

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Biomedicina Clinica e Molecolare

Dottorato di Ricerca in Scienze Endocrinologiche:
Basi molecolari dell'azione ormonale; XXIV° Ciclo
Coordinatore: Prof.ssa Lucia Frittitta

Dott.ssa Lorianza Grazia Vanessa Mascali

**Caratterizzazione della funzione e del
comportamento dell'alfa cellula
pancreatica: analisi dei meccanismi
fisiopatologici implicati nell'insorgenza del
diabete**

TESI DI DOTTORATO

Relatore:

Chiar.mo Prof. Francesco Purrello

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

Indice

Introduzione	3
Il Diabete	3
– Definizione di Diabete Mellito	3
– Cenni storici	3
– Fisiopatologia	5
– Classificazione del diabete di Mellito	8
• Diabete Tipo 1 (T1DM o IDD)	11
• Diabete Tipo 2 (T2DM o NIDDM3)	13
• Altri tipi specifici di diabete	14
• Diabete gestazionale (GDM)	17
• Criteri diagnostici	18
Il Pancreas	19
– Isola pancreatica	20
– Beta Cellula pancreatica	22
– Alfa cellula pancreatica e Glucagone	24
Strumenti Farmacologici	21
– Incretine: analoghi del GLP-1 e inibitori delle DPP4	32
Progetti scientifici	38
– Effetto del palmitato sul segnale intracellulare in una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche	41
– Ruolo delle citochine pro-infiammatorie nel Diabete mellito e loro effetto su popolazioni di Alfa cellule pancreatiche	60

–	Silenziamento di IR: analisi comparativa del ruolo dell'insulin-like growth factor 1 receptor nel segnale insulinico intracellulare	78
–	Possibili terapie per il Diabete Mellito: GLP1 e alfa cellula pancreatica	90
	Conclusioni	109
	Bibliografia	112

Introduzione

Il Diabete

– Definizione di Diabete Mellito

Il diabete mellito è un disordine metabolico, ad eziologia multipla, caratterizzato da iperglicemia cronica con alterazioni del metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine, conseguente ad un difetto di secrezione o di attività dell'insulina o ad entrambi.

Il termine diabete deriva dal greco “ $\delta \iota \alpha \beta \alpha \iota \nu \epsilon \iota \nu$ ” che dal greco antico si traduce in passare attraverso; esso indica il passaggio di materiale energetico attraverso le urine. Solo successivamente venne aggiunto il termine “mellitus” che in latino ha il significato di miele, determinato dall'eccessiva produzione di urine di sapore dolce, per la presenza di zucchero.

– Cenni storici

Ripercorrere le tappe che hanno portato all'identificazione della malattia diabetica significa ritornare ai tempi degli antichi Egizi, i quali già nel 500 a.C. per primi descrivevano questa malattia. Da ritrovati archeologici di origine egiziana infatti si evince come fosse già presente a quei tempi una condizione morbosa caratterizzata da una sete estrema e dalla produzione di una grande quantità di urine. Fu in seguito Ippocrate, il primo medico, a dare una descrizione precisa (per quei tempi) della malattia e ad individuare un metodo di diagnosi empirico, che consisteva nel saggiare al gusto l'urina proprio perché questa si presentava particolarmente dolce in caso di malattia.

Solo alla fine del secolo scorso, nel 1889 Mehring e Minkowski identificarono la relazione tra malattia diabetica e pancreas[1]; mentre nel 1892, Paul Langherans, ancora studente di Medicina, individuò dei gruppi cellulari, sparsi all'interno del pancreas, che da lui presero il nome di "Isole del Langherans".

L'ultimo decennio del '900 è stato protagonista di una delle più importanti scoperte nel campo della medicina; ad opera di Banting e Best [2] fu identificato l'ormone prodotto da particolari cellule pancreatiche, che chiamarono Insulina proprio perchè prodotta dalle isole di Langherans; essi inoltre misero a punto una metodica atta ad estrarre tale ormone dal pancreas degli animali da macello. Tale scoperta nel 1923 conferì loro il Premio Nobel per la Medicina.

L'insulina, così come le beta cellule pancreatiche, divennero velocemente i principali oggetti di studio per la ricerca in campo diabetico.

In realtà l'anno 1921 portava con sé un'altra enorme scoperta. Banting e Best, in quella stessa data, scoprirono anche gli effetti del più importante ormone iperglicemizzante: il glucagone [3]. Il glucagone tuttavia, per la facile degradabilità e per la difficoltà nel dosaggio è rimasto a lungo poco studiato[3].

Nel 1975 Unger ed Orci con un lavoro importante e con un'ipotesi pionieristica suggerirono "l'ipotesi biormonale" per poter spiegare le cause che portano all'insorgenza di iperglicemia nel diabete mellito di tipo 2; in questa ipotesi tralasciata per anni, si evidenziava il ruolo chiave del glucagone e dell'alfa cellula pancreatica per l'omeostasi glicemica nell'organismo e per la regolazione dell'accumulo e del rilascio di glucosio da parte del fegato. Per la prima volta veniva proposto un modello in cui non solo l'ipoinsulinemia e iperglicemia erano considerati elementi essenziali nella patogenesi del diabete mellito di tipo 2, ma anche l'iper glucagonemia assumeva un ruolo chiave. Dal 1975

questa ipotesi non ha trovato riscontro pratico nello studio del diabete. Negli ultimi anni, dopo l'avvento delle incretine nella pratica clinica per la cura del diabete questa ipotesi è stata riscoperta e valorizzata. Il lavoro di Unger e Orci del 1975 risulta in questo periodo uno dei lavori più citati nella letteratura recente.

Questa ipotesi ha suscitato il naturale interesse della ricerca oltre che un maggiore investimento di energie e capitali nella formulazione di nuovi farmaci, potenziali antagonisti dell'azione del glucagone. La descrizione di questo aspetto e soprattutto la descrizione delle incretine verrà discussa nelle parti successive di questa tesi.

– Fisiopatologia

Il diabete mellito (DM) è una sindrome clinica rappresentata dall'insieme di malattie metaboliche ad eziologia complessa il cui aspetto fenotipico più evidente è l'iperglicemia, frutto di difetti nella secrezione insulinica o nell'azione di questo ormone. Spesso, in uno stesso paziente, entrambi gli aspetti sono presenti e non si comprende bene quale dei due sia la causa primaria dello sviluppo della malattia o la conseguenza. [4-6].

Nel tempo, nei pazienti con diabete, l'iperglicemia cronica si associa allo sviluppo di danni a carico di vari organi ed apparati; questi danni rappresentano le complicanze croniche del diabete (fig. 1).

