883a-5p	1011	mmu-miR-200a*	1636	mmu-miR-702
000522	mmu-miR-219	002378	mmu-miR-125b-3p	2274	mmu-miR-200b*	1639	mmu-miR-704
002468	mmu-miR-220	002249	mmu-miR-143	2286	mmu-miR-200c*	1641	mmu-miR-706
000524	mmu-miR-221	002077	rno-miR-219-1-3p	2491	mmu-miR-20a*	1642	mmu-miR-707
002276	mmu-miR-222	002390	rno-miR-219-2-3p	2524	mmu-miR-20b*	1644	mmu-miR-709
002295	mmu-miR-223	000599	rno-miR-224	2493	mmu-miR-21*	1645	mmu-miR-710
002553	mmu-miR-224	002509	mmu-miR-324-3p	2293	mmu-miR-214*	1646	mmu-miR-711
002591	mmu-miR-290-3p	001067	mmu-miR-351	2552	mmu-miR-218-1*	1648	mmu-miR-713
002592	mmu-miR-291a-3p	001322	rno-miR-381	2294	mmu-miR-218-2*	1649	mmu-miR-715
002537	mmu-miR-291b-5p	001317	rno-miR-409-5p	2301	mmu-miR-22*	1652	mmu-miR-717
002593	mmu-miR-292-3p	001345	rno-miR-450a	488	mmu-miR-24-1*	1656	mmu-miR-718
001794	mmu-miR-293	001032	mmu-miR-452	2494	mmu-miR-24-2*	1657	mmu-miR-721
001056	mmu-miR-294	001081	mmu-miR-464	2444	mmu-miR-26b*	1661	mmu-miR-678
000189	mmu-miR-295	001671	mmu-miR-467b	2445	mmu-miR-27a*	1665	mmu-miR-681
002101	mmu-miR-296-3p	001085	mmu-miR-468	2174	mmu-miR-27b*	1667	mmu-miR-449c
000527	mmu-miR-296-5p	001086	mmu-miR-469	2545	mmu-miR-28*	1673	mmu-miR-719
002480	mmu-miR-297c	001659	mmu-miR-488	2594	mmu-miR-293*	1675	mmu-miR-688
001626	mmu-miR-297b-5p	001037	mmu-miR-490	2595	mmu-miR-294*	1677	mmu-miR-690
002598	mmu-miR-298	001953	mmu-miR-496	2454	mmu-miR-297a*	1678	mmu-miR-691
000528	mmu-miR-301a	001316	rno-miR-505	600	mmu-miR-299*	1679	mmu-miR-692
002600	mmu-miR-301b	001312	mmu-miR-546	2447	mmu-miR-29a*	1680	mmu-miR-693-5p
000529	mmu-miR-302a	002564	mmu-miR-547	2497	mmu-miR-29b*	1681	mmu-miR-694
002558	mmu-miR-302c	002352	mmu-miR-652	1818	mmu-miR-29c*	1954	mmu-miR-673-5p

000535	mmu-miR-302d	001949	mmu-miR-667	2613	mmu-miR-300*	2017	mmu-miR-592
002277	mmu-miR-320	001947	mmu-miR-668	2615	mmu-miR-302a*	2022	mmu-miR-801
002227	mmu-miR-323-3p	002020	mmu-miR-670	1307	mmu-miR-302b*	2025	mmu-miR-758
000539	mmu-miR-324-5p	001941	mmu-miR-675-3p	191	mmu-miR-300	2028	mmu-miR-762
002510	mmu-miR-325	001940	mmu-miR-675-5p	398	mmu-miR-22	2030	mmu-miR-761
001328	rno-miR-327	001959	mmu-miR-676	510	mmu-miR-206	2031	mmu-miR-764-5p
000543	mmu-miR-328	001660	mmu-miR-677	1036	mmu-miR-485	2032	mmu-miR-764-3p
000192	mmu-miR-329	001662	mmu-miR-679	1055	mmu-miR-292-5p	2033	mmu-miR-763
002230	mmu-miR-330	001664	mmu-miR-680	1061	mmu-miR-326	2034	mmu-miR-759
000545	mmu-miR-331-3p	001666	mmu-miR-682	1202	mmu-miR-291a-5p	2036	mmu-miR-693-3p
002233	mmu-miR-331-5p	001668	mmu-miR-683	1282	rno-miR-493	2044	mmu-miR-804
001329	rno-miR-333	001669	mmu-miR-684	1319	mmu-miR-374	2045	mmu-miR-805
002185	mmu-miR-335-3p	001670	mmu-miR-685	1323	rno-miR-664	2050	rno-miR-463
000546	mmu-miR-335-5p	001672	mmu-miR-686	1326	rno-miR-20b-5p	2056	rno-miR-743a
001331	rno-miR-336	001674	mmu-miR-687	1339	rno-miR-352	2058	rno-miR-148b-5p
002532	mmu-miR-337-3p	000377	mmu-let-7a	1353	rno-miR-489	2203	mmu-miR-875-5p
002515	mmu-miR-337-5p	000382	mmu-let-7f	1356	mmu-miR-501-5p	2243	mmu-miR-378
002252	mmu-miR-338-3p	000442	mmu-miR-106b	1627	mmu-miR-695	2255	mmu-miR-149
002533	mmu-miR-339-3p	002571	mmu-miR-155	1628	mmu-miR-696	2263	mmu-miR-190b
002059	rno-miR-339-3p	002308	mmu-miR-17	1629	mmu-miR-720	2291	mmu-miR-877
002257	mmu-miR-339-5p	000399	mmu-miR-23a	1631	mmu-miR-697	2292	mmu-miR-653
001712	U87	002112	mmu-miR-29a	1632	mmu-miR-698	2328	mmu-miR-760
002259	mmu-miR-340-3p	000417	mmu-miR-30a	1633	mmu-miR-699	2449	mmu-miR-673-3p
002258	mmu-miR-340-5p	002223	mmu-miR-30e	1634	mmu-miR-700	2481	mmu-miR-327
002260	mmu-miR-342-3p	000185	mmu-miR-31	1635	mmu-miR-701	2483	mmu-miR-343
002527	mmu-miR-342-5p	002618	mmu-miR-34b-3p	1636	mmu-miR-702	2500	mmu-miR-466b-3-3p
001344	rno-miR-343	000430	mmu-miR-92a	1639	mmu-miR-704	2501	mmu-miR-466c-5p
001063	mmu-miR-344	002048	rno-miR-190b	1641	mmu-miR-706	2525	mmu-miR-450a-3p
001332	rno-miR-344-3p	000590	mmu-miR-129-5p	1642	mmu-miR-707	2531	mmu-miR-101b
002060	rno-miR-344-5p	001193	mmu-miR-187	1644	mmu-miR-709	2534	mmu-miR-466d-5p
002529	mmu-miR-345-3p	002106	mmu-miR-188-3p	1645	mmu-miR-710	2535	mmu-miR-466d-3p
002061	rno-miR-345-3p	002459	mmu-miR-106a	1646	mmu-miR-711	2538	mmu-miR-291b-3p
002528	mmu-miR-345-5p	002320	mmu-miR-188-5p	1648	mmu-miR-713	2541	mmu-miR-878-3p
001064	mmu-miR-346	000531	mmu-miR-302b	1649	mmu-miR-715	2586	mmu-miR-466a-3p
001333	rno-miR-346	001076	mmu-miR-322	1652	mmu-miR-717	2590	mmu-miR-290-5p

**Tabella 6 - Arrays A e B. In giallo sono evidenziati i controlli endogeni e i controlli negativi.**

## Analisi dei dati di espressione

Le variazioni di espressione dei microRNA sono state determinate attraverso quantificazione relativa, usando il metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , con l'ausilio del *software RQ Manager 1.2* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) [177]. La normalizzazione dei dati è stata fatta utilizzando tre controlli endogeni, snoRNA135, snoRNA202 e MammU6 (i loro valori di Ct si mantenevano costanti in tutti i campioni): abbiamo considerato attendibili solo i valori di *fold change* (FC) concordanti per tutti e tre gli endogeni. Abbiamo confrontato i livelli di espressione dei miRNA in entrambi i fenotipi cellulari a *steady state* e dopo trattamento con citochine.

Sono stati considerati sovraespressi o sottoespressi i microRNA che variavano la loro espressione di almeno 3 volte (verso l'alto o verso il basso) tra le  $\alpha$ TC1 e le  $\beta$ TC1 nel caso dell'analisi a *steady state*, e nei trattati rispetto ai relativi controlli nel caso dell'analisi dopo trattamento ( $FC \geq 3$  o  $\leq 0.33$ , equivalente a  $LN FC \geq +1$  e  $LN FC \leq -1$ ). Abbiamo escluso dalla nostra analisi i miRNA con valori di Ct indeterminati o maggiori di 33, sia nei controlli che nei trattati, in quanto in questi casi l'espressione non è correttamente valutabile.

I dati di espressione dei miRNA nelle due linee cellulari per tutti i *time point* sono stati clusterizzati attraverso il *software Cluster 3.0* (*clustering gerarchico*; metrica di similarità: *city-block distance* e *absolute correlation distance*; metodo di clustering: *average linkage*) e visualizzati attraverso *Java TreeView*.

## Analisi statistica

I nostri dati sono stati analizzati mediante un *Paired T-Test*, utilizzando il *software MultiExperiment Viewer 4.5* (MeV 4.5), (il *p-value* è stato calcolato sulla base di 100 permutazioni per gene, *overall alpha critical p-value* pari a 0.01, la significatività è stata determinata attraverso l'*Adjusted Bonferroni Correction Method, False discovery control: fast approximation*) con i valori di  $\Delta C_t$  dei miRNA rispetto ai tre endogeni, tra le coppie  $\alpha$ TC1 Controllo replicato 1 e  $\beta$ TC1

Controllo replicato 1 e tra le coppie  $\alpha$ TC1 Controllo replicato 2 e  $\beta$ TC1 Controllo replicato 2 nel caso dell'analisi a *steady state*, e tra le coppie Controllo replicato 1 e Trattato replicato 1 e tra le coppie Controllo replicato 2 e Trattato replicato 2 per ogni linea cellulare e per ogni *time point* nel caso dell'analisi trattato/controllo. Abbiamo così ottenuto un *set* di miRNA significativamente differenzialmente espressi per ogni *time point* e per ogni linea cellulare, per ciascun controllo endogeno preso in esame. Sono stati presi in considerazione per le successive analisi solo i miRNA che risultavano significativamente differenzialmente espressi per tutti e tre gli endogeni.

## **Predizione dei *targets* dei microRNA, costruzione delle *networks* e analisi delle *pathways* alterate**

Per la ricerca dei *targets* predetti dei 32 microRNA differenzialmente espressi (DE) abbiamo sfruttato il *database* miRecords (disponibile all'indirizzo <http://www.miRecords.umn.edu/miRecords>) [178] utilizzando l'intersezione di almeno 5 *tools* da un *set* di 11 *tools* di predizione, mentre i *targets* sperimentalmente validati sono stati identificati mediante Tarbase (disponibile all'indirizzo <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/tarbase>) [179].

Sfruttando il *plugin* di Cytoscape MiMi abbiamo estratto i dati interatomici e ricercato i primi interattori di tali *targets* [180].

A partire dai DE microRNA risultati variare in maniera specifica in ognuna delle due linee cellulari in ogni *time point* dopo il trattamento con citochine, dai *targets* predetti e validati e dai loro primi interattori abbiamo costruito quattro *networks* (per le  $\alpha$ TC1 a 24h, le  $\alpha$ TC1 a 48h, le  $\beta$ TC1 a 24h e le  $\beta$ TC1 a 48h), visualizzandole attraverso Cytoscape v. 2.6.1 [181].

L'analisi delle GO (Gene Ontology) di tali *networks* è stata effettuata utilizzando il *plugin* di Cytoscape BINGO (*hypergeometric test*, Benjamini & Hochberg *False Discovery Rate (FDR) correction*,  $P < 0.05$ ) (<http://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/Home.html>), mentre per l'analisi

delle differenze di GO statisticamente significative tra i due fenotipi cellulari abbiamo utilizzato il *tool* FatiGO (<http://babelomics3.bioinfo.cipf.es>).

Le *pathways* molecolari potenzialmente alterate nelle due popolazioni cellulari, per ogni *time point*, sono state ottenute attraverso interrogazione del *tool* DIANA-mirPath (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/>).

Per ognuna delle due linee cellulari e per ogni *time point* abbiamo preso in considerazione i microRNA DE ed abbiamo effettuato un confronto tra i *targets* predetti e validati ottenuti tramite miRecords e Tarbase e il *set* di geni di seconda classe del Macchinario Apoptotico (MA) risultati candidati per il Diabete in un lavoro recentemente completato dal nostro gruppo di ricerca [Barbagallo D *et al*, in preparazione] (vedi tabella 16).