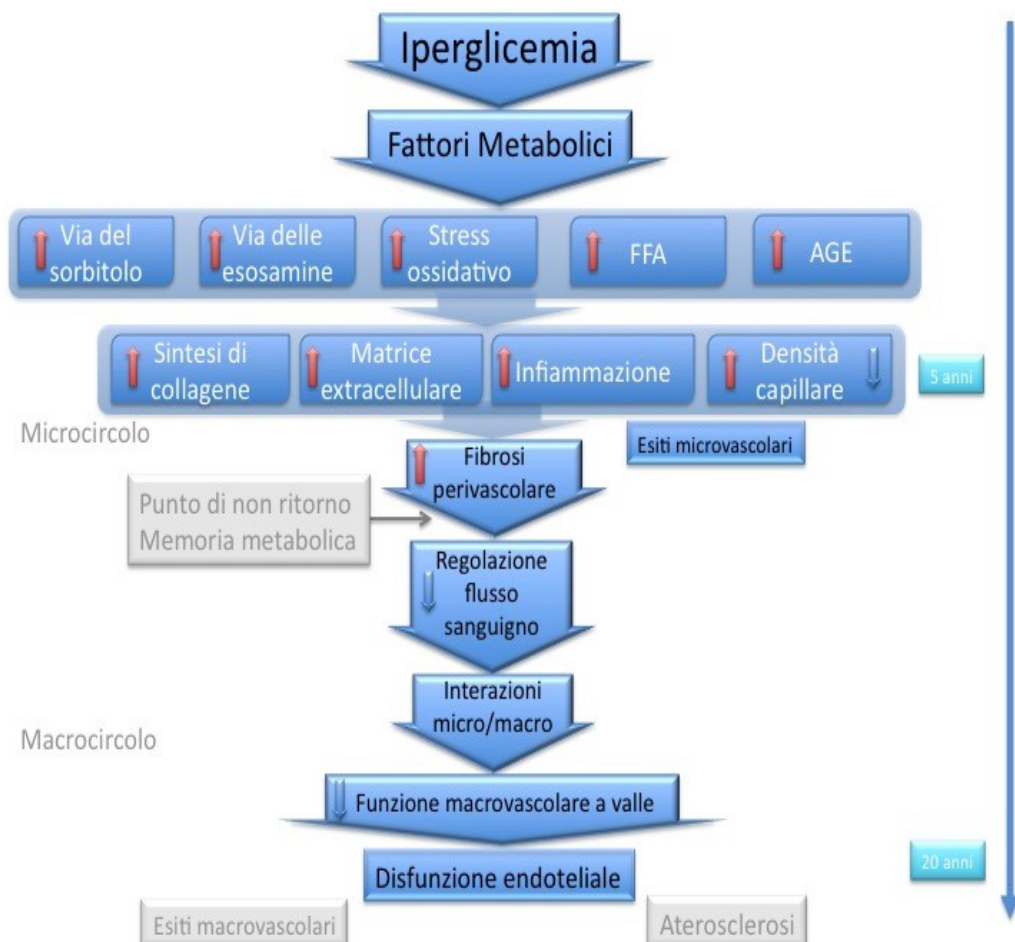


Fig.1 Cause e effetti dell'iperglicemia nel tempo: L'iperglicemia attiva numerose vie metaboliche rilevanti dal punto di vista patogenetico.

Diversi processi patogenetici sono coinvolti nel naturale sviluppo del diabete; tra questi i principali sono rappresentati dalla distruzione delle cellule beta pancreatiche in seguito all'instaurarsi di fenomeni di stress metabolico, di apoptosi o in alcuni casi di autoimmunità (tipica condizione del diabete mellito di tipo 1). La progressiva perdita di funzione e/o di massa beta cellulare determina la conseguente perdita progressiva nella produzione di insulina e di conseguenza il verificarsi di dismetabolismi, derivanti da una diminuita risposta dei tessuti "bersaglio" a questo importantissimo ormone peptidico.

La presenza di un marcato innalzamento del livello di glucosio nel sangue può rendersi manifesto clinicamente attraverso diversi sintomi: poliuria, polidipsia, perdita di peso, a volte associato a polifagia ed annebbiamento della vista; in genere l'insorgenza di altri

sintomi quali ad esempio il blocco della crescita, o la presenza di una più marcata suscettibilità alle infezioni, possono essere associati ad una condizione di iperglicemia cronica. Il mancato controllo dei livelli glicemici, più in generale, può causare danni gravissimi per il paziente diabetico; a lungo andare la compromissione degli organi colpiti può diventare irreversibile; alcune delle principali complicanze comprendono la retinopatia, con potenziale perdita della vista, la nefropatia che può condurre fino all'insufficienza renale, la neuropatia con danno del sistema nervoso periferico e del sistema nervoso autonomo in grado di causare sintomi a livello dell'apparato gastrointestinale, dell'apparato urogenitale e dell'apparato cardiovascolare e del piede diabetico. Inoltre è stato riscontrato come in pazienti diabetici sia presente un'elevata incidenza di aterosclerosi generalizzata delle arterie, con conseguente aumento dell'incidenza di malattie cardiovascolari e cerebrovascolari [7, 8].

Il controllo della glicemia nell'uomo quindi rappresenta un importante fattore di rischio. Identificare i soggetti a rischio di diabete in maniera più precocemente possibile rappresenta quindi un obiettivo delle società scientifiche mondiali. Sono quindi stati descritte condizioni di pre-diabete che possono facilitare l'identificazione precoce di soggetti a rischio di sviluppare diabete.

Nel paziente non ancora diagnosticato un aumento del glucosio nel sangue a digiuno (impaired fasting glucose, IFG) e/o una ridotta tolleranza al glucosio (impaired glucose tolerance, IGT), possono essere considerati fattori di rischio di malattia cardiovascolare (Fig. 2). Risulta quindi necessario diagnosticare repentinamente l'insorgenza della malattia, al fine di prevenire le conseguenze sfavorevoli, dovute ad un errato mantenimento dei livelli di glucosio nel sangue.

Types \ Stages	Normoglycemia	Hyperglycemia		
	Normal glucose regulation	Impaired Glucose Tolerance or Impaired Fasting Glucose (Pre-Diabetes)	Not insulin requiring	Insulin requiring for control Insulin requiring for survival
Type 1*	←	→	→	→
Type 2	←	→	→	→
Other Specific Types**	←	→	→	→
Gestational Diabetes **	←	→	→	→

* anche dopo il manifestarsi di chetoacidosi, questi pazienti possono velocemente ritornare a normoglicemia, senza richiedere continue terapie;

** in casi rari, pazienti in queste condizioni possono avere bisogno di insulina per la propria sopravvivenza;

Fig 2. Disordini della glicemia: eziologia e stadi.[4]

– Classificazione del diabete mellito

Il primo tentativo di classificazione del diabete inizia nel 1980, anno in cui l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) accettò la classificazione proposta dal NDDG (National Diabetes Data Group), anche se con alcune modifiche; questa prevedeva la suddivisione in 5 classi; tra le quali si distinguevano sostanzialmente due tipi di diabete, l'insulino-dipendente o IDDM o tipo 1, detto anche diabete infanto-giovanile ed il diabete non insulino dipendente o tipo 2 dell'età adulta. Ovviamente questa classificazione non era in grado di rispondere a tutti i quesiti che un medico si pone davanti ad un paziente con diabete. Inoltre teneva in considerazione prevalentemente di alcuni fattori legati al paziente e non considerava invece l'aspetto patogenetico della malattia.

Negli ultimi anni l'avanzamento nella comprensione delle diverse cause della fisiopatologia dello sviluppo del diabete ha permesso di arrivare a criteri diagnostici e classificativi più moderni, ma ancora che risentono di limiti dovuti all'eterogeneità della patologia. l'ADA

(American Diabetes Association) ha elaborato nuovi criteri al fine di proporre una nuova classificazione fondata su parametri eziopatogenetici, piuttosto che sul tipo di trattamento terapeutico.

Le ultime linee guida pubblicate dall'ADA per la diagnosi e classificazione del diabete mellito, vengono pubblicati ogni anno nella rivista ufficiale dell'ADA (Diabetes Care, al sito www.diabetes.org/diabetescare). Tali criteri classificativi sono riportati schematicamente nella tabella 1:

Tabella 1: Eziologia e classificazione del Diabete mellito[4]

-
- I. Type 1 diabetes (β -cell destruction, usually leading to absolute insulin deficiency)
 - A. Immune mediated
 - B. Idiopathic
 - II. Type 2 diabetes (may range from predominantly insulin resistance with relative insulin deficiency to a predominantly secretory defect with insulin resistance)
 - III. Other specific types
 - A. Genetic defects of β -cell function
 - 1. Chromosome 12, HNF-1 α (MODY3)
 - 2. Chromosome 7, glucokinase (MODY2)
 - 3. Chromosome 20, HNF-4 α (MODY1)
 - 4. Chromosome 13, insulin promoter factor-1 (IPF-1; MODY4)
 - 5. Chromosome 17, HNF-1 β (MODY5)
 - 6. Chromosome 2, *NeuroD1* (MODY6)
 - 7. Mitochondrial DNA
 - 8. Others
 - B. Genetic defects in insulin action
 - 1. Type A insulin resistance
 - 2. Leprechaunism
 - 3. Rabson-Mendenhall syndrome
 - 4. Lipotrophic diabetes
 - 5. Others
 - C. Diseases of the exocrine pancreas
 - 1. Pancreatitis
 - 2. Trauma/pancreatectomy
 - 3. Neoplasia
 - 4. Cystic fibrosis
 - 5. Hemochromatosis
 - 6. Fibrocalculous pancreatopathy
 - 7. Others
 - D. Endocrinopathies
 - 1. Acromegaly
 - 2. Cushing's syndrome
 - 3. Glucagonoma
 - 4. Pheochromocytoma
 - 5. Hyperthyroidism
 - 6. Somatostatinoma
 - 7. Aldosteronoma
 - 8. Others
 - E. Drug or chemical induced
 - 1. Vacor
 - 2. Pentamidine
 - 3. Nicotinic acid
 - 4. Glucocorticoids
 - 5. Thyroid hormone
 - 6. Diazoxide
 - 7. β -adrenergic agonists
 - 8. Thiazides
 - 9. Dilantin
 - 10. γ -Interferon
 - 11. Others
 - F. Infections
 - 1. Congenital rubella
 - 2. Cytomegalovirus
 - 3. Others
 - G. Uncommon forms of immune-mediated diabetes
 - 1. "Stiff-man" syndrome
 - 2. Anti-insulin receptor antibodies
 - 3. Others
 - H. Other genetic syndromes sometimes associated with diabetes
 - 1. Down syndrome
 - 2. Klinefelter syndrome
 - 3. Turner syndrome
 - 4. Wolfram syndrome
 - 5. Friedreich ataxia
 - 6. Huntington chorea
 - 7. Laurence-Moon-Biedl syndrome
 - 8. Myotonic dystrophy
 - 9. Porphyria
 - 10. Prader-Willi syndrome
 - 11. Others
 - IV. Gestational diabetes mellitus
-

- Diabete Tipo 1 (T1DM o IDDM)

Il Diabete Tipo 1 è comunamente caratterizzato dalla graduale distruzione per autoimmunità delle cellule β del pancreas che producono insulina [9, 10]. La maggior parte di tutti i casi di T1DM sono diagnosticati in individui di età inferiore a 18 anni. L'insieme di fattori genetici e di non ancora ben definiti fattori ambientali contribuiscono complessivamente a far precipitare verso una condizione patologica. Attualmente sono note due sottocategorie di T1DM, Tipo A, o diabete immuno-mediato, e Tipo B o diabete ideopatico.

Il T1DM Tipo A è il risultato di una distruzione specifica autoimmune delle cellule beta pancreatiche in soggetti geneticamente predisposti [10, 11]. In precedenza veniva descritto come una malattia tipicamente ad esordio infantile od al massimo adolescenziale, a comparsa improvvisa e ad andamento severo (la maggior parte degli individui affetti ha età <20 anni alla diagnosi e presenta spesso alla diagnosi chetoacidosi); dati più recenti suggeriscono invece che solamente il 50-60% di pazienti con T1DM sono al di sotto dei 16-18 anni e che la malattia può insorgere anche negli adulti, seppure con un'incidenza minore.

Dati forniti dall'organo DIAMOND (DIABetes MONDiale) dell'Organizzazione Mondiale della Sanità indicano che l'incidenza del T1DM varia ampiamente da paese a paese nonché all'interno di uno stesso paese [12].

Le cause di tali differenze non sono ancora chiare ma potrebbero essere coinvolti diversi elementi, quali fattori ambientali, dieta, stili di vita e fattori genetici [13, 14].

In particolare i soggetti che non hanno predisposizione genetica al diabete, dopo l'esposizione ad attivatori ambientali, possono avere una transitoria autoimmunità anti-isole, che si risolve senza alterazioni della funzione della cellula beta pancreatiche. 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.

L'origine autoimmune del T1DM è confermata dalla suscettibilità che i pazienti affetti hanno verso altre condizioni di autoimmunità (esempio: tiroidite di Hashimoto, malattia di Graves, malattia di Addison, celiachia, myastenia gravis e Vitiligine). Inoltre, come le altre malattie autoimmuni organo-specifiche, il T1DM vede una stretta associazione genetica con l'Antigene Leucocitario Umano (HLA), facente parte del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC).

L'importanza della componente genetica nel rischio di sviluppare il T1DM è dimostrata da studi di *clustering* all'interno di famiglie. 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 [15]. Bisogna tenere in considerazione il fatto che il rischio aumenta all'1% nel caso di figli nati da madri diabetiche e del 3% se invece è il padre ad essere diabetico [16]. Sebbene questi dati siano a favore di un importante contributo della genetica per l'insorgere della malattia, è anche vero che non tutti gli individui geneticamente a rischio svilupperanno la malattia nel corso della vita.

Nonostante le recenti conoscenze abbiano contribuito a chiarire la comprensione dei meccanismi patogenetici del T1DM, non esiste a tutt'oggi una teoria unitaria che metta in evidenza le reali cause di innesco del meccanismo patogenetico autoimmune.

Il T1DM Tipo B, meno frequente del primo, ad eziologia non nota ed è essenzialmente diffuso in alcune popolazioni africane ed asiatiche.

In alcuni pazienti nei quali è stato diagnosticato questo tipo di diabete si manifestano gradi variabili di insulinopenia, seguita da sporadici episodi di chetoacidosi, ma non hanno evidenze di autoimmunità [16]. Si tratta di un tipo di diabete fortemente associato a fattori ereditari, nel quale non è stata riscontrata alcuna evidenza immunologica di autoimmunità delle beta cellule ed inoltre non risulta essere HLA associato. In questo tipo di pazienti la terapia insulinica sostitutiva non sempre rappresenta un requisito assoluto.