## Risultati

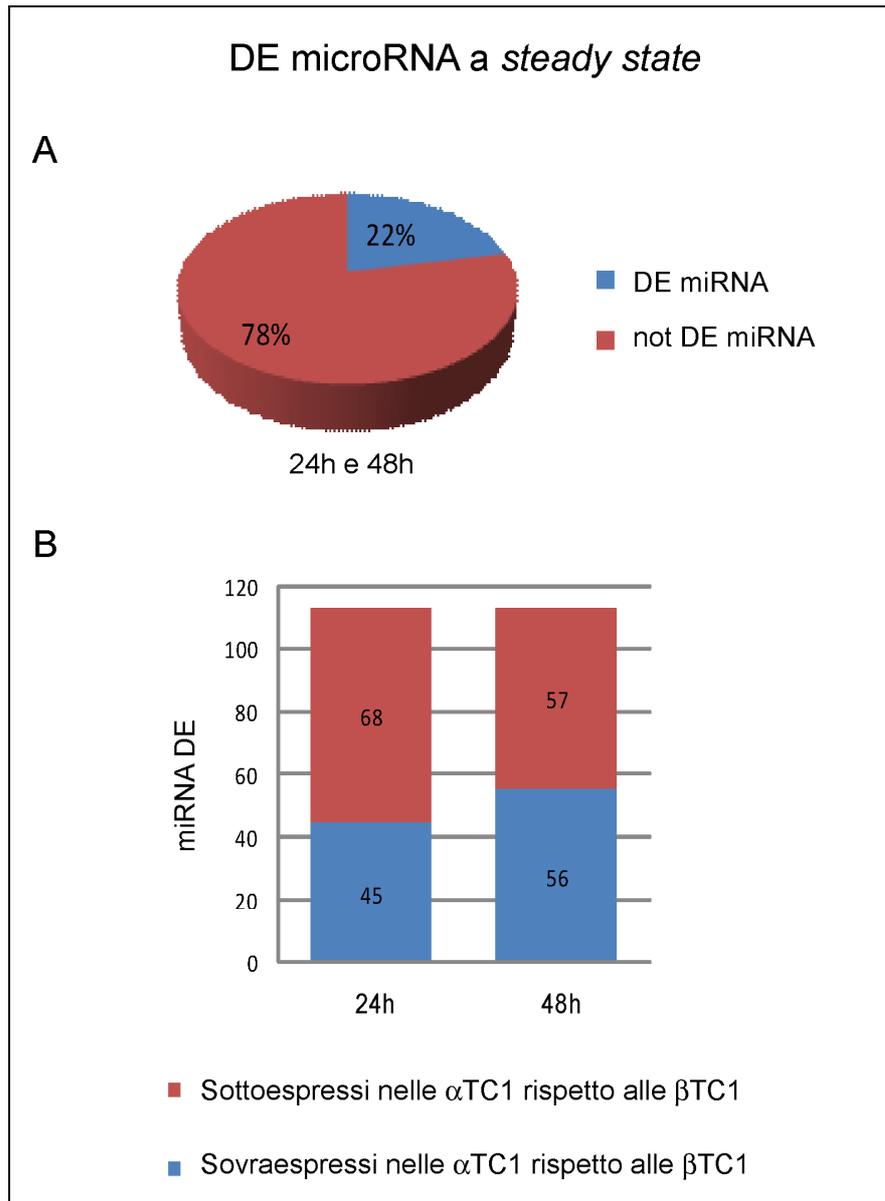
### Induzione di apoptosi nelle linee cellulari $\alpha$ TC1 e $\beta$ TC1

Le linee cellulari  $\alpha$ TC1 trattate con citochine mostrano livelli di apoptosi (stimati come rapporto cellule in sub-G0/popolazione cellulare totale) comparabili ai controlli a 24h (1,7% di cellule apoptotiche rispetto ai controlli). La percentuale di cellule apoptotiche aumenta al 5,3% rispetto ai controlli 48h dopo il trattamento. Le  $\beta$ TC1 trattate mostrano il 12% di cellule apoptotiche rispetto ai controlli a 24h; queste aumentano al 16% a 48h.

### Analisi del trascrittoma a *steady state* e dopo trattamento con citochine

L'analisi di espressione di 518 microRNA murini su linee cellulari  $\alpha$ TC1 e  $\beta$ TC1 in condizioni fisiologiche a 24h e 48h, con il metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , ha consentito di verificare che il 22% (113/518) circa dei miRNA analizzati nel nostro studio presenta livelli di espressione diversi tra le  $\alpha$ TC1 e le  $\beta$ TC1 in entrambi i *time point* (Figura 26A).

Dei 113 microRNA differenzialmente espressi (DE) tra i due fenotipi cellulari a 24h, 45 hanno livelli di espressione maggiori nelle  $\alpha$ TC1 e 68 nelle  $\beta$ TC1, mentre tra i 113 microRNA DE tra le due linee a 48h, 56 sono espressi maggiormente nelle  $\alpha$ TC1 e 57 nelle  $\beta$ TC1 (Figura 26B). 77 di questi microRNA si mantengono differenzialmente espressi tra le due popolazioni cellulari (con lo stesso *trend* di espressione) sia a 24h che a 48h.



**Figura 26 - (A) Percentuale di microRNA differenzialmente espressi tra i due fenotipi cellulari in condizioni fisiologiche (in entrambi i *time point*); (B) Numero di microRNA differenzialmente espressi in maniera specifica a 24h e a 48h nelle  $\alpha$ TC1 rispetto alle  $\beta$ TC1.**

L'analisi di espressione degli stessi 518 microRNA murini su  $\alpha$ TC1 e  $\beta$ TC1 trattate con *cocktail* di citochine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ed INF- $\gamma$ ) per 24h e 48h, con l'utilizzo del metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , ha consentito di identificare un *set* di 32 microRNA differenzialmente espressi (DE) (circa il 6.18% dei microRNA analizzati) la cui

espressione varia in almeno un *time point* in una o in entrambe le linee cellulari (Tabella 7, Figura 27).

microRNA	LN FC $\alpha$ TC1 24h	LN FC $\alpha$ TC1 48h	LN FC $\beta$ TC1 24h	LN FC $\beta$ TC1 48h
mmu-let-7a*	-0.223056024	-0.774402399	-0.912703759	-1.684658829
mmu-miR-107	-0.700930213	-0.580318849	-0.873053921	-1.675348634
mmu-miR-125b-5p	0.869172918	1.530673713	1.381608152	1.329014295
mmu-miR-129-3p	0.048346294	0.113913107	0.684870815	1.164349905
mmu-miR-141*	-0.005537601	1.387261475	0.370937627	0.313832133
mmu-miR-146a	2.838057138	2.905745675	2.178567986	2.938879121
mmu-miR-148a	-0.307602459	0.267227906	-1.244071838	-1.631400677
mmu-miR-149	-0.39028194	-0.903720875	-1.199720584	-2.000729091
mmu-miR-155	1.107418694	0.830927425	0.947804068	1.601346278
mmu-miR-203	1.655238557	2.055334836	1.18074103	1.382006784
mmu-miR-21	0.418516	1.21183918	0.824468578	1.336974398
mmu-miR-216a	N/A	N/A	-2.659725141	-4.514144349
mmu-miR-216b	N/A	0.725131331	-2.020428911	-3.626781488
mmu-miR-217	N/A	N/A	-1.715211254	-3.271984053
mmu-miR-221	N/A	N/A	-0.168846884	-1.711264749
mmu-miR-298	-1.106564102	N/A	N/A	not DE
mmu-miR-31	-1.251572225	0.720945415	0.801364596	0.679963059
mmu-miR-337-5p	N/A	-0.414732919	0.921505371	1.287924531
mmu-miR-34a	0.700396778	1.463457845	0.290469174	not DE
mmu-miR-367	-5.408024787	N/A	0.584376402	N/A
mmu-miR-378*	0.192227167	-1.336226261	-0.561073141	-0.306550016
mmu-miR-449a	0.90269805	N/A	1.234333784	1.346782084
mmu-miR-449c	0.008470557	N/A	1.206887466	N/A
mmu-miR-501-3p	N/A	0.568345251	-0.184296788	-1.143462492
mmu-miR-582-3p	0.051198537	-0.569462431	N/A	-1.547055409
mmu-miR-678	0.276529113	1.185356885	0.635800385	0.511332119
mmu-miR-685	0.160108941	0.801679315	2.142683756	2.338564449
mmu-miR-709	0.590536396	0.3034685	0.637393064	1.185206516
mmu-miR-744	0.195381179	0.117643972	0.415724884	1.14172766
mmu-miR-802	N/A	N/A	1.634369961	-1.182036479
mmu-miR-877*	0.342167725	not DE	0.446425644	1.220867725
mmu-miR-878-5p	-0.029648764	N/A	-1.232433203	-0.633914057

**Tabella 7 - miRNA DE dopo trattamento con il *cocktail* di citochine nelle due linee cellulari e per entrambi i *time point*. In rosso sono indicati i miRNA sovraespressi, in verde i sottoespressi (FC > 3 o < 0.33, equivalente a LN FC > + 1 e LN FC < -1).**

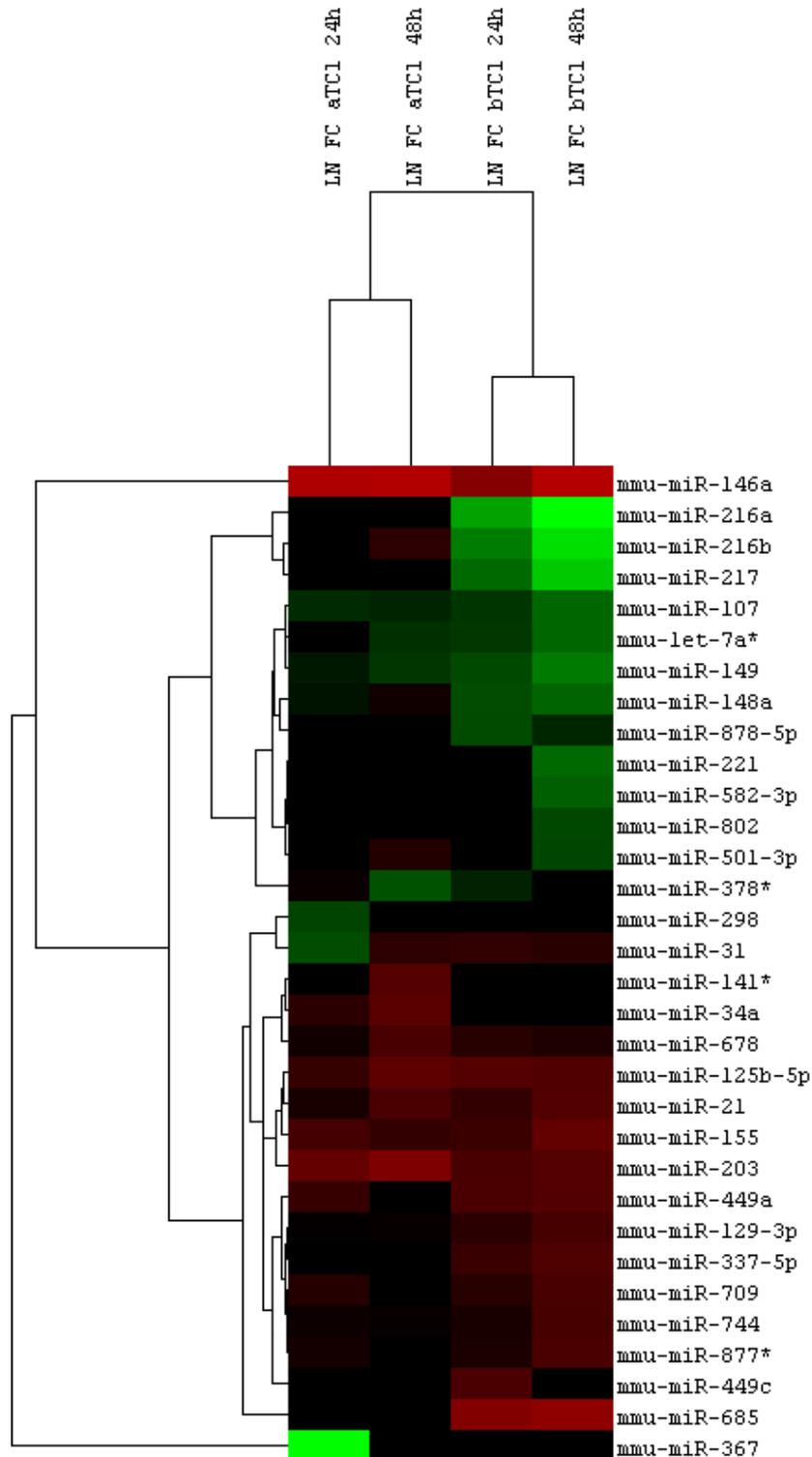
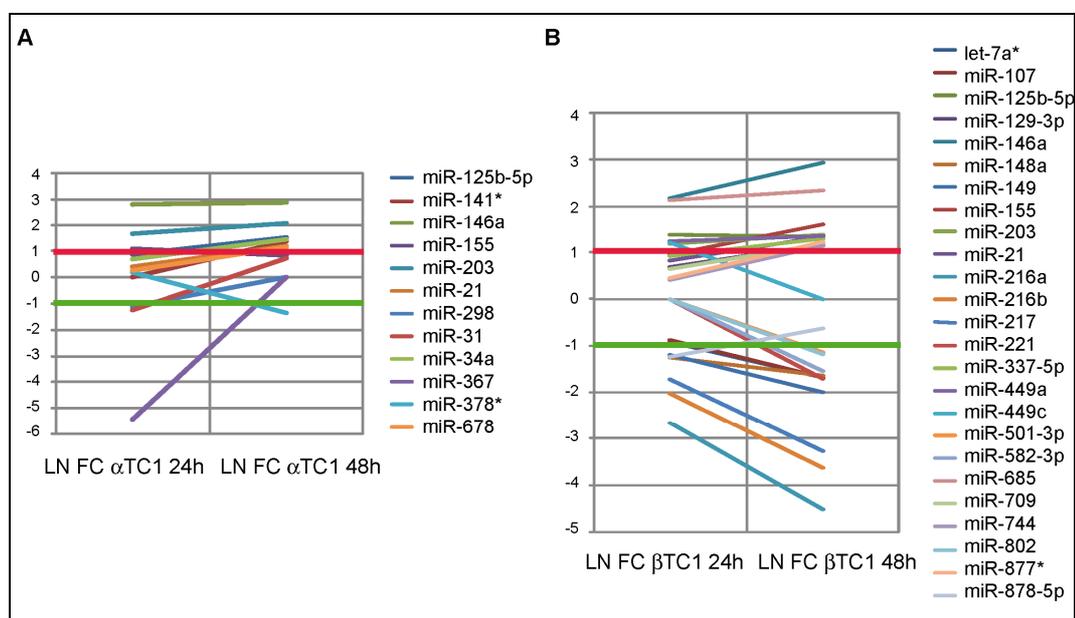


Figura 27 - miRNA DE dopo trattamento con citochine. In rosso sono indicati i miRNA sovraespressi, in verde i sottoespressi nelle  $\alpha$ TC1 24h e 48h e nelle  $\beta$ TC1 24h e 48h (FC > 3 o < 0.33, equivalente a LN FC > + 1 e LN FC < -1).