- Diabete Tipo 2 (T2DM o NIDDM3)[9]

Il T2DM, precedentemente identificato come diabete non insulino dipendente o diabete dell'adulto, è un tipo di diabete ad esordio generalmente più tardivo rispetto al tipo 1, esso è caratterizzato da insulino resistenza e da alterazione della funzione dell'isola pancreatica. Questa forma di diabete rappresenta la maggior parte degli individui diabetici, essa infatti è presente nel 90-95% della popolazione diabetica generale [17]. Il T2DM ha un'eziologia multifattoriale, in quanto è causata sia da fattori genetici che ambientali. Probabilmente intervengono difetti a carico di più geni (malattia poligenica) coinvolti nella produzione di insulina e nel metabolismo del glucosio [18]. Esistono dunque differenti possibili cause che portano all'insorgenza di questo tipo di diabete, tra i fattori ambientali hanno un'importanza prioritaria l'obesità e l'inattività fisica. Anche l'età favorisce la comparsa del diabete, poiché essa si accompagna ad una riduzione fisiologica della sensibilità dei tessuti periferici all'insulina. Questi fattori causali (eziologici) provocano la malattia attraverso il concorso di due meccanismi principali (patogenesi): l'alterazione della secrezione di insulina e la ridotta sensibilità dei tessuti bersaglio (muscolo, fegato e tessuto adiposo) alla sua azione (insulino-resistenza); pertanto non è causato da una diminuzione assoluta dell'insulina, ma piuttosto da una ridotta azione dell'ormone a livello dei tessuti "bersaglio".

Questi due aspetti (insulino-resistenza e deficit più o meno marcato di insulina circolante) non permettono di mantenere un normale equilibrio glicemico nell'organismo [19]. Peraltro, anche il glucagone, prodotto dalle cellule alfa delle isole pancreatiche, sembra svolgere un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione di questa forma di diabete.

In questo tipo di diabete, poiché l'insorgenza di iperglicemia si verifica gradualmente e negli stadi iniziali spesso non assume valori particolarmente gravi, spesso rimane per molti anni non diagnosticata. Questi pazienti pertanto sviluppano un maggior rischio di incorrere in complicazioni micro- e macro-vascolari. Inoltre a causa del tardivo riconoscimento della situazione patologica, generalmente al momento della diagnosi la funzionalità delle β cellule è già ridotta del 50% e negli anni successivi, continua progressivamente a ridursi, indipendentemente dal regime terapeutico instaurato.

- Altri tipi specifici di diabete[4]

Difetti genetici delle cellule Beta pancreatiche: alcune forme di diabete sono associate a difetti monogenetici a livello delle cellule beta pancreatiche. Questa forma di diabete denominata MODY (Maturity-onset diabetes of the young) è spesso caratterizzata dalla comparsa di iperglicemia in giovane età (in genere prima dei 25 anni). Si tratta di una forma di diabete non autoimmune a trasmissione autosomica dominante con elevata penetranza. Generalmente causata da una mutazione puntiforme o da una delezione a carico di un gene (diabete monogenico) implicato nello sviluppo o nella funzionalità della beta cellula pancreatica, con conseguente alterazione della secrezione insulinica. In particolare sono state identificate anomalie a livello di sei differenti loci genetici su cromosomi diversi, tali mutazioni danno origine a differenti effetti, tra questi è possibile osservare alterazione

della funzionalità epatica, difetti della secrezione insulinica, aumento dei livelli plasmatici di glucosio (tabella 2).

Tabella 2: Classificazione dei diversi tipi di Mody:

MODY 1	mutazione del fattore nucleare epatocitico alfa 4
MODY 2	mutazione del gene che codifica per la glucochinasi
MODY 3	mutazione del fattore nucleare epatocitico alfa 1
MODY 4	mutazione del fattore 1 promotore insulinico
MODY 5	mutazione del fattore nucleare epatocitico beta
MODY 6	mutazione del fattore di trascrizione nucleare neuro D1 o beta 2

Difetti genetici dell'azione dell'insulina: in alcuni casi l'insorgenza del diabete può avvenire a causa di alterazione dell'azione insulinica, causate da anomalie genetiche. L'alterazione del gene codificante per il recettore insulinico, ad esempio, può causare diverse disfunzioni che possono variare dall'iperinsulinemia, ad una modesta iperglicemia a gravi forme di diabete.

Diabete secondario a malattie del pancreas esocrino: tra le varie possibili cause dell'insorgenza di diabete vanno sicuramente annoverati quei processi che causano danno a livello del pancreas esocrino. Alcuni dei principali induttori di tale danno sono rappresentati da pancreatiti, traumi, infezioni, pancreatectomia nonché carcinoma pancreatico. Qualsiasi tipo di processo che sia in grado di causare danno, sebbene in modo diffuso, a livello del pancreas può rappresentare una possibile origine di diabete.

Endocrinopatie: diversi ormoni, tra i quali l'ormone della crescita, il cortisolo, il glucagone, l'epinefrina, hanno la capacità di agire da antagonisti dell'azione insulinica, alterando la

secrezione di insulina e/o modificando la sensibilità dei tessuti all'ormone. Quantità in eccesso di tali ormoni possono rappresentare una delle cause dell'insorgenza di diabete; tale fenomeno si verifica ad esempio in condizioni di acromegalia, sindrome di Cushing, glucagonoma e feocromocitoma. È stato osservato come spesso questa condizione si possa verificare in individui con preesistenti difetti della secrezione insulinica e iperglicemia; generalmente tale processo viene riportato alla normalità quando l'eccesso di ormoni ritorna alle condizioni fisiologiche.

Diabete indotto da farmaci: Molti farmaci possono alterare la secrezione di insulina. Questi farmaci per se non sono in grado di causare il diabete, ma possono partecipare alla sua comparsa in individui con insulino-resistenza. In tali casi risulta difficile classificare il paziente, poichè a seconda della sostanza che induce la malattia, gli effetti possono essere differenti.

Infezioni: Alcuni virus sono stati associati con la distruzione delle cellule beta. È stato osservata una maggiore incidenza di diabete in pazienti con rosolia congenita, sebbene la maggior parte di questi pazienti presentano marcatori HLA e immunitari caratteristici del diabete di tipo 1. Tra gli altri virus associati al diabete troviamo anche coxsackie virus B, citomegalovirus, adenovirus, e il virus della parotite.

Forme non comuni di diabete immuno-mediato: vengono classificate come forme non comuni di diabete due particolari condizioni, la sindrome dell'uomo rigido (nota come "stiff-man" syndrome), disordine autoimmune che riguarda il sistema nervoso centrale; e la presenza di anticorpi anti recettore insulinico, in grado di impedire l'azione da parte dell'insulina sui siti bersaglio.

Altre sindromi genetiche a volte associate al diabete: Molte sindromi genetiche sono accompagnate da un aumento dell'incidenza del diabete. Queste includono le anomalie

cromosomiche che sono tipiche di sindromi quali la sindrome di Down, la sindrome di Klinefelter e la sindrome di Turner.

- Diabete gestazionale (GDM) [20]

Per molti anni, il GDM è stato definito come "qualsiasi grado di intolleranza al glucosio con insorgenza o primo riconoscimento durante la gravidanza". Sebbene la maggior parte dei casi si risolve in seguito al parto, spesso è possibile che tale condizione persista anche dopo la gravidanza; inoltre non è esclusa la possibilità che l'intolleranza al glucosio possa essere precedente alla gravidanza. Questa definizione dunque se da un lato rappresenta una strategia uniforme per il rilevamento e la classificazione del GDM, d'altra parte presenta i suoi limiti. Questo poiché l'aumento dei casi di obesità negli ultimi anni ha portato ad una maggiore insorgenza di diabete di tipo 2 in donne in età fertile. Nel 2008-2009, l'Associazione Internazionale sul diabete e Gruppi di Studio sulla Gravidanza (IADPSG), in collaborazione con i maggiori rappresentanti provenienti da più organizzazioni, tra cui la American Diabetes Association (ADA), ha divulgato le nuove linee guida per la diagnosi di GDM; identificando come "evidente diabete non gestazionale" quelle donne ad alto rischio, nelle quali è possibile identificare, utilizzando criteri standard (Tabella 3), la presenza di diabete già alla visita prenatale.

Circa il 7% di tutte le gravidanze (dall'1 al 14%, a seconda della popolazione studiata e dei test diagnostici utilizzati) sono complicate da GDM, provocando più di 200.000 casi all'anno.

- Criteri diagnostici[4]

Per decenni, l'unico principio per la diagnosi di diabete si è basato sulla considerazione dei livelli plasmatici di glucosio, considerando tanto la misurazione della glicemia a digiuno (FPG fasting plasma glucose) tanto i risultati ottenuti in seguito ad OGTT (Oral Glucose Tolerance Test). Nel 1997, il primo Comitato di esperti per la diagnosi e la Classificazione del Diabete Mellito ha revisionato tali criteri, indicando come necessaria l'associazione di altri fattori diagnostici, oltre ad i livelli di glicemia a digiuno, quali la presenza di retinopatie come fattore chiave per l'identificazione dei livelli soglia di glucosio. Il Comitato ha esaminato i dati di tre studi epidemiologici (UKPDS, DCCT e Kumamoto). Questi studi hanno dimostrato la presenza di un livello glicemico al di sotto del quale non è presente o vi è poca insorgenza di retinopatie, ed al di sopra del quale la prevalenza di retinopatie aumenta in modo apparentemente lineare. Tali valori sembrano essere simili tra le differenti popolazioni. Queste analisi ha contribuito ad individuare un nuovo punto focale per la diagnostica.

Non bisogna dimenticare l'importanza rivestita dai valori di emoglobina glicata (HbA1c), che resta il principale target terapeutico utilizzato nelle linee guida. Un target di HbA1c $\leq 6,4\%$ può essere considerato in alcuni pazienti con diabete di tipo 2 al fine di ridurre ulteriormente il rischio di nefropatie. Per mantenere un livello di HbA1c $\leq 7\%$, le ultime linee guida suggeriscono che si dovrebbe cercare di raggiungere livelli glicemici a digiuno o preprandiali compresi tra 72 e 126 mg/dL, ed un livello postprandiale (2h dopo il pasto) di 90-180 mg/dL, sia in pazienti diabetici di tipo 1 che tipo 2.

In passato tale parametro non veniva raccomandato per la diagnosi di diabete, in parte a causa della mancanza di standardizzazione del dosaggio. Tuttavia, ad oggi tali test risultano ampiamente standardizzati in modo tale che i risultati ottenuti possono essere

uniformemente applicati sia temporalmente sia tra popolazioni. La tabella 3 mostra i principali criteri per la diagnosi di diabete.

Tabella 3: Criteri di diagnosi di diabete[4]

HbA1C $\geq 6,5\%$. Il test deve essere eseguito in laboratori che si avvalgono di metodi certificati dal NGSP e standardizzati DCCT *
0
FPG ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l). Per digiuno si intende la mancata assunzione di calorie per le ultime 8h.
0
2-h PG ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) durante l'OGTT. Il test deve essere eseguito come descritto dal WHO, usando una soluzione di glucosio contenente l'equivalente di 75 g di glucosio anidro disciolto in acqua.
0
Random plasma Glucose ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) In pazienti con classici sintomi di iperglicemia o in crisi iperglicemica.
NPGS, National Glucohemoglobin Standardization Program; DCCT, Diabetes Control and Complication Trial; WHO, World Health Organization;

Il Pancreas

Il pancreas è una voluminosa ghiandola extraparietale annessa all'apparato digerente (Fig 3).

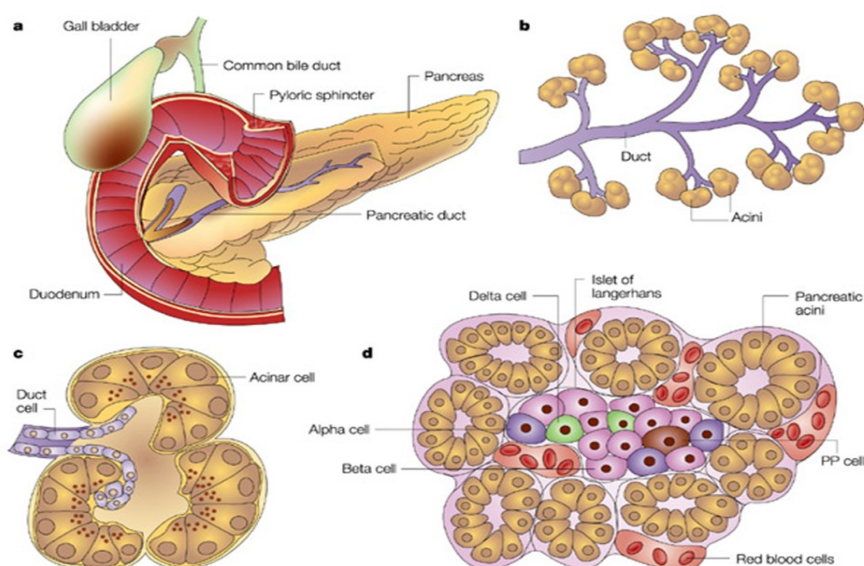


Fig 3. Pancreas: a) immagine in toto della ghiandola, b, c) porzione esocrina composta da ghiandole tubulo acinose composte a secrezione sierosa, d) porzione endocrina, isola di Langherans circondata da acini esocrini.[21]

Dal punto di vista istologico viene considerata una ghiandola mista, in quanto formata da una porzione esocrina, costituito da gruppi di cellule acinose, che a loro volta formano lobuli, il cui prodotto di secrezione, che prende il nome di succo pancreatico, è riversato all'interno di un sistema di condotti che poi si svuotano a livello dell'intestino tenue; e da una porzione endocrina costituita da circa 1 milione di isole di Langerhans, ammassi cellulari (diametro: 100 micrometri) di forma tondeggiante, che appaiono come aggregati cellulari in mezzo al parenchima esocrino. Le isole non possiedono vasi linfatici ma sono percorse da un fitto plesso di capillari fenestrati in cui riversano i loro ormoni, inoltre possiedono una ricca innervazione e quasi tutte le cellule risultano a contatto con almeno un capillare ed in molti casi con terminazioni nervose.

– Isola pancreatica

Ogni isola rappresenta un organo endocrino indipendente, capace di riversare il prodotto della secrezione (ormone) direttamente nel circolo generale (Fig 4); esse sono composte di cinque tipi di cellule endocrine, ognuna delle quali secerne ormoni che contribuiscono alla regolazione generale del metabolismo del glucosio.

Le α -cellule secernenti glucagone rappresentano circa il 20% delle cellule delle isole pancreatiche; circa il 70-80% della popolazione dell'isola è rappresentata dalle cellule beta produttrici di insulina e meno dell'1% è rappresentato da cellule delta e PP, produttrici di somatostatina e polipeptide pancreatico. La tipica architettura dell'isola del roditore prevede una disposizione in cui le β -cellule, che secernono insulina, sono presenti al centro dell'isola (core) mentre le α -cellule, le δ -cellule, le PP-cellule e le ϵ -cellule che secernono grelina sono sparse lungo il perimetro dell'isola.