Nelle  $\alpha$ TC1 durante l'intero *time course* risultano differenzialmente espressi 12 miRNA. Fra i 6 miRNA attivati nelle  $\alpha$ TC1 a 24h, 3 risultano sovraespressi (con valori che vanno da 3 a 17 volte circa) e 3 miRNA sottoespressi (con valori che vanno da 3 a 223 volte). A 48h invece risultano sovraespressi 7 miRNA (con valori che vanno da 3 a 18 volte circa) e uno sottoespresso (di circa 3,8 volte). Il miR-203 e il miR-146a risultano sovraespressi nelle  $\alpha$ TC1 sia a 24h che a 48h (Tabella 7 e Figura 28A).

Nelle  $\beta$ TC1 durante l'intero *time course* un numero maggiore di miRNA rispetto alle  $\alpha$ TC1 risulta alterato dopo il trattamento: 25 miRNA sono differenzialmente espressi. A 24h mostrano sovraespressione 6 miRNA (con valori che vanno da 3 a 9 volte circa) mentre 6 miRNA risultano sottoespressi (con valori che vanno da 3 a 14 volte). A 48h invece risultano sovraespressi 12 miRNA (con valori che vanno da 3 a 19 volte circa) e 11 sottoespressi (con valori che vanno da 3 a 91 volte). I miR-125b-5p, miR-146a, miR-203, miR-449a, miR-685, risultano sovraespressi nelle  $\beta$ TC1 sia a 24h che a 48h, mentre i miR-148a, miR-149, miR-216a, miR-216b, miR-217 sono sottoespressi sia a 24h che a 48h (Tabella 7 e Figura 28B).



**Figura 28 - microRNA differenzialmente espressi nelle  $\alpha$ TC1 (A) e nelle  $\beta$ TC1 (B) nell'intero *time course*.**

Mettendo a confronto le due linee cellulari dopo 24h di trattamento ritroviamo 6 DE miRNA nelle  $\alpha$ TC1 e 12 DE miRNA nelle  $\beta$ TC1 (Tabella 8).

microRNA	LN FC $\alpha$ TC1 24h	microRNA	LN FC $\beta$ TC1 24h
<b>mmu-miR-146a</b>	2.838057138	mmu-miR-125b-5p	1.381608152
mmu-miR-155	1.107418694	<b>mmu-miR-146a</b>	2.178567986
<b>mmu-miR-203</b>	1.655238557	mmu-miR-148a	-1.244071838
mmu-miR-298	-1.106564102	mmu-miR-149	-1.199720584
mmu-miR-31	-1.251572225	<b>mmu-miR-203</b>	1.18074103
mmu-miR-367	-5.408024787	mmu-miR-216a	-2.659725141
		mmu-miR-216b	-2.020428911
		mmu-miR-217	-1.715211254
		mmu-miR-449a	1.234333784
		mmu-miR-449c	1.206887466
		mmu-miR-685	2.142683756
		mmu-miR-878-5p	-1.232433203

**Tabella 8 - miRNA DE in  $\alpha$ TC1 e  $\beta$ TC1 dopo 24h di trattamento. In neretto i miRNA DE comuni alle  $\alpha$  e alle  $\beta$  cellule.**

Il set di DE miRNA a 24h risulta differente nelle due linee cellulari, ad eccezione di miR-203 e miR-146a, che sono sovraespressi sia nelle  $\alpha$ TC1 che nelle  $\beta$ TC1. Dopo 48h di trattamento il numero di DE miRNA aumenta in entrambe le linee cellulari: risultano differenzialmente espressi 8 miRNA nelle  $\alpha$ TC1 e 23 miRNA nelle  $\beta$ TC1 (Tabella 9).

microRNA	LN FC $\alpha$ TC1 48h	microRNA	LN FC $\beta$ TC1 48h
<b>mmu-miR-125b-5p</b>	1.530673713	mmu-let-7a*	-1.684658829
mmu-miR-141*	1.387261475	mmu-miR-107	-1.675348634
<b>mmu-miR-146a</b>	2.905745675	<b>mmu-miR-125b-5p</b>	1.329014295
<b>mmu-miR-203</b>	2.055334836	mmu-miR-129-3p	1.164349905
<b>mmu-miR-21</b>	1.21183918	<b>mmu-miR-146a</b>	2.938879121
mmu-miR-34a	1.463457845	mmu-miR-148a	-1.631400677
mmu-miR-378*	-1.336226261	mmu-miR-149	-2.000729091
mmu-miR-678	1.185356885	mmu-miR-155	1.601346278
		<b>mmu-miR-203</b>	1.382006784
		<b>mmu-miR-21</b>	1.336974398

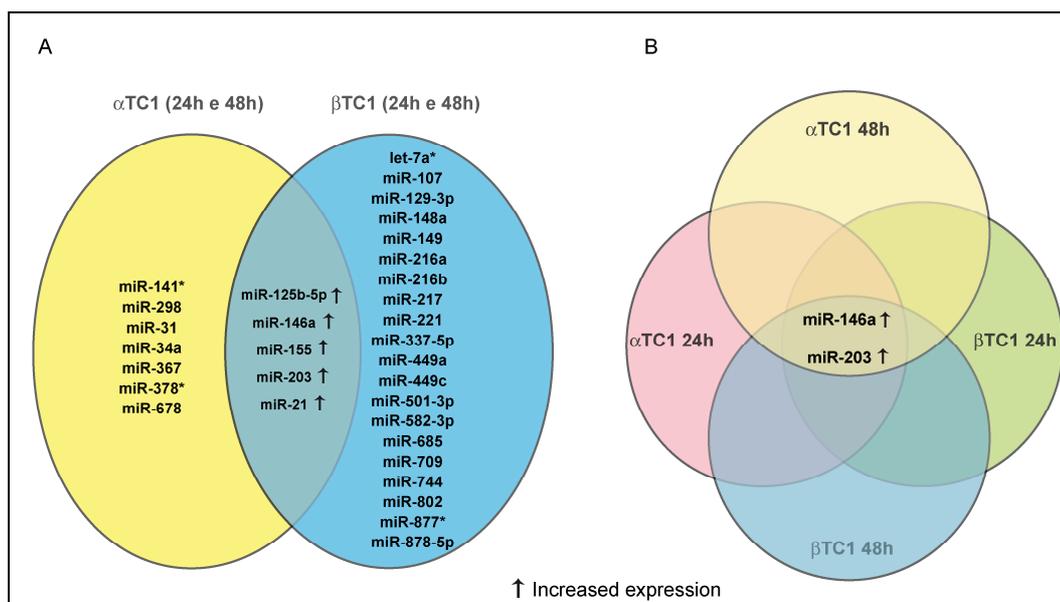
		mmu-miR-216a	-4.514144349
		mmu-miR-216b	-3.626781488
		mmu-miR-217	-3.271984053
		mmu-miR-221	-1.711264749
		mmu-miR-337-5p	1.287924531
		mmu-miR-449a	1.346782084
		mmu-miR-501-3p	-1.143462492
		mmu-miR-582-3p	-1.547055409
		mmu-miR-685	2.338564449
		mmu-miR-709	1.185206516
		mmu-miR-744	1.14172766
		mmu-miR-802	-1.182036479
		mmu-miR-877*	1.220867725

**Tabella 9 - miRNA DE in  $\alpha$ TC1 e  $\beta$ TC1 dopo 48h di trattamento. In neretto i miRNA DE comuni alle  $\alpha$  e alle  $\beta$  cellule.**

Anche in questo caso il *set* di miRNA differenzialmente espressi a 48h risulta differente nelle due linee cellulari, ad eccezione di miR-125b-5p, miR-146a, miR-203 e miR-21 che sono sovraespressi sia nelle  $\alpha$ TC1 che nelle  $\beta$ TC1.

Confrontando invece le due linee cellulari nell'intero *time course* notiamo che 7 miRNA sono alterati in maniera specifica nelle  $\alpha$ TC1, 20 nelle  $\beta$ TC1, e 5 sono comuni ai due fenotipi cellulari (Figura 29A).

I miR-146a e miR-203 risultano sovraespressi in entrambe le linee cellulari sia a 24h che a 48h; in particolare per il miR-146a il valore di espressione aumenta da 17 a 18 volte circa passando dalle 24h alle 48h nelle  $\alpha$ TC1 e da 8 a 18 volte circa passando dalle 24h alle 48h nelle  $\beta$ TC1, mentre per il miR-203 tale valore passa da 5 a 7 volte circa passando dalle 24h alle 48h nelle  $\alpha$ TC1 e da 3 a 4 volte circa dalle 24h alle 48h nelle  $\beta$ TC1 (Tabella 7 e Figura 29B).



**Figura 29 - (A) miRNA DE specifici o comuni alle  $\alpha$ TC1 e alle  $\beta$ TC1 (alle 24h e alle 48h); (B) miRNA alterati in entrambi i fenotipi cellulari e in entrambi i *time point*.**

Abbiamo stilato una “classifica” dei miRNA maggiormente disregolati in senso di sovra- e di sottoespressione per ogni linea cellulare alle 24h e 48h. Dove possibile abbiamo preso in considerazione i “Top 5” miRNA con maggiori livelli di sovraespressione e di sottoespressione (nel caso delle  $\alpha$ TC1 a 24h solo 3 miRNA sono sovraespressi e 3 sottoespressi, mentre nelle  $\alpha$ TC1 a 48h solo un miRNA risulta sottoespresso). Il miR-146a è risultato il microRNA con maggiori livelli di sovraespressione in entrambe le linee cellulari e in entrambi i *time point* (Tabelle 10 e 11).

miRNA maggiormente alterati nelle $\alpha$ TC1 24h		miRNA maggiormente alterati nelle $\alpha$ TC1 48h	
microRNA	Media LN FC trattato/controllo rispetto ai tre endogeni	microRNA	Media LN FC trattato/controllo rispetto ai tre endogeni
mmu-miR-146a	2.838057138	mmu-miR-146a	2.905745675
mmu-miR-203	1.655238557	mmu-miR-203	2.055334836
mmu-miR-155	1.107418694	mmu-miR-125b-5p	1.530673713
mmu-miR-367	-5.408024787	mmu-miR-34a	1.463457845
mmu-miR-31	-1.251572225	mmu-miR-141*	1.387261475
mmu-miR-298	-1.106564102	mmu-miR-378*	-1.336226261

**Tabella 10 - Top 5 miRNA con i maggiori livelli di sovraespressione e di sottoespressione per le  $\alpha$ TC1 a 24h e a 48h (in neretto il miRNA con il livello di espressione maggiormente alterato).**

miRNA maggiormente alterati nelle $\beta$ TC1 24h		miRNA maggiormente alterati nelle $\beta$ TC1 48h	
microRNA	Media LN FC trattato/controllo rispetto ai tre endogeni	microRNA	Media LN FC trattato/controllo rispetto ai tre endogeni
<b>mmu-miR-146a</b>	<b>2.178567986</b>	<b>mmu-miR-146a</b>	<b>2.938879121</b>
mmu-miR-685	2.142683756	mmu-miR-685	2.338564449
mmu-miR-125b-5p	1.381608152	mmu-miR-155	1.601346278
mmu-miR-449a	1.234333784	mmu-miR-203	1.382006784
mmu-miR-449c	1.206887466	mmu-miR-449a	1.346782084
mmu-miR-216a	-2.659725141	mmu-miR-216a	-4.514144349
mmu-miR-216b	-2.020428911	mmu-miR-216b	-3.626781488
mmu-miR-217	-1.715211254	mmu-miR-217	-3.271984053
mmu-miR-148a	-1.244071838	mmu-miR-149	-2.000729091
mmu-miR-878-5p	-1.232433203	mmu-miR-221	-1.711264749

**Tabella 11 - Top 5 miRNA con i maggiori livelli di sovraespressione e di sottoespressione per le  $\beta$ TC1 a 24h e a 48h (in neretto il miRNA con il livello di espressione maggiormente alterato).**

Abbiamo messo a confronto i microRNA che variano in maniera significativa in condizioni fisiologiche tra le due linee cellulari con quelli alterati dopo trattamento per ogni fenotipo cellulare e per ogni singolo *time point*.