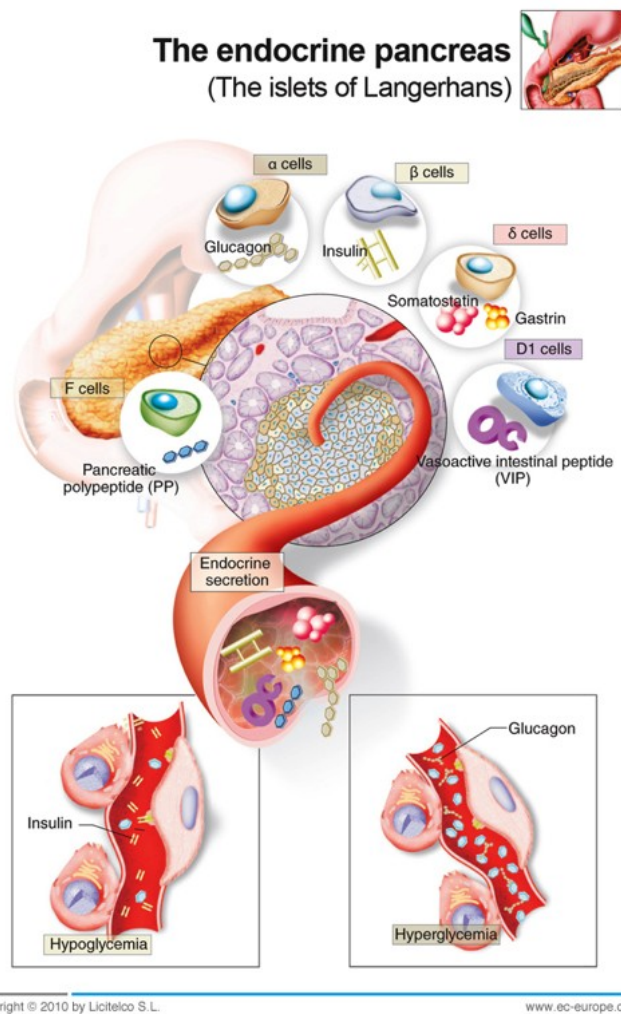


Fig 4. Immagini rappresentativa isola pancreatica e secrezione; (immagine da: www.ec-europe.com)

Nell'uomo invece la distribuzione delle diverse famiglie cellulari sembra seguire organizzazioni diverse che ne condizionano anche la funzione. [22]. È interessante notare come le isole umane sembrano costituite da diverse "rosette", ognuna delle quali presenta un'architettura simile a quella osservata nei roditori [23].

E'probabile che la distribuzione e la disposizione i diversi tipi cellulari sia importante per la normale microcircolazione dell'isola. Così nell'isola dei roditori, e probabilmente anche all'interno di ogni "rosetta", il sangue scorre dalle β -cellule, al centro, verso le non- β , (dal

centro alla periferia) [24, 25], suggerendo che l'insulina influenzi il rilascio di ormoni da parte degli altri tipi cellulari dell'isola.

Per anni solo le β cellule sono state al centro dell'attenzione per la comprensione della fisiopatologia del diabete. Tuttavia, all'interno dell'isola, come precedentemente detto, oltre alle β cellule che costituiscono la quota più rappresentata (circa il 60-70% nell'uomo) e producono insulina, sono presenti anche le α cellule (circa il 25% della quota totale) che producono glucagone.

Nella normale fisiologia insulina e glucagone lavorano in maniera sinergica per mantenere "costanti" i livelli di glucosio nel circolo sanguigno.

– Beta cellula pancreatica

Le cellule β rappresentano fino all'80% delle cellule insulari. Esse producono e secernono insulina in maniera controllata, in modo da mantenere le concentrazioni circolanti di glucosio nel loro intervallo fisiologico (Fig. 5).

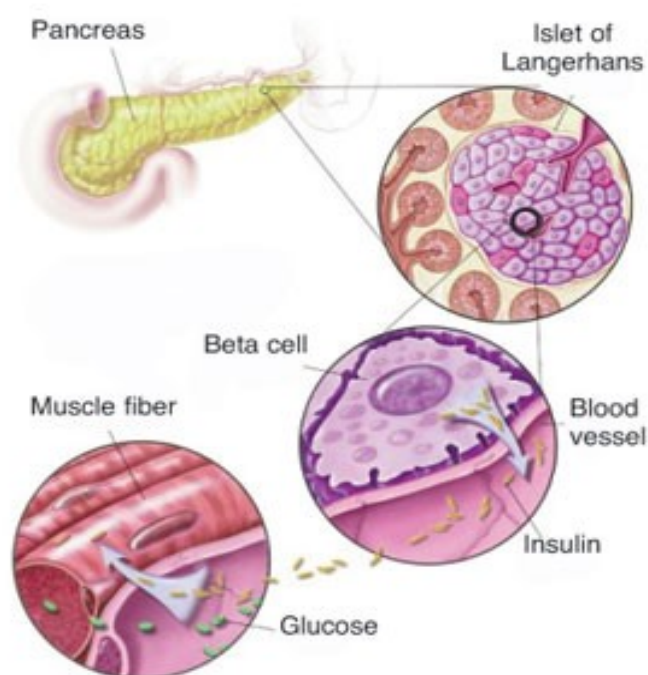


Figura 5. Figura rappresentativa beta cellula e secrezione.

La normale funzione β -cellulare dipende essenzialmente dall'integrità dei meccanismi che regolano la sintesi ed il rilascio dell'insulina, nonché dalla massa complessiva delle cellule β . 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. Classicamente, si ritiene che il glucosio, dopo il trasporto dentro la cellula β ad opera di specifici gluco-trasportatori (GLUT2 e GLUT1), grazie alla glucochinasi subisca una fosforilazione che determina l'innescò della cascata glicolitica. Il piruvato che ne deriva entra nel mitocondrio, e attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici ed il conseguente ingresso nella catena respiratoria mitocondriale porta 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, con conseguente depolarizzazione della membrana, apertura dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti ed

ingresso di ioni Ca^{2+} nella cellula. Quest'ultimo evento determina, infine, attraverso meccanismi complessi e non ancora del tutto identificati, l'esocitosi dei granuli di insulina. La beta cellula pancreatica può divenire disfunzionale in seguito a svariati stimoli sia fisiologici che patologici. Tra gli stimoli fisiologici bisogna ricordare il glucosio e gli acidi grassi liberi; queste sostanze fisiologicamente presenti nell'organismo, sono in grado di danneggiare sia la funzione che la vitalità delle beta cellule pancreatiche. La beta cellula che fisiologicamente è preposta a rispondere a questi stimoli, se questi permangono nel tempo, sono in grado di determinare apoptosi e morte cellulare [26]. Peraltro, è noto che nei primi anni di vita la massa β -cellulare aumenta notevolmente, grazie a marcati fenomeni replicativi e di neogenesi. Con l'avanzare dell'età, i fenomeni apoptotici tendono a prevalere su quelli rigenerativi, e la massa cellulare si riduce leggermente. In determinati casi, ad esempio in seguito a riduzione della sensibilità all'insulina o in gravidanza, le cellule β sono in grado di adattarsi alle nuove circostanze. In particolare, 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 cellule.