Per le  $\alpha$ TC1 a 24h quattro miRNA risultano variare sia a *steady state* (nelle  $\alpha$  rispetto alle  $\beta$  cellule) che dopo trattamento con citochine (nei trattati rispetto ai controlli). I miR-203, miR-298 e miR-367 mostrano andamento di espressione opposto in condizioni normali e dopo esposizione a citochine (Tabella 12).

microRNA	Valori di espressione (LN FC) a <i>steady state</i> a 24h ( $\alpha$ TC1 rispetto alle $\beta$ TC1)	Valori di espressione (LN FC) dopo trattamento a 24h $\alpha$ TC1
<b>mmu-miR-203</b>	-2.637299389	<b>1.655238557</b>

mmu-miR-298	1.843111104	-1.106564102
mmu-miR-31	-6.130439559	-1.251572225
mmu-miR-367	3.040965433	-5.408024787

**Tabella 12 - miRNA la cui espressione risulta variare sia a *steady state* (nelle  $\alpha$  rispetto alle  $\beta$  cellule) che dopo trattamento con citochine (nelle  $\alpha$ TC1 trattate rispetto al controllo) nel *time point* a 24h.**

Le  $\alpha$ TC1 a 48h mostrano cinque miRNA che variano sia a *steady state* che dopo trattamento. I miR-125b-5p e miR-203 hanno livelli di espressione antitetici nella stessa linea cellulare prima e dopo trattamento (Tabella 13).

microRNA	Valori di espressione (LN FC) a <i>steady state</i> a 48h ( $\alpha$ TC1 rispetto alle $\beta$ TC1)	Valori di espressione (LN FC) dopo trattamento a 48h $\alpha$ TC1
mmu-miR-125b-5p	-2.989485493	1.530673713
mmu-miR-146a	1.568715869	2.905745675
mmu-miR-203	-2.227494588	2.055334836
mmu-miR-21	1.70490508	1.21183918
mmu-miR-378*	-2.257805586	-1.336226261

**Tabella 13 - miRNA la cui espressione risulta variare sia a *steady state* (nelle  $\alpha$  rispetto alle  $\beta$  cellule) che dopo trattamento con citochine (nelle  $\alpha$ TC1 trattate rispetto al controllo) nel *time point* a 48h.**

Per le  $\beta$ TC1 a 24h otto miRNA risultano alterati a *steady state* (nelle  $\alpha$  rispetto alle  $\beta$  cellule) e dopo trattamento. I miR-216a, miR-216b, miR-217 e miR-878-5p mostrano un *trend* di espressione opposto in condizioni fisiologiche e dopo esposizione a citochine (Tabella 14).

microRNA	Valori di espressione (LN FC) a <i>steady state</i> a 24h ( $\alpha$ TC1 rispetto alle $\beta$ TC1)	Valori di espressione (LN FC) dopo trattamento a 24h $\beta$ TC1
mmu-miR-125b-5p	-2.233735931	1.381608152
mmu-miR-203	-2.637299389	1.18074103
mmu-miR-216a	-6.157703463	-2.659725141

mmu-miR-216b	-12.69315013	-2.020428911
mmu-miR-217	-7.234905822	-1.715211254
mmu-miR-449a	-5.57161841	1.234333784
mmu-miR-685	-1.767379923	2.142683756
mmu-miR-878-5p	-2.525614317	-1.232433203

**Tabella 14 - miRNA la cui espressione risulta variare sia a *steady state* (nelle  $\alpha$  rispetto alle  $\beta$  cellule) che dopo trattamento con citochine (nelle  $\beta$ TC1 trattate rispetto al controllo) nel *time point* a 24h.**

Infine le  $\beta$ TC1 a 48h mostrano dodici miRNA che variano sia a *steady state* che dopo esposizione a citochine. I miR-146a, miR-21, miR-216a, miR-216b, miR-217, miR-221 e miR-802 hanno livelli di espressione antitetici nella stessa linea cellulare prima e dopo trattamento (Tabella 15).

microRNA	Valori di espressione (LN FC) a <i>steady state</i> a 48h ( $\alpha$ TC1 rispetto alle $\beta$ TC1)	Valori di espressione (LN FC) dopo trattamento a 48h $\beta$ TC1
mmu-miR-125b-5p	-2.989485493	1.329014295
mmu-miR-129-3p	-2.509715008	1.164349905
mmu-miR-146a	1.568715869	2.938879121
mmu-miR-203	-2.227494588	1.382006784
mmu-miR-21	1.70490508	1.336974398
mmu-miR-216a	-12.24114307	-4.514144349
mmu-miR-216b	-6.040097629	-3.626781488
mmu-miR-217	-11.53798372	-3.271984053
mmu-miR-221	-11.35513565	-1.711264749
mmu-miR-449a	-4.584985883	1.346782084
mmu-miR-685	-1.763491122	2.338564449
mmu-miR-802	-5.00496376	-1.182036479

**Tabella 15 - miRNA la cui espressione risulta variare sia a *steady state* (nelle  $\alpha$  rispetto alle  $\beta$  cellule) che dopo trattamento con citochine (nelle  $\beta$ TC1 trattate rispetto al controllo) nel *time point* a 48h.**

Il 18% dei nostri DE miRNA (let-7a\*, mir-125b-5p, miR-141\*, mir-149, mir-34a, mir-449a, mir-449c, mir-582-3p, mir-877\*) risulta ricadere in regioni genomiche candidate per il coinvolgimento nel Diabete di tipo 1.

### ***Targets dei microRNA e analisi delle networks***

Abbiamo ricercato tramite analisi computazionale i *targets* predetti e validati dei 32 DE miRNA attraverso i *tools* miRecords e Tarbase, identificando un totale di circa 540 *targets*.

Abbiamo costruito quattro *networks* a partire dai DE miRNA risultati variare in maniera specifica in ognuna delle due linee cellulari in ogni *time point* dopo trattamento con citochine, dai *targets* validati e predetti, e dai loro primi interattori (vedi Materiali e Metodi).

La *network* delle  $\alpha$ TC1 a 24h consiste di 831 nodi (6 miRNA e 825 proteine), quella delle  $\alpha$ TC1 a 48h presenta 700 nodi (8 miRNA e 692 proteine), mentre quelle delle  $\beta$ TC1 a 24h e delle  $\beta$ TC1 a 48h consistono rispettivamente di 1069 (12 miRNA e 1057 proteine) e 1427 nodi (20 miRNA e 1407 proteine).

Abbiamo poi determinato le GO (Gene Ontology) statisticamente sovrarappresentate nelle quattro *networks* (*hypergeometric test, Benjamini & Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction, P<0.05*); tale analisi ha evidenziato che non ci sono significative differenze tra entrambi i fenotipi cellulari dopo trattamento con citochine pro-infiammatorie.

Abbiamo analizzato le *pathways* potenzialmente alterate nelle  $\alpha$ TC1 e  $\beta$ TC1, ma anche in questo caso i nostri risultati non hanno mostrato differenze significative tra le due popolazioni cellulari.

Per ognuna delle due linee cellulari e per ogni *time point* abbiamo preso in considerazione i microRNA DE ed abbiamo effettuato un confronto tra i *targets* predetti e validati ottenuti e il *set* di geni di seconda classe del Macchinario Apoptotico (MA) risultati candidati per il Diabete in un lavoro recentemente completato dal nostro gruppo di ricerca [Barbagallo D *et al.*, in preparazione] (Tabella 16).

Candidate gene name	Function	PubMed IDs	Candidate gene name	Function	PubMed IDs
<i>18S RNA</i>	Marker of cell growth	11034407	<i>Nfkb1</i>	Pro	18481952
<i>Atf3</i>	Pro	18057093	<i>Nfkb2</i>	Pro	18481952
<i>Bbc3</i>	Pro	17896961	<i>Nfkbia</i>	Anti	18481952
<i>Bcl2</i>	Anti	18313386	<i>Nod1</i>	Pro	10224040
<i>Bcl2l11</i>	Pro	15452118	<i>Nos2</i>	Pro	18217711
<i>Bcl3</i>	Anti	16732314	<i>Rela</i>	Pro	18481952
<i>Bid</i>	Pro	11375329	<i>Relb</i>	Pro	18481952
<i>Birc3</i>	Anti	19343319	<i>Stat1</i>	Pro	17620422
<i>Bnip3</i>	Pro	18092960	<i>Stat3</i>	Anti	12949733
<i>Casp12</i>	Pro	12031969	<i>Tnfaip3</i>	Anti	16936197
<i>Cebpa</i>	Pro	19168033	<i>Tnfrsf10b</i>	Pro	15173180, 17172650
<i>Ddit3</i>	Pro	18776938	<i>Ikbkg</i>	Anti	15528996
<i>Dffb</i>	Pro	18178165	<i>Traf4</i>	Pro	12788948
<i>Fas</i>	Pro	19239902	<i>Nfkbib</i>	Anti	18481952
<i>Jak3</i>	Pro	18793127	<i>Gadd45b</i>	Anti	16528573, 17659913
<i>Map3k14</i>	Pro	15084608	<i>Casp8</i>	Pro	17563067
<i>Mdm2</i>	Pro	18802403			

**Tabella 16 - Geni pro- e antiapoptotici MA candidati per il Diabete [Barbagallo D et al., in preparazione].**

Abbiamo ottenuto un *target* MA per quanto riguarda le  $\alpha$ TC1 a 24h (Traf3), uno per le  $\alpha$ TC1 a 48h (Stat3), due per le  $\beta$ TC1 a 24h (Stat3 e Bbc3) e uno per le  $\beta$ TC1 a 48h (Stat3) come mostrato nelle tabelle 17, 18, 19, 20.

microRNA	Geni MA candidati per il Diabete risultati essere <i>targets</i> dei DE miRNA nelle $\alpha$ TC1 a 24h	<i>targets</i> LN FC $\alpha$ TC1 24h dopo trattamento
mmu-miR-155	nessun target MA	
mmu-miR-203	nessun target MA	
mmu-miR-298	nessun target MA	
mmu-miR-31	nessun target MA	
mmu-miR-367	<b>Traf3</b>	0.386703
mmu-miR-146a	nessun target MA	

**Tabella 17 - Geni MA candidati per il Diabete risultati essere *targets* dei DE miRNA nelle  $\alpha$ TC1 a 24h.**

microRNA	Geni MA candidati per il Diabete risultati essere <i>targets</i> dei DE miRNA nelle $\alpha$ TC1 a 48h	<i>targets</i> LN FC $\alpha$ TC1 48h dopo trattamento
mmu-miR-125b-5p	<b>Stat3</b>	1.774089068
mmu-miR-141*	nessun target MA	
mmu-miR-146a	nessun target MA	
mmu-miR-203	nessun target MA	
mmu-miR-21	<b>Stat3</b>	1.774089068
mmu-miR-34a	nessun target MA	
mmu-miR-678	nessun target MA	
mmu-miR-378*	nessun target MA	

**Tabella 18 - Geni MA candidati per il Diabete risultati essere *targets* dei DE miRNA nelle  $\alpha$ TC1 a 48h.**

microRNA	Geni MA candidati per il Diabete risultati essere <i>targets</i> dei DE miRNA nelle $\beta$ TC1 a 24h	<i>targets</i> LN FC $\beta$ TC1 24h dopo trattamento
mmu-miR-125b-5p	<b>Stat3</b>	2.007765733
mmu-miR-146a	nessun target MA	
mmu-miR-148a	<b>Bbc3</b>	0.94838315
mmu-miR-149	nessun target MA	
mmu-miR-203	nessun target MA	
mmu-miR-216a	nessun target MA	
mmu-miR-216b	nessun target MA	
mmu-miR-217	nessun target MA	
mmu-miR-449a	nessun target MA	
mmu-miR-449c	nessun target MA	
mmu-miR-685	nessun target MA	
mmu-miR-878-5p	nessun target MA	

**Tabella 19 - Geni MA candidati per il Diabete risultati essere *targets* dei DE miRNA nelle  $\beta$ TC1 a 24h.**

microRNA	Geni MA candidati per il Diabete risultati essere <i>targets</i> dei DE miRNA nelle $\beta$ TC1 a 48h	<i>targets</i> LN FC $\beta$ TC1 48h dopo trattamento
mmu-let-7a*	nessun target MA	
mmu-miR-107	nessun target MA	
mmu-miR-125b-5p	<b>Stat3</b>	2.164453386
mmu-miR-129-3p	nessun target MA	
mmu-miR-146a	nessun target MA	
mmu-miR-148a	<b>Bbc3</b>	1.451061225
mmu-miR-149	nessun target MA	
mmu-miR-155	nessun target MA	
mmu-miR-203	nessun target MA	
mmu-miR-21	<b>Stat3</b>	2.164453386
mmu-miR-216a	nessun target MA	
mmu-miR-216b	nessun target MA	
mmu-miR-217	nessun target MA	
mmu-miR-221	nessun target MA	
mmu-miR-337-5p	nessun target MA	
mmu-miR-449a	nessun target MA	
mmu-miR-501-3p	nessun target MA	
mmu-miR-582-3p	nessun target MA	
mmu-miR-685	nessun target MA	
mmu-miR-709	nessun target MA	
mmu-miR-744	nessun target MA	
mmu-miR-802	nessun target MA	
mmu-miR-877*	nessun target MA	

**Tabella 20 - Geni MA candidati per il Diabete risultati essere *targets* dei DE miRNA nelle  $\beta$ TC1 a 48h.**

Stat3, il cui prodotto è una proteina con funzione anti-apoptotica, risulta, in base ai dati ottenuti nel nostro precedente lavoro, sovraespresso come trascritto in entrambe le linee cellulari e nell'intero *time course*. La forma non fosforilata della proteina codificata da Stat3 presenta livelli di espressione normali dopo trattamento con citochine rispetto ai controlli, mentre la sua forma attiva (fosforilata in Tyr705) mostra sottoespressione nelle  $\beta$ TC1 a 24h e a 48h, al contrario delle  $\alpha$ TC1 (sia a 24h che a 48h) in cui presenta livelli di espressione normali (Tabella 21).

<i>Time point</i>	<i>p-STAT3 protein fold change (post treatment)</i>
$\alpha$ TC1 24h	1.02
$\alpha$ TC1 48h	2.15
$\beta$ TC1 24h	<b>0.07 down</b>
$\beta$ TC1 48h	<b>0.03 down</b>

**Tabella 21 - Esperimenti di Western blot su p-STAT3 in linee  $\alpha$ TC1 e  $\beta$ TC1 dopo 24h e 48h ore di trattamento con citochine [Barbagallo D *et al.*, in preparazione].**

## Discussione

Per le loro caratteristiche i microRNA sono molecole notevolmente promettenti per lo studio delle basi molecolari delle malattie genetiche, la diagnosi, la prognosi, il disegno di terapie mirate. Essi svolgono funzioni critiche nelle *networks* cellulari nelle quali occupano posizioni gerarchicamente elevate: di conseguenza, è logico ipotizzare che possano essere coinvolti nella patogenesi di una patologia sistemica come il Diabete Mellito.

Nonostante un'estesa bibliografia, è evidente che le basi molecolari del DM non sono state fino ad ora sufficientemente studiate a livello di sistema. Varie linee cellulari  $\beta$  pancreatiche murine sono state utilizzate per lo studio dei cambiamenti fenotipici e molecolari nelle cellule  $\beta$  dopo esposizione a citochine [115, 182] mentre, al contrario, è ancora insufficiente la caratterizzazione della risposta  $\alpha$  cellulare allo stimolo apoptotico.

Nell'ambito di questo progetto abbiamo analizzato il ruolo dei microRNA nella patogenesi di questa malattia, utilizzando tecnologie molecolari *High Throughput* per caratterizzare il profilo biomolecolare delle cellule  $\alpha$  e  $\beta$  pancreatiche.

In particolare abbiamo identificato un *set* di miRNA differenzialmente espressi nelle due linee cellulari murine  $\alpha$ TC1 e  $\beta$ TC1; le cellule sono state analizzate sia a *steady state* che dopo induzione di apoptosi con un *cocktail* di citochine pro-infiammatorie, per un *time course* di 48h, per mimare lo stress immunologico: secondo un consenso generale, questo costituisce una componente patogenetica importante di entrambe le forme più frequenti di Diabete.

Le nostre analisi ci hanno permesso di verificare che i due fenotipi cellulari maggiormente rappresentati nel pancreas hanno un profilo di espressione di miRNA differente già in condizioni fisiologiche: il 22% circa dei miRNA analizzati nel nostro studio presenta livelli di espressione diversi tra le  $\alpha$ TC1 e le  $\beta$ TC1.

L'esposizione prolungata e ad alte concentrazioni delle linee cellulari murine di glucagonoma ( $\alpha$ TC1) e di insulinoma ( $\beta$ TC1) al *cocktail* di citochine induce marcati cambiamenti nell'espressione dei microRNA rispetto a quanto avviene

nelle stesse cellule in condizioni non perturbate ed in misura maggiore nelle  $\beta$ TC1 piuttosto che nelle  $\alpha$ TC1 (25 miRNA sono differenzialmente espressi nelle  $\beta$  cellule, mentre 12 miRNA risultano differenzialmente espressi nelle  $\alpha$  cellule dopo trattamento, durante l'intero *time course*) (vedi Figura 28).

Alcuni dei miRNA analizzati sono già noti essere attivati in  $\beta$  cellule pancreatiche stimulate con citochine (ad esempio miR-146a, miR-21 e miR-34a sono coinvolti nel processo di secrezione insulinica nelle  $\beta$  cellule e nella loro proliferazione e apoptosi) [172] e ci sono dunque serviti come controlli positivi per verificare che il nostro sistema trovasse riscontro, almeno in parte, nei dati presenti in letteratura.

La costante disregolazione che presentano alcuni miRNA a 24h e 48h nelle due linee cellulari (miR-125b-5p, miR-146a, miR-148a, miR-149, miR-203, miR-216a, miR-216b, miR-217, miR-449a e miR-685) suggerisce che possano avere un importante ruolo nella cascata di segnali scatenata dalle citochine.

Fatte alcune eccezioni (miR-125b-5p, miR-155, miR-146a e miR-203) non sono state riscontrate sovrapposizioni tra le due linee. L'induzione di un miRNA sia nelle  $\alpha$ TC1 che nelle  $\beta$ TC1 potrebbe rappresentare un meccanismo fisiologico di risposta all'azione delle citochine comune fra due fenotipi cellulari che condividono la stessa origine endodermica.

Il miR-146a (insieme al miR-203) risulta sovraespresso in entrambi i fenotipi cellulari e in ambedue i *time point* dopo trattamento e rappresenta il miRNA la cui espressione risulta maggiormente perturbata (nel senso di una sovraespressione) a seguito dello stress citochino-mediato.

La sua induzione, come mostrato recentemente nel caso di cellule pancreatiche produttrici di insulina (oltre che in altri sistemi cellulari), è controllata dalla *pathway* di NF $\kappa$ B. Sono presenti diversi siti di legame per tale fattore di trascrizione nel promotore del miR-146a [172, 183]. Non è noto se anche nel caso del fenotipo  $\alpha$  cellulare NF $\kappa$ B sia responsabile dell'attivazione di tale miRNA. NF $\kappa$ B è un fattore di trascrizione coinvolto nella disfunzione delle  $\beta$  cellule mediata dalle citochine e nello sviluppo del Diabete; la sovraespressione di un super-repressore di NF $\kappa$ B protegge le  $\beta$  cellule dall'apoptosi indotta dalle citochine [182, 185]. Nelle linee cellulari  $\alpha$ TC1 e  $\beta$ TC1 trattate con citochine per

24h e 48h si evidenzia una generale attivazione di NFκB [Barbagallo *et al.*, in preparazione]. Il blocco del miR-146a aumenta la secrezione di insulina stimolata dal glucosio in cellule trattate con IL-1β e protegge parzialmente le cellule dall'apoptosi. Ciò indica che parte degli effetti risultanti dall'attivazione della *pathway* di NFκB nelle β cellule può essere mediata dall'induzione del miR-146a [172].

Una sostenuta attivazione di NFκB ha effetti negativi per le β cellule, mentre al contrario una sua moderata induzione è richiesta per una corretta secrezione di insulina e per la sopravvivenza β cellulare [164, 186]. Il miR-146a regolerebbe l'attività di numerosi messaggeri *targets* tra cui IRAK-1 (*Interleuchin-1 Receptor-Associated Kinase 1*) e TRAF 6 (*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6*), due componenti chiave del *signalling* delle citochine pro-infiammatorie IL-1β e TNFα [172]. Una moderata induzione di tale miRNA può contribuire a modulare la risposta delle cellule a queste due citochine (si ipotizza un'azione di *feedback* negativo operata dal miR-146a sulla *pathway* infiammatoria [183]); al contrario una sua forte e prolungata attivazione può risultare nella repressione di ulteriori *targets*, con un impatto deleterio sulla secrezione di insulina e la sopravvivenza delle β cellule.

I meccanismi molecolari che stanno alla base del contributo del miR-146a agli effetti deleteri delle citochine sulle β cellule rimangono comunque ancora sconosciuti.

Un altro microRNA interessante in base alle nostre analisi è il miR-203, che risulta sovraespresso in entrambi i fenotipi cellulari per l'intero *time course*; secondo dati di letteratura tale miRNA sembrerebbe essere coinvolto nella risposta immunitaria ed essere associato a malattie infiammatorie come psoriasi e eczema atopico [187]. È stato sperimentalmente dimostrato essere un regolatore negativo dell'espressione di SOCS3 (*Suppressor Of Cytokines Signaling-3*), appartenente ad una famiglia di proteine intracellulari che controllano, inattivandolo, il *signalling* delle citochine, e inibitore della *pathway* di STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription3*) indotta da citochine infiammatorie, come IL-6 o IFNγ.

È stato mostrato che SOCS1 e SOCS3, che sono indotte da  $\text{IFN}\gamma$ , IL1- $\beta$  e  $\text{TNF}\alpha$ , inibiscono a loro volta il *signalling* indotto da  $\text{IFN}\gamma$  intervenendo sulla fosforilazione JAK-mediata e dimerizzazione di STAT, necessaria per la sua traslocazione al nucleo e la sua attivazione [188].

L'espressione di SOCS3 in linee cellulari  $\beta$  pancreatiche reprime l'apoptosi indotta da  $\text{TNF}\alpha$ , sola o in combinazione con IL-1 $\beta$  [189].

L'inibizione di SOCS-3 conduce ad una sostenuta attivazione di STAT3 in risposta all'IL-6 e ad altre citochine infiammatorie [190].

L'attività delle proteine STAT è regolata negativamente da diversi meccanismi tra i quali la defosforilazione del "residuo critico" di tirosina da parte di una tirosina fosfatasi [191], la degradazione mediata dal sistema ubiquitina-proteasoma [192] e l'azione di due famiglie di regolatori negativi della *pathway* JaK/STAT: la famiglia SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) e la famiglia PIAS (*Protein Inhibitors of Activated STAT*). Le proteine SOCS in particolare modulano la *pathway* di JaK/STAT a livello di JaK, mentre le proteine PIAS sembrano regolare direttamente l'attività di STAT.

Il ruolo principale di STAT3 è quello di trasduttore del segnale e fattore di trascrizione nella risposta cellulare alle citochine e ai fattori di crescita. A seguito della sua attivazione (fosforilazione in Tyr705) la proteina STAT3 dimerizza e trasloca nel nucleo dove attiva particolari geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S come Fos, Cyclin-D, CDC25A, c-Myc o Pim1 e geni anti-apoptotici come Bcl-2 e Bcl-xL [193].

Per il suo ruolo chiave in eventi biologici come lo sviluppo embrionale, l'apoptosi, l'organogenesi, l'immunità innata e adattativa, l'infiammazione e la proliferazione cellulare di numerosi organismi, STAT3 si propone come un determinante fondamentale nell'insorgenza di numerose malattie. È noto come importante segnale di sopravvivenza nelle  $\beta$  cellule pancreatiche, mediando gli effetti positivi sulla proliferazione cellulare di vari fattori di crescita e citochine che includono il fattore di crescita degli epatociti [194], la beta cellulina e LIF (*Leukaemia Inhibiting Factor*). È stato di recente dimostrato che la sua attivazione protegge le  $\beta$  cellule della linea pancreatica NIT-1 dall'apoptosi indotta dal trattamento con citochine e riduce l'incidenza del Diabete in topi NOD [195].