– Alfa cellula pancreatica e Glucagone

La popolazione α cellulare all'interno dell'isola pancreatica rappresenta circa il 20% della quota cellulare totale. La principale funzione espletata dalla cellula alfa è rappresentata dalla produzione e secrezione di glucagone. Tale ormone rappresenta il principale regolatore dell'omeostasi del glucosio, contrastando l'azione insulinica, specialmente durante l'ipoglicemia. La secrezione di glucagone da parte dell' α -cellula pancreatica è regolata da vari meccanismi tra cui la glicemia, l'impulso neurale e la secrezione dalle

vicine β cellule. Tuttavia, la secrezione di glucagone risulta compromessa negli stati diabetici, causando acutizzazione dei disturbi glicemici.

- **Funzione del Glucagone**

Il glucagone, secreto dall' α -cellula, è un ormone costituito da 29 aminoacidi, che espleta effetti biologici su un gran numero di organi. La sequenza amminoacidica è altamente conservata attraverso le diverse specie di mammiferi; inoltre anche l'importante funzione in vivo espletata per il mantenimento dei normali livelli di glucosio nell'organismo risulta altamente mantenuta nelle diverse specie di mammiferi.

Pertanto, è concepibile come la struttura e la funzione del glucagone siano stati rigorosamente conservati nel processo di evoluzione.

Il glucagone è processato a partire dal suo precursore (più grande), proglucagone. Il gene del proglucagone è espresso nelle α cellule, nelle L cellule intestinali e in alcuni neuroni nel cervello inclusi quelli nell'ipotalamo. Il gene del proglucagone codifica una molecola di 180 aminoacidi, il differente processamento porta alla produzione di diversi ormoni, inclusi glucagone, glicentina, oxitomodulina, GLP-1 e GLP-2 [27]. L'espressione di ognuno di questi ormoni è mediato dalla differente espressione dell'enzima pro-ormone convertasi (PC) il quale taglia il proglucagone in differenti siti [28]. La presenza massiva di PC2 nell' α cellula porta ad una produzione predominante di glucagone (con una minore quantità di GLP-1) [29, 30]. Contrariamente, nelle L-cellule intestinali e nel cervello la presenza predominante di PC1/3 permette la produzione dell'ormone incretinico, GLP-1, dell'ormone intestino-tropico GLP-2, della glicentina e dell'ositomodulina [27, 31].

In condizioni fisiologiche, il glucagone viene rilasciato nel flusso ematico in risposta all'ipoglicemia per contrastare l'azione dell'insulina nei tessuti periferici, prevalentemente

nel fegato e funziona come un contro-regolatore per il ripristino della normoglicemia. Esso promuove la gluconeogenesi epatica, glicogenolisi e, contemporaneamente, inibisce la glicolisi e glicogenesi; inoltre induce l'aumento di glucosio nel sangue per contrastare l'ipoglicemia [32, 33].

Al contrario, a stomaco pieno, domina l'azione dell'insulina che induce la diminuzione del rilascio epatico di glucosio migliorando nel contempo l'assunzione di glucosio epatico per mantenere la normoglicemia. Pertanto, il rapporto insulina/glucagone è un determinante critico del metabolismo epatico del glucosio per il mantenimento generale della glicemia. Il glucagone può anche stimolare la secrezione di insulina dalle β -cellule pancreatiche e, indirettamente, il rilascio di glucosio [34]. Inoltre, si pensa che il glucagone giochi un ruolo importante nello sviluppo dell'isola pancreatica, anche se i meccanismi molecolari alla base di questi effetti durante l'embriogenesi e negli organismi adulti non sono pienamente noti [35, 36].

Prese insieme, queste azioni indicano un ruolo importante per il glucagone nel mantenimento omeostasi del glucosio.

L'azione del Glucagone è relativamente complessa e coinvolge la regolazione coordinata di fattori trascrizionali e network di trasduzione del segnale che convergono nella regolazione di aminoacidi, lipidi e metabolismo dei carboidrati.

- Disregolazione della funzione dell' α -cellula nel diabete

Eccessiva secrezione di Glucagone: Il glucagone gioca un ruolo critico nell'omeostasi del glucosio attraverso la regolazione del metabolismo del glucosio epatico. I livelli di glucagone circolante sono spesso elevati in entrambi i tipi di diabete, 1 e 2, e si pensa contribuisca allo sviluppo della glucotossicità ed al peggioramento del diabete[37-40].

Inoltre, l'assenza della soppressione del glucagone postprandiale nei pazienti diabetici contribuisce all'insorgenza di iperglicemia postprandiale [41-43]. Uno dei fattori principali che contribuiscono all'eccesso di glucagone potrebbe essere il relativo aumento delle α cellule rispetto alle β nell'isola pancreatica, in entrambi i tipi di diabete. Inoltre, nelle isole di diabetici con T1DM, l'aumento dell'area e del numero di cellule α , nonché della distribuzione dei tipi cellulari all'interno dell'isola sono disregolati a causa della distruzione delle β . Sebbene il preciso meccanismo che porta all'iperglicemia negli stati di diabete sia ancora oscuro, la disfunzione della β cellula rappresenta un possibile candidato, a patire dai difetti di secrezione insulinica. Dunque l'alterata funzione delle β cellule nel diabete potrebbe potenzialmente indurre anche un inappropriato livello di glucagone (elevato per mancata soppressione da parte dell'insulina sulla cellula alfa) [44].

Risposta errata da parte del glucagone all'ipoglicemia: I pazienti diabetici (sia di tipo 1 e tipo 2) spesso sviluppano risposte controregolatorie difettose all'ipoglicemia, associate alla ridotta o assente risposta secretoria da parte delle alfa cellule pancreatiche. Una risposta secretoria difettosa all'ipoglicemia in stati iperinsulinemici spesso può essere causa di crisi ipoglicemiche ed inoltre può rappresentare un limite nel controllo della glicemia con terapia insulinica [45, 46]. Inoltre, l'ipoglicemia associata a insufficienza del sistema nervoso autonomo è indotta soprattutto nei pazienti con frequente esposizione ad ipoglicemia, che porta ad un peggioramento del fenotipo [47]. Questa risposta difettosa all'ipoglicemia include la risposta simpato-adrenale e neuro-ormonale [43, 48, 49].

Quale sia la causa di tali risposte difettose all'ipoglicemia è ancora sotto studio e suggerisce teorie che includono alterazioni nel trasporto e metabolismo del glucosio a livello celebrale, causate da frequenti esposizioni all'ipoglicemia[50]e/o difetti negli effetti intracellulari

sulla α cellula da parte delle cellule β , come ad esempio lo “spegnimento” dell’insulina[51, 52]o dello zinco [53].