La soppressione di SOCS-3 operata dagli alti livelli del miR-203 osservati nel nostro studio può teoricamente essere alla base degli elevati livelli di espressione del trascritto di STAT3 che abbiamo osservato nelle  $\alpha$ TC1 e nelle  $\beta$ TC1, dopo 24h e 48h di trattamento con citochine [Barbagallo *et al.*, in preparazione]. Esperimenti di Western blot condotti nello stesso lavoro hanno mostrato che i livelli della proteina STAT3 (non fosforilata) sono normali in entrambi i fenotipi cellulari nei trattati rispetto ai controlli, al contrario della forma attiva (fosforilata) che si presenta sottoespressa specificamente nelle  $\beta$  cellule, nell'intero *time course*. Ciò potrebbe in parte spiegare la maggiore tendenza che si osserva nelle cellule  $\beta$  pancreatiche ad andare incontro ad apoptosi rispetto alle cellule  $\alpha$ . Inoltre l'intersezione dei dati ottenuti dalle analisi di trascrittoma e proteoma dei geni *core* del Macchinario Apoptotico (MA) candidati per il Diabete nel lavoro precedentemente citato del nostro gruppo di ricerca [Barbagallo *et al.*, in preparazione] con i dati di espressione dei microRNA derivanti dal nostro studio, propone i miR-125b-5p e miR-21 come regolatori negativi di STAT3. In particolare, entrambi i miRNA nel *time point* a 24h mostrano un livello di espressione maggiore nel fenotipo  $\beta$  cellulare piuttosto che nelle  $\alpha$  cellule. Nelle  $\alpha$ TC1 a 24h entrambi i microRNA sono poco espressi (rispetto alle  $\beta$ TC1) quindi STAT3 tende ad aumentare i livelli del suo trascritto. Nelle  $\beta$ TC1 sia il miR-21 che il miR-125b-5p sono invece maggiormente espressi; nonostante come detto precedentemente, i livelli di trascritto di STAT3 siano elevati, la proteina attiva risulta sottoespressa. Non vi sono finora dati in possesso della comunità scientifica che possano supportare un ruolo dei miRNA nella regolazione dei livelli di proteine fosforilate. Ciò suggerisce che l'azione regolatoria di tali miRNA su STAT3 possa esplicitarsi attraverso meccanismi indiretti non ancora noti.

In base a quanto riportato, il miR-125-5p potrebbe essere da prioritizzare come miRNA candidato per il Diabete dato che ha tra i suoi mRNA *targets* STAT3, bersaglio anche del miR-21 che è già noto in letteratura essere coinvolto nella patogenesi del Diabete [172,196].

Tra i nostri DE miRNA, il miR-148a ha tra i suoi *targets* predetti BBC3 (BCL2 *binding component 3*), risultato candidato per il Diabete in base ai dati ottenuti nel

lavoro del nostro gruppo di ricerca a cui abbiamo fatto riferimento [Barbagallo *et al.*, in preparazione]. Come evidenziato da Gurzov *et al.* recentemente, le citochine pro-infiammatorie IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  inducono l'espressione di BBC3 nelle  $\beta$  cellule. Tale attivazione trascrizionale, regolata da NF $\kappa$ B e da stress del reticolo endoplasmatico, porta alla traslocazione mitocondriale di Bax, al rilascio del citocromo c, all'attivazione della caspasi 3 e alla morte cellulare. La proteina antiapoptotica Bcl-XL, localizzata a livello dei mitocondri nelle  $\beta$  cellule antagonizza, in condizioni fisiologiche, l'azione di BBC3. Nel caso di esposizione a citochine Bcl-XL viene inattivata, dando luogo a morte cellulare indotta da BBC3 [197]. Dai nostri esperimenti il miR-148a risulta espresso normalmente nelle  $\alpha$ TC1, ma sottoespresso nelle  $\beta$ TC1. Il suo bersaglio, BBC3, nello stesso sistema cellulare risulta espresso a livelli normali, come trascritto, nel fenotipo  $\alpha$  cellulare, ma sovraespresso nelle  $\beta$ TC1 a 48h [Barbagallo *et al.*, in preparazione]. Se tale sottoespressione venisse confermata anche a livello proteico, l'azione del miR-148a potrebbe contribuire alla differente sensibilità delle  $\alpha$  e  $\beta$  cellule pancreatiche alla morte per apoptosi.

La nostra attenzione si è rivolta in modo particolare ai miRNA che presentano un'importante alterazione dell'espressione in una linea rispetto all'altra, considerando anche il confronto tra i due fenotipi cellulari a *steady state*; maggiore importanza è stata data ai microRNA che mostravano variazione di espressione di segno opposto nelle due linee cellulari dopo trattamento, e livelli di espressione opposti nella stessa linea cellulare prima e dopo l'esposizione a citochine. Da questo punto di vista miR-216a, miR-216b e miR-217 rappresentano microRNA particolarmente interessanti sui quali soffermare l'attenzione e svolgere esperimenti di genomica funzionale ai fini di verificare un possibile coinvolgimento nel Diabete Mellito (in letteratura non è attualmente riportata alcuna correlazione tra questi miRNA e la malattia).

Tali microRNA sia alle 24h che alle 48h in condizioni fisiologiche sono espressi in maniera specifica nelle cellule  $\beta$  (non si esprimono nelle cellule  $\alpha$ ). Dopo trattamento con citochine, nelle  $\alpha$  cellule la loro espressione continua ad essere assente, sia alle 24h che alle 48h, mentre nelle cellule  $\beta$  i loro livelli di espressione si abbassano notevolmente rispetto ai controlli, per l'intero *time course*.

È possibile ipotizzare che l'alterazione della loro espressione dopo esposizione a citochine comporti a sua volta variazioni nei livelli di espressione di geni che potrebbero influire sulla risposta delle cellule  $\beta$  all'infiammazione o all'apoptosi.

La stretta associazione che intercorre tra i microRNA e lo sviluppo di diverse malattie, tra cui il Diabete, getta le basi per fare di queste piccole molecole regolatorie interessanti *targets* terapeutici. I meccanismi che controllano la biogenesi dei microRNA sono oggi relativamente chiari ed è cresciuta la possibilità di sviluppare approcci sperimentali per modularne la maturazione.

La loro individuazione nel siero e la variazione dei loro livelli durante l'evoluzione delle malattie suggeriscono che essi possano essere utilizzati per la diagnosi non invasiva [173]: la disponibilità di batterie di microRNA, ben caratterizzati dal punto di vista molecolare, strettamente associati alle patologie di interesse, presenti nel siero dei pazienti, dovrebbe modificare le modalità operative della Medicina e le prospettive di successo delle sue attività fondamentali: diagnosi, terapia, prognosi.

## Conclusioni

L'importanza critica delle funzioni di regolazione dei microRNA nell'ambito delle *networks* cellulari rende notevolmente credibile l'ipotesi che i geni che li codificano siano geni *master* in processi importanti quali proliferazione, metabolismo e differenziamento: di conseguenza, è altamente probabile che tali RNA non codificanti siano coinvolti anche nella genesi di patologie sistemiche degenerative o neoplastiche.

Il nostro studio si è posto l'obiettivo di identificare un *set* di microRNA che possano far comprendere meglio le basi molecolari della regolazione dell'attività dei Macchinari responsabili della morte delle cellule  $\beta$  e della proliferazione delle cellule  $\alpha$  in risposta allo stesso stimolo infiammatorio. Abbiamo a tale scopo sfruttato un sistema modello che mima gli eventi infiammatori occorrenti *in vivo* in pazienti diabetici.

Tali dati hanno per la prima volta descritto l'assetto molecolare dei microRNA nelle  $\alpha$  cellule pancreatiche dopo loro stimolazione con un *cocktail* di citochine pro-infiammatorie (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-1 $\beta$ ), oltre che gettare le basi per una migliore comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della morte delle  $\beta$  cellule.

Prospettiva futura di questo lavoro sarà l'identificazione delle alterazioni delle *pathways* e delle *networks* coinvolte (ricostruite mediante analisi computazionali avanzate) dopo trattamento delle cellule *in vitro*, oltre che la validazione dei più credibili tra i microRNA candidati mediante trasfezione di anti- oppure di pre-microRNA per determinarne il silenziamento oppure l'attivazione funzionale.

Interessante ed innovativa sarà anche la comprensione delle dinamiche di cambiamento del proteoma delle due linee cellulari a seguito della modulazione di espressione dei microRNA prioritizzati, allo scopo di assegnare un significato funzionale ai microRNA e ai moduli funzionali delle *networks*, di cui sono parte integrante.

Uno dei nostri obiettivi a lungo termine è l'identificazione di specifici genotipi associati alle varie forme di Diabete. Questi dati permetteranno di superare i limiti

evidenti dell'attuale classificazione, basata sul fenotipo clinico, e di utilizzare le conoscenze sul rapporto genotipo-fenotipo per disegnare mediante tecniche di FarmacoGenomica appropriate strategie terapeutiche.

L'identificazione di specifici microRNA nel siero di pazienti, affetti da patologie quali Diabete Mellito, Malattia di Alzheimer, Carcinoma del colon e del retto, e la dimostrazione che il loro livello ematico varia in concomitanza con l'evolversi della malattia suggeriscono fortemente che queste molecole siano potenzialmente dei biomarcatori ideali per la diagnosi avanzata, la prognosi ed il disegno di interventi terapeutici innovativi. Come detto in precedenza, è quindi facile ipotizzare che la disponibilità di batterie di microRNA (ben caratterizzati dal punto di vista molecolare, strettamente associati alle patologie di interesse, e presenti nel siero dei pazienti) possa modificare in modo radicale le modalità operative e le prospettive di successo nell'ambito della Medicina clinica.

## Bibliografia

1. Kolb H, Mandrup-Poulsen T: **The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation.** *Diabetologia* 2009.
2. Daneman D: **Type 1 diabetes.** *Lancet* 2006, **367**(9513):847-858.
3. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW: **Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment.** *Lancet* 2008, **371**(9631):2153-2156.
4. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** *Diabetes Care*, **33 Suppl 1**:S62-69.
5. Aronoff S, Berkowitz K, Shreiner B, Want L: **Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon.** *Diabetes Spectrum* 2004, **17**:183-190.
6. Liu ET: **Integrative biology--a strategy for systems biomedicine.** *Nat Rev Genet* 2009, **10**(1):64-68.
7. Malecki MT, Mlynarski W: **Monogenic diabetes: implications for therapy of rare types of disease.** *Diabetes Obes Metab* 2008, **10**(8):607-616.
8. Reece EA, Leguizamon G, Wiznitzer A: **Gestational diabetes: the need for a common ground.** *Lancet* 2009, **373**(9677):1789-1797.
9. Baggio LL, Drucker DJ: **Biology of incretins: GLP-1 and GIP.** *Gastroenterology* 2007, **132**(6):2131-2157.
10. Mimeault M, Batra SK: **Recent progress on normal and malignant pancreatic stem/progenitor cell research: therapeutic implications for the treatment of type 1 or 2 diabetes mellitus and aggressive pancreatic cancer.** *Gut* 2008, **57**(10):1456-1468.

11. Gurzov EN, Ortis F, Cunha DA, Gosset G, Li M, Cardozo AK, Eizirik DL: **Signaling by IL-1beta+IFN-gamma and ER stress converge on DP5/Hrk activation: a novel mechanism for pancreatic beta-cell apoptosis.** *Cell Death Differ* 2009, **16**(11):1539-1550.
12. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H: **Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.** *Diabetes Care* 2004, **27**(5):1047-1053.
13. Mandrup-Poulsen T: **Diabetes.** *BMJ* 1998, **316**(7139):1221-1225.
14. **Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999.** *Diabet Med* 2006, **23**(8):857-866.
15. Craig ME, Howard NJ, Silink M, Chan A: **The rising incidence of childhood type 1 diabetes in New South Wales, Australia.** *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000, **13**(4):363-372.
16. Yang Z, Wang K, Li T, Sun W, Li Y, Chang YF, Dorman JS, LaPorte RE: **Childhood diabetes in China. Enormous variation by place and ethnic group.** *Diabetes Care* 1998, **21**(4):525-529.
17. Yang Z, Long X, Shen J, Liu D, Dorman JS, Laporte RE, Chang YF: **Epidemics of type 1 diabetes in China.** *Pediatr Diabetes* 2005, **6**(3):122-128.
18. **Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group.** *Lancet* 2000, **355**(9207):873-876.
19. Zipris D: **Epidemiology of type 1 diabetes and what animal models teach us about the role of viruses in disease mechanisms.** *Clin Immunol* 2009, **131**(1):11-23.
20. Vespasiani D, Nicolucci A, Giorda C: **Epidemiologia del diabete.** In: *Annali della Sanità Pubblica: 2005.*

21. Abate N, Chandalia M: **Ethnicity and type 2 diabetes: focus on Asian Indians.** *J Diabetes Complications* 2001, **15**(6):320-327.
22. Gillespie KM: **Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention.** *CMAJ* 2006, **175**(2):165-170.
23. Pociot F, Karlsen A, Mandrup-Poulsen T: **Etiology and pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus.** In: *Endocrinology and metabolism.* Edited by International M-H. London; 2002: 593-606.
24. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS: **Type 1 diabetes: recent developments.** *BMJ* 2004, **328**(7442):750-754.
25. Gale EA: **A missing link in the hygiene hypothesis?** *Diabetologia* 2002, **45**(4):588-594.
26. Risch N: **Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease.** *Am J Hum Genet* 1987, **40**(1):1-14.
27. Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS, Leslie RD: **Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States.** *Diabetologia* 2001, **44**(3):354-362.
28. Cudworth AG, Woodrow JC: **HLA system and diabetes mellitus.** *Diabetes* 1975, **24**:345-349.
29. Devendra D, Eisenbarth GS: **Immunologic endocrine disorders.** *J Allergy Clin Immunol* 2003, **111**(2 Suppl):S624-636.
30. Eisenbarth GS, Gottlieb PA: **Autoimmune polyendocrine syndromes.** *N Engl J Med* 2004, **350**(20):2068-2079.
31. Bell GI, Horita S, Karam JH: **A polymorphic locus near the insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus.** *Diabetes* 1984, **33**:176-183

32. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SC, Jenkins SC, Palmer SM *et al*: **A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes.** *Nature* 1994, **371**(6493):130-136.
33. Mein CA, Esposito L, Dunn MG, Johnson GC, Timms AE, Goy JV, Smith AN, Sebag-Montefiore L, Merriman ME, Wilson AJ *et al*: **A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom.** *Nat Genet* 1998, **19**(3):297-300.
34. Concannon P, Gogolin-Ewens KJ, Hinds DA, Wapelhorst B, Morrison VA, Stirling B, Mitra M, Farmer J, Williams SR, Cox NJ *et al*: **A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus.** *Nat Genet* 1998, **19**(3):292-296.
35. **Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls.** *Nature* 2007, **447**(7145):661-678.
36. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G *et al*: **Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease.** *Nature* 2003, **423**(6939):506-511.
37. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M *et al*: **A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes.** *Nat Genet* 2004, **36**:337-338.
38. Nejentsev S, Guja C, McCormack R, Cooper J, Howson JM, Nutland S, Rance H, Walker N, Undlien D, Ronningen KS *et al*: **Association of intercellular adhesion molecule-1 gene with type 1 diabetes.** *Lancet* 2003, **362**(9397):1723-1724.
39. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C *et al*: **Genome-wide association**

- study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes.** *Nat Genet* 2009, **41**:703-707.
40. **The International HapMap Project.** *Nature* 2003, **426**(6968):789-796.
41. **Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** *Diabetes Care* 1997, **20**(7):1183-1197.
42. Bergholdt R, Heding P, Nielsen K, Nolsøe R, Sparre T, Størling J: **Type 1 diabetes mellitus, an inflammatory disease of the islet.** In: *Type 1 diabetes: molecular, cellular and clinical immunology.* Edited by Eisenbarth GS; 2002.
43. **Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. The Canadian-European Randomized Control Trial Group.** *Diabetes* 1988, **37**(11):1574-1582.
44. Feutren G, Papoz L, Assan R, Vialettes B, Karsenty G, Vexiau P, Du Rostu H, Rodier M, Sirmai J, Lallemand A: **Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial.** *Lancet* 1986, **2**:119-124.
45. Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Gerling I, Leiter EH, Shultz LD: **Initiation of autoimmune diabetes in NOD/Lt mice is MHC class I-dependent.** *J Immunol* 1997, **158**(8):3978-3986.
46. Jarpe AJ, Hickman MR, Anderson JT, Winter WE, Peck AB: **Flow cytometric enumeration of mononuclear cell populations infiltrating the islets of Langerhans in prediabetic NOD mice: development of a model of autoimmune insulinitis for type I diabetes.** *Reg Immunol* 1991, **3**:305-317.
47. Atkinson MA, Eisenbarth GS: **Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment.** *Lancet* 2001, **358**(9277):221-229.

48. Mandrup-Poulsen T: **The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM.** *Diabetologia* 1996, **39**(9):1005-1029.
49. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T: **A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis.** *Diabetologia* 2001, **44**(12):2115-2133.
50. Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, Scherbaum WA, Kolb H, Noordzij JG, Roep BO: **Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency.** *N Engl J Med* 2001, **345**(14):1036-1040.
51. Stadinski B, Kappler J, Eisenbarth GS: **Molecular targeting of islet autoantigens.** *Immunity* 2010, **32**(4):446-456.
52. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM *et al*: **Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes.** *Science* 2007, **316**(5829):1336-1341.
53. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** *Diabetes Care* 2006, **29 Suppl 1**:S43-48.
54. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J: **Global and societal implications of the diabetes epidemic.** *Nature* 2001, **414**(6865):782-787.
55. American Diabetes Association: **Classification of diabetes.** *Diabetes* 2001, **Vital Statistics**:5-8.
56. Leahy JL: **Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.** *Arch Med Res* 2005, **36**(3):197-209.
57. Marchetti P: **La  $\beta$ -cellula nel diabete mellito di tipo 2.** In: *Grandangolo in Diabetologia.* vol. 2 La secrezione insulinica; 2002.

58. Cerasi E, Luft R: **Insulin response to glucose infusion in diabetic and non-diabetic monozygotic twin pairs. Genetic control of insulin response?** *Acta Endocrinol (Copenh)* 1967, **55**(2):330-345.
59. Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F: **An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment.** *Regul Pept* 2008, **146**(1-3):4-11.
60. Bonora E: **Protection of pancreatic beta-cells: is it feasible?** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008, **18**(1):74-83.
61. Wajchenberg BL: **beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment.** *Endocr Rev* 2007, **28**(2):187-218.
62. Kahn SE: **The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes.** *Diabetologia* 2003, **46**(1):3-19.
63. Bonner-Weir S: **Islet growth and development in the adult.** *J Mol Endocrinol* 2000, **24**(3):297-302.
64. Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S: **Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model.** *Diabetes* 1995, **44**(3):249-256.
65. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: **Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes.** *Diabetes* 2003, **52**(1):102-110.
66. Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S: **Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients.** *Diabetologia* 2002, **45**(1):85-96.
67. Hamaguchi T, Fukushima H, Uehara M, Wada S, Shirotani T, Kishikawa H, Ichinose K, Yamaguchi K, Shichiri M: **Abnormal glucagon response to arginine and its normalization in obese hyperinsulinaemic patients**

- with glucose intolerance: importance of insulin action on pancreatic alpha cells.** *Diabetologia* 1991, **34**(11):801-806.
68. Cabreara O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A: **The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006(103):2334-2339.
69. Rhodes CJ: **Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death?** *Science* 2005, **307**(5708):380-384.
70. Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW *et al*: **Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**(5):2300-2308.
71. Thorel F, Nepote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL: **Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss.** *Nature* 2010, **464**(7292):1149-1154.
72. Henquin JC: **Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose.** *Diabetes* 2000, **49**(11):1751-1760.
73. Ahren B: **Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass.** *Curr Mol Med* 2005, **5**(3):275-286.
74. Ferrannini E, Mari A: **Beta cell function and its relation to insulin action in humans: a critical appraisal.** *Diabetologia* 2004, **47**(5):943-956.
75. Malaisse WJ: **Physiology, pathology and pharmacology of insulin secretion: recent acquisitions.** *Diabetes Metab* 1997, **23 Suppl 3**:6-15.
76. Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG: **Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics.** *Diabetes* 1987, **36**:274-283.

77. Ohneda A, Watanabe K, Horigome K, Sakai T, Kai Y, Oikawa S: **Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus.** *J Clin Endocrinol Metab* 1978, **46**(3):504-510.
78. Cerasi E, Neshar R, Gadot M, Gross D, Kaiser N: **Insulin secretion in obese and non-obese NIDDM.** *Diabetes Res Clin Pract* 1995, **28** Suppl:S27-37.
79. Yamada K, Takane-Gyotoku N, Yuan X, Ichikawa F, Inada C, Nonaka K: **Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas.** *Diabetologia* 1996, **39**(11):1306-1312.
80. Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G *et al*: **Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes.** *Diabetes* 2007, **56**(9):2356-2370.
81. Poitout V, Robertson RP: **Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity.** *Endocrinology* 2002, **143**(2):339-342.
82. Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patané G, Boggi U, Piro S, Anello M *et al*: **Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated.** *Diabetes* 2002, **51**(5):1437-1442.
83. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY: **Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets.** *J Clin Invest* 2002, **110**(6):851-860.
84. Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jonas JC, Sgroi DC, Groff A, Ferran C, Bonner-Weir S, Sharma A *et al*: **Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to**

- beta-cell survival during chronic hyperglycemia.** *Diabetes* 2002, **51**(2):413-423.
85. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: **Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?** *Diabetes* 2003, **52**(1):1-8.
86. Shimabukuro M, Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH: **Protection against lipoapoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(16):9558-9561.
87. Oprescu AI, Bikopoulos G, Naassan A, Allister EM, Tang C, Park E, Uchino H, Lewis GF, Fantus IG, Rozakis-Adcock M *et al*: **Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo.** *Diabetes* 2007, **56**(12):2927-2937.
88. Donath MY, Boni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Ehses JA: **Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes.** *Physiology (Bethesda)* 2009, **24**:325-331.
89. Mandrup-Poulsen T: **Apoptotic signal transduction pathways in diabetes.** *Biochem Pharmacol* 2003, **66**(8):1433-1440.
90. Donath MY, Storling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T: **Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes.** *J Mol Med* 2003, **81**(8):455-470.
91. Mathis D, Vence L, Benoist C: **beta-Cell death during progression to diabetes.** *Nature* 2001, **414**(6865):792-798.
92. Pietropaolo M, Barinas-Mitchell E, Pietropaolo SL, Kuller LH, Trucco M: **Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes.** *Diabetes* 2000, **49**(1):32-38.

93. Rowley MJ, Mackay IR, Chen QY, Knowles WJ, Zimmet PZ: **Antibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate major types of diabetes mellitus.** *Diabetes* 1992, **41**(4):548-551.
94. Wilkin TJ: **The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes.** *Diabetologia* 2001, **44**(7):914-922.
95. Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY: **Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets.** *Diabetes* 2001, **50**(8):1683-1690.
96. Donath MY, Storling J, Berchtold LA, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T: **Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation.** *Endocr Rev* 2008, **29**(3):334-350.
97. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ: **Apoptosis: controlled demolition at the cellular level.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**(3):231-241.
98. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P: **Caspases in cell survival, proliferation and differentiation.** *Cell Death Differ* 2007, **14**(1):44-55.
99. Delaney CA, Pavlovic D, Hoorens A, Pipeleers DG, Eizirik DL: **Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells.** *Endocrinology* 1997, **138**(6):2610-2614.
100. Liu D, Pavlovic D, Chen MC, Flodstrom M, Sandler S, Eizirik DL: **Cytokines induce apoptosis in beta-cells isolated from mice lacking the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS<sup>-/-</sup>).** *Diabetes* 2000, **49**(7):1116-1122.
101. Dinarello CA: **Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family.** *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:519-550.

102. Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Brecher P, Cohen RA: **Temporal control of NF-kappaB activation by ERK differentially regulates interleukin-1beta-induced gene expression.** *J Biol Chem* 2004, **279**(2):1323-1329.
103. Andersen NA, Larsen CM, Mandrup-Poulsen T: **TNFalpha and IFNgamma potentiate IL-1beta induced mitogen activated protein kinase activity in rat pancreatic islets of Langerhans.** *Diabetologia* 2000, **43**(11):1389-1396.
104. Donath MY, Størling J, Berchtold LA, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T: **Cytokines and  $\beta$ -Cell Biology: from Concept to Clinical Translation.** *Endocrine Reviews* 2010, **29**(3):334-350.
105. Larsen CM, Wadt KA, Juhl LF, Andersen HU, Karlens AE, Su MS, Seedorf K, Shapiro L, Dinarello CA, Mandrup-Poulsen T: **Interleukin-1beta-induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases.** *J Biol Chem* 1998, **273**(24):15294-15300.
106. Larsen L, Størling J, Darville M, Eizirik DL, Bonny C, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T: **Extracellular signal-regulated kinase is essential for interleukin-1-induced and nuclear factor kappaB-mediated gene expression in insulin-producing INS-1E cells.** *Diabetologia* 2005, **48**(12):2582-2590.
107. Bonny C, Oberson A, Negri S, Sauser C, Schorderet DF: **Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death.** *Diabetes* 2001, **50**(1):77-82.
108. Hartman MG, Lu D, Kim ML, Kociba GJ, Shukri T, Buteau J, Wang X, Frankel WL, Guttridge D, Prentki M *et al*: **Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(13):5721-5732.

109. Karin M, Lin A: **NF-kappaB at the crossroads of life and death.** *Nat Immunol* 2002, **3**(3):221-227.
110. Heimberg H, Heremans Y, Jobin C, Leemans R, Cardozo AK, Darville M, Eizirik DL: **Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis.** *Diabetes* 2001, **50**(10):2219-2224.
111. Giannoukakis N, Rudert WA, Trucco M, Robbins PD: **Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an Ikappa B repressor.** *J Biol Chem* 2000, **275**(47):36509-36513.
112. Storling J, Zaitsev SV, Kapelioukh IL, Karlsen AE, Billestrup N, Berggren PO, Mandrup-Poulsen T: **Calcium has a permissive role in interleukin-1beta-induced c-jun N-terminal kinase activation in insulin-secreting cells.** *Endocrinology* 2005, **146**(7):3026-3036.
113. Leahy JL, Bonner-Weir S, Weir GC: **Beta-cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia. Current ideas on mechanism of impaired glucose-induced insulin secretion.** *Diabetes Care* 1992, **15**(3):442-455.
114. Grunnet LG, Aikin R, Tonnesen MF, Paraskevas S, Blaabjerg L, Storling J, Rosenberg L, Billestrup N, Maysinger D, Mandrup-Poulsen T: **Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells.** *Diabetes* 2009, **58**(8):1807-1815.
115. Ortis F, Naamane N, Flamez D, Ladriere L, Moore F, Cunha DA, Colli ML, Thykjaer T, Thorsen K, Orntoft TF *et al*: **Cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary beta-cells.** *Diabetes*, **59**(2):358-374.
116. Lovis P, Roggli E, Laybutt DR, Gattesco S, Yang JY, Widmann C, Abderrahmani A, Regazzi R: **Alterations in microRNA expression**

- contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes* 2008, **57**(10):2728-2736.
117. Gauthier BR, Wollheim CB: **MicroRNAs: 'ribo-regulators' of glucose homeostasis.** *Nat Med* 2006, **12**(1):36-38.
118. Bartel DP: **MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.** *Cell* 2009, **136**(2):215-233.
119. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.** *Cell* 1993, **75**(5):843-854.
120. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G: **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans.** *Nature* 2000, **403**(6772):901-906.
121. Zhang B, Wang Q, Pan X: **MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants.** *J Cell Physiol* 2007, **210**(2):279-289.
122. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.
123. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S: **Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**(3):228-234.
124. Kim VN: **MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**(5):376-385.
125. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN: **The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing.** *GENES & DEVELOPMENT* 2004, **18**:3016-3027.
126. Cullen BR: **Transcription and processing of human microRNA precursors.** *Mol Cell* 2004, **16**(6):861-865.

127. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S: **Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.** *Nature Cell Biology* 2009, **11**:228-234.
128. Lau PW, MacRae IJ: **The molecular machines that mediate microRNA maturation.** *J Cell Mol Med* 2009, **13**(1):54-60.
129. Siomi H, Siomi MC: **On the road to reading the RNA-interference code.** *Nature* 2009, **457**(7228):396-404.
130. MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA: **In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(2):512-517.
131. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD: **Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.** *Cell* 2003, **115**(2):199-208.
132. He L, Hannon GJ: **MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation.** *Nature Reviews Genetics* 2004, **5**:522-531.
133. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP: **Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing.** *Nature* 2007, **448**:83-86.
134. Zeng Y, Sankala H, Zhang X, Graves PR: **Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies.** *Biochem J* 2008, **413**:429-436.
135. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R: **MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies.** *Nature Cell Biol* 2005, **7**:719-723.
136. Sen GL, Blau HM: **Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies.** *Nature Cell Biol* 2007, **7**:633-636.

137. Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW: **Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells.** *Nat Struct Mol Biol* 2006, **13**(12):1102-1107.
138. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T: **MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(47):16961-16966.
139. Carthew RW, Sontheimer EJ: **Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.** *Cell* 2009, **136**(4):642-655.
140. Zhao Y, Srivastava D: **A developmental view of microRNA function.** *Trends Biochem Sci* 2007, **32**(4):189-197.
141. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB: **Prediction of mammalian microRNA targets.** *Cell* 2003, **115**:787-798.
142. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS: **Human MicroRNA targets.** *PLoS Biol* 2004, **2**(11).
143. Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R: **Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes.** *RNA* 2004, **10**(10):1507-1517.
144. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M *et al*: **Combinatorial microRNA target predictions.** *Nat Genet* 2005, **37**(5):495-500.
145. Huang JC, Babak T, Corson TW, Chua G, Khan S, Gallie BL, Hughes TR, Blencowe BJ, Frey BJ, Morris QD: **Using expression profiling data to identify human microRNA targets.** *Nat Methods* 2007, **4**(12):1045-1049.
146. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE: **Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation.** *Cell* 2005, **122**(4):553-563.

147. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM: **Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs.** *Nature* 2005, **433**(7027):769-773.
148. Wu L, Belasco JG: **Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs.** *Mol Cell* 2008, **29**(1):1-7.
149. Kim VN, Nam JW: **Genomics of microRNA.** *Trends Genet* 2006, **22**(3):165-173.
150. Gu J, He T, Pei Y, Li F, Wang X, Zhang J, Zhang X, Li Y: **Primary transcripts and expressions of mammal intergenic microRNAs detected by mapping ESTs to their flanking sequences.** *Mamm Genome* 2006, **17**(10):1033-1041.
151. Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ: **Genomic analysis of human microRNA transcripts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(45):17719-17724.
152. Chang TC, Mendell JT: **microRNAs in vertebrate physiology and human disease.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007, **8**:215-239.
153. Kolfschoten IG, Roggli E, Nesca V, Regazzi R: **Role and therapeutic potential of microRNAs in diabetes.** *Diabetes Obes Metab* 2009, **11 Suppl 4**:118-129.
154. Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF: **Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(23):8721-8726.
155. Fiore R, Khudayberdiev S, Christensen M, Siegel G, Flavell SW, Kim TK, Greenberg ME, Schratt G: **Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels.** *EMBO J* 2009, **28**(6):697-710.

- 
156. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT: **Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis.** *Nat Genet* 2008, **40**(1):43-50.
157. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A: **SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation.** *Nature* 2008, **454**(7200):56-61.
158. Guil S, Caceres JF: **The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a.** *Nat Struct Mol Biol* 2007, **14**(7):591-596.
159. Melo SA, Ropero S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA, Rossi S, Fernandez AF, Carneiro F, Oliveira C *et al*: **A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function.** *Nat Genet* 2009, **41**(3):365-370.
160. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A: **Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(20):7269-7274.
161. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P *et al*: **A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion.** *Nature* 2004, **432**(7014):226-230.
162. El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E: **miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells.** *Diabetes* 2008, **57**(10):2708-2717.
163. Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, Zavolan M, Stoffel M: **miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(14):5813-5818.

164. Norlin S, Ahlgren U, Edlund H: **Nuclear factor- $\kappa$ B activity in  $\beta$ -cells is required for glucose-stimulated insulin secretion.** *Diabetes* 2005, **54**(1):125-132.
165. Gupta S, Sen S: **Myotrophin- $\kappa$ B DNA interaction in the initiation process of cardiac hypertrophy.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1589**(3):247-260.
166. Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R: **MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells.** *J Biol Chem* 2006, **281**(37):26932-26942.
167. Lovis P, Gattesco S, Regazzi R: **Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs.** *Biol Chem* 2008, **389**(3):305-312.
168. Baroukh N, Ravier MA, Loder MK, Hill EV, Bounacer A, Scharfmann R, Rutter GA, Van Obberghen E: **MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines.** *J Biol Chem* 2007, **282**(27):19575-19588.
169. Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S: **Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic  $\beta$  cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription.** *RNA* 2009, **15**(2):287-293.
170. He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F: **Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes.** *Mol Endocrinol* 2007, **21**(11):2785-2794.
171. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, Koo S, Perera RJ, Jain R *et al*: **MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation.** *J Biol Chem* 2004, **279**(50):52361-52365.

172. Roggli E, Britan A, Gattesco S, Lin-Marq N, Abderrahmani A, Meda P, Regazzi R: **Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells.** *Diabetes* 2010, **59**(4):978-986.
173. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E *et al*: **Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes.** *Circ Res* 2010, **107**(6):810-817.
174. Powers AC, Efrat S, Mojsov S, Spector D, Habener JF, Hanahan D: **Proglucagon processing similar to normal islets in pancreatic alpha-like cell line derived from transgenic mouse tumour.** *Diabetes* 1990, **39**:406-414.
175. Efrat S, Linde S, Kofod H, Spector D, Delannoy M, Grant S, Hanahan D, Baekkeskov S: **Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-oncogene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**:9037-9041.
176. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C: **A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.** *J Immunol Methods* 1991, **139**: 271-279.
177. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method.** *Methods* 2001, **25**: 402-408.
178. Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T: **miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(Database issue):D105-110.
179. Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG: **TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets.** *RNA* 2006, **12**:192-197.

180. Gao J, Ade AS, Tarcea VG, Weymouth TE, Mirel BR, Jagadish HV, States DJ: **Integrating and annotating the interactome using the MiMI plugin for cytoscape.** *Bioinformatics* 2009, **25**:137-138.
181. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T: **Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.** *Genome Res* 2003, **13**: 2498-2504.
182. Eizirik DL, Moore F, Flamez D, Ortis F: **Use of a systems biology approach to understand pancreatic beta-cell death in Type 1 diabetes.** *Biochem Soc Trans* 2008, **36**: 321-327.
183. Taganov KD, Boldin MP, Kuang-Jung Chang, Baltimore D: **NF- $\kappa$ B - dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**(33): 12481–12486.
184. Ortis F, Pirot P, Naamane N, Kreins AY, Rasschaert J, Moore F, Theatre E, Verhaeghe C, Magnusson NE, Chariot A *et al*: **Induction of nuclear factor-kappaB and its downstream genes by TNF-alpha and IL-1beta has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells.** *Diabetologia* 2008, **51**:1213-1225.
185. Eldor R, Yeffet A, Baum K, Doviner V, Amar D, Ben-Neriah Y, Christofori G, Peled A, Carel JC, Boitard C *et al*: **Conditional and specific NFkappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:5072-5077.
186. Hammar EB, Irminger JC, Rickenbach K, Parnaud G, Ribaux P, Bosco D, Rouiller DG, Halban PA: **Activation of NF-kappaB by extracellular matrix is involved in spreading and glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta cells.** *J Biol Chem* 2005, **280**:30630-30637.

187. Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A: **MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation.** *Semin Cancer Biol* 2008, 18:131-140.
188. Karlsten AE, Rønn SG, Lindberg K, Johannesen J, Galsgaard ED, Pociot F, Nielsen JH, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Billestrup N: **Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) protects beta -cells against interleukin-1beta - and interferon-gamma -mediated toxicity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(21):12191-12196.
189. Bruun C, Heding PE, Rønn SG, Frobøse H, Rhodes CJ, Mandrup-Poulsen T, Billestrup N: **Suppressor of cytokine signalling-3 inhibits Tumor necrosis factor-alpha induced apoptosis and signalling in beta cells.** *Mol Cell Endocrinol.* 2009, **311**(1-2):32-38.
190. Sonkoly E, Wei T, Janson PC, Saaf A, Lundeberg L, Tengvall-Linder M, Norstedt G, Alenius H, Homey B, Scheynius A *et al*: **MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of Psoriasis?** *PLoS ONE* 2007, **2**:e610.
191. Haspel RL, Salditt-Georgieff M, Darnell Jr JE: **The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase.** *EMBO J* 1996, **15**:6262±8.
192. Kim TK, Maniatis T: **Regulation of interferon-g-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway.** *Science* 1996, **273**:1717±9.
193. Barre B, Avril S, Coqueret O: **Opposite Regulation of Myc and p21waf1 Transcription by STAT3 Proteins.** *J Biol Chem* 2003, **278**(5): 2990-2996.
194. Garcia-Ocana A, Vasavada RC, Cebrian A, Reddy V, Takane KK, López-Talavera JC, Stewart *et al*: **Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the beta-cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice.** *Diabetes* 2001, **50**:2752-2762.

195. Hoang PT, Park P, Cobb LJ, Paharkova-Vatchkova V, Hakimi M, Cohen P, Lee KW: **The neurosurvival factor Humanin inhibits beta cell apoptosis via Stat3 activation and delays and ameliorates diabetes in NOD mice.** *Metabolism* 2010, **59**(3): 343-349.
196. Jiang Q, Hao Y, Wang G, Juan L, Zhang T, Teng M, Liu Y, Wang Y: **Prioritization of disease microRNAs through a human phenome-microRNAome network.** *BMC Systems Biology* 2010, **4**(Suppl 1):S2.
197. Gurzov EN, Germano CM, Cunha DA, Ortis F, Vanderwinden JM, Marchetti P, Zhang L, Eizirik DL: **p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) activation contributes to pancreatic beta-cell apoptosis induced by proinflammatory cytokines and endoplasmic reticulum stress.** *J Biol Chem* 2010, **285**(26):19910-19920.

## **Ringraziamenti**

Desidero ringraziare il Coordinatore del Dottorato il Professore Michele Purrello, mio *tutor* nel presente lavoro di ricerca, per essersi mostrato sempre presente e disponibile con i suoi suggerimenti e consigli rivelatisi sempre per me preziosi. A lui vanno la mia stima e la mia riconoscenza per le opportunità che mi ha offerto, per la possibilità che mi ha dato di occuparmi di un problema per me di grande interesse, e per avermi costantemente seguito lungo tutto lo svolgersi del lavoro.

La mia gratitudine va anche alla Professoressa Cinzia Di Pietro. Oltre che persona squisita dal punto di vista umano, ha sempre rappresentato un fondamentale referente scientifico tanto per me quanto per il resto del gruppo di ricerca di cui faccio parte.

Essenziale per il concepimento e la fattività di questo progetto è stata la collaborazione con il gruppo di ricerca coordinato dal Professore Francesco Purrello che opera presso il laboratorio di Medicina Molecolare (Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Specialistica, Università di Catania). A tale gruppo si deve infatti la coltivazione delle cellule, il loro trattamento con le citochine e le analisi al *FACS*.

Ringrazio il Dott. Marco Ragusa per i suoi preziosi consigli e per l'entusiasmo contagioso con cui affronta la ricerca.

Un ringraziamento particolare va al Dott. Davide Barbagallo per essere stato parte integrante e fondamentale nello svolgimento di questo progetto.

Un grazie anche alla Dott.ssa Loredana Salito per avermi accompagnata in fasi significative del presente lavoro.

Ringrazio tutti i componenti del meraviglioso gruppo di ricerca con cui ho avuto l'onore ed il piacere di condividere questo periodo ed in particolar modo le Dottoresse Maria Rosa Guglielmino e Alessandra Majorana che hanno condiviso con me i quattro anni del Corso di Dottorato.