- Meccanismi che regolano l’espressione del glucagone

Canali ionici e attività elettrica: così come la secrezione insulinica delle β -cellule, la secrezione di glucagone da parte delle α cellule è regolata dalla presenza di una comunicazione di tipo elettrico tra i diversi canali ionici. Il canale K^+ ATP-sensibili (K^{+ATP}), è considerato il canale primario nonché il principale componente regolatore della secrezione di glucagone; è infatti in grado di innescare la depolarizzazione del potenziale di membrana attraverso una cascata di eventi, che prevedono dapprima all’attivazione dei canali Ca^{2+} di tipo T a basso voltaggio, l’apertura dei canali tetrodotossina (TTX)- Na^+ sensibili e la successiva depolarizzazione di membrana e a sua volta questo fenomeno induce l’attivazione dei canali Ca^{2+} di tipo L o N ad alto voltaggio ed infine induce l’esocitosi dei granuli secretori contenenti glucagone [54, 55]. Recenti studi hanno rivelato che l’attività del canale K^{+ATP} per la sua funzione ottimale è regolata da uno stretto *range* di potenziale di membrana [56]. È interessante notare che, alcuni studi hanno anche riportato come, in maniera simile alla secrezione di insulina glucosio-indotta delle β -cellule, l’alto glucosio aumenta l’ATP nelle α cellule isolate provocando la chiusura di canali K^{+ATP} ed un successivo aumento dell’esocitosi del glucagone [57, 58]. Questi studi suggeriscono che la regolazione della secrezione di glucagone da parte del glucosio nelle α cellule è complesso e che altri meccanismi di regolazione, oltre al glucosio stesso, giocano un ruolo significativo. Recentemente, uno studio condotto su α cellule purificate, ha dimostrato che i canali K^{+ATP} già a basse concentrazioni di glucosio sono chiusi ed i livelli elevati di glucosio, che inducono un modesto decremento dell’afflusso di Ca^{2+} , non influiscono sul metabolismo del

glucosio e sull'attività del canale K^{+ATP} . [59]. Questi interessanti risultati suggeriscono che il meccanismo di regolazione dell'afflusso di Ca^{2+} da parte del glucosio è indipendente dai canali K^{+ATP} . Così, la diretta riduzione dell'afflusso di Ca^{2+} [60] indotta da alti livelli di glucosio potrebbe essere insufficiente e relativamente meno importante per la soppressione della secrezione di glucagone, durante l'iperglicemia. Ciò suggerisce inoltre che fattori diversi dal glucosio giocano un ruolo nella soppressione della secrezione del glucagone indotta dall'alto glucosio [59].

Glucosio ed altri nutrienti: la secrezione di glucagone da parte delle α cellule è elevata in risposta all'ipoglicemia e soppressa dall'iperglicemia, in vivo. La regolazione della secrezione del glucagone da parte del glucosio rimane un argomento ampiamente complesso e di certo è necessario prendere in considerazione il sostanziale contributo delle interazioni neuronali, ormonali e intra-isola.

Mentre alcuni studi suggeriscono un effetto soppressivo diretto sulla funzione secretoria nell' α cellula da parte del glucosio [60], la paradossale stimolazione della secrezione di glucagone dalle alte concentrazioni di glucosio, in isole isolate e linee di α -cellule [57, 58], suggerisce che ulteriori meccanismi contribuiscono alla secrezione del glucagone in risposta al glucosio.

Gli aminoacidi come la L-arginina sono potenti stimolatori della secrezione di glucagone [61]; questo può essere fisiologicamente rilevante al fine di prevenire l'ipoglicemia, dopo assunzione di proteine, poiché è noto che gli aminoacidi sono in grado di stimolare la secrezione dell'insulina. Altro mediatore da tenere in considerazione è rappresentato dal L-glutammato, secreto da vari tipi cellulari, comprese le cellule neuronali. Il glutammato in qualità di neurotrasmettitore, è noto essere presente a livello delle α -cellule isolate, come contenuto delle vescicole secretorie di glucagone. È stato dimostrato che il glutammato

secreto dalle cellule α agisce come segnale di feedback positivo autocrino per la secrezione di glucagone [62]. Bassi livelli di glucosio stimolano il rilascio di glutammato da parte delle cellule α , che a sua volta agisce in modo autocrino portando alla depolarizzazione della membrana e la secrezione di glucagone [62].

Sistema nervoso e neurotrasmettitori: mentre la glicemia è in grado di modulare la secrezione di glucagone direttamente, diversi studi indicano il coinvolgimento del sistema nervoso centrale e/o autonomo nella regolazione della secrezione di glucagone [63-66]. L'ipoglicemia rappresenta una condizione critica per il corpo poiché il glucosio rappresenta il carburante indispensabile per il cervello. Così in risposta all'ipoglicemia, la risposta del sistema nervoso innesca subito vari meccanismi contro-regolatori per proteggere il cervello dalla privazione di energia, tra cui la stimolazione della secrezione di glucagone.

La densa innervazione delle isole suggerisce che entrambe α - e β -cellule sono regolate dal sistema nervoso [63]. Il sistema nervoso autonomo (ANS) trasmette gli stimoli per promuovere la secrezione di glucagone, soprattutto in condizioni di ipoglicemia, quando il glucosio nel sangue deve essere aumentato per la fornitura di combustibile per il corpo. L'ANS può modulare tutte le cellule dell'isola e regolare la secrezione di glucagone direttamente attraverso il parasimpatico o indirettamente attraverso percorsi che possono modulare fattori paracrini dell'isola [63]. Inoltre, neurotrasmettitori autonomi, come l'adrenalina e la noradrenalina, agiscono attraverso recettori adrenergici per stimolare la secrezione di glucagone da parte della cellula α [67, 68]. La secrezione di glucagone è anche modulata da altri neurotrasmettitori, quali il GABA e, come già citato, il glutammato.

Il preciso meccanismo attraverso cui il sistema nervoso centrale (SNC) percepisca il glucosio nel sangue e influenzi la secrezione di glucagone non è pienamente compreso, anche se diverse possibilità sono state suggerite [66].

- Ruolo dell'insulina sull'alfa cellula

L'insulina è un ormone secreto dalle cellule β del pancreas endocrino in risposta all'elevata concentrazione di glucosio nel sangue e possiede un effetto inibitorio paracrino sulle cellule alfa [69-72]. Recenti indagini hanno fornito una certa comprensione del meccanismo con cui l'insulina inibisce la secrezione del glucagone, grazie al legame con il suo recettore presente sulla superficie della membrana della cellula alfa [58, 73, 74].

Il recettore insulinico, appartenente alla famiglia dei recettori di membrana, è una proteina etero-tetramerica formata da due subunità α extracellulari e due subunità β transmembrana collegate da ponti di-solfuro. L'insulina lega le subunità α del recettore e stimola l'autofosforilazione dei residui tirosinici della subunità β . Le subunità β attivate determinano la fosforilazione di substrati intracellulari appartenenti classicamente a due vie, comunemente identificate come metabolica e proliferativa. Alla prima appartengono le proteine della famiglia delle IRS (IRS-1), PI-3-chinasi, AKT, mentre alla via proliferativa appartengono le proteine IRS-2 e la famiglia di MAP-K, proteine capaci di influenzare l'espressione di PAX6, fattore trascrizionale implicato nella differenziazione delle alfa cellule e nella trascrizione del gene del glucagone. Un'alterazione nella trasduzione di questi segnali potrebbe determinare insulino-resistenza, alterazioni dell'attività proliferativa delle cellule nonché la secrezione di glucagone.

Strumenti Farmacologici

Negli ultimi anni, grazie al sempre più crescente interesse scientifico per la scoperta di nuove possibili terapie per il diabete mellito, sono stati messi a punto una serie di nuovi

farmaci, basati su meccanismi innovativi e mirati a correggere i diversi aspetti fisiopatologici, schematicamente elencati nella figura 6.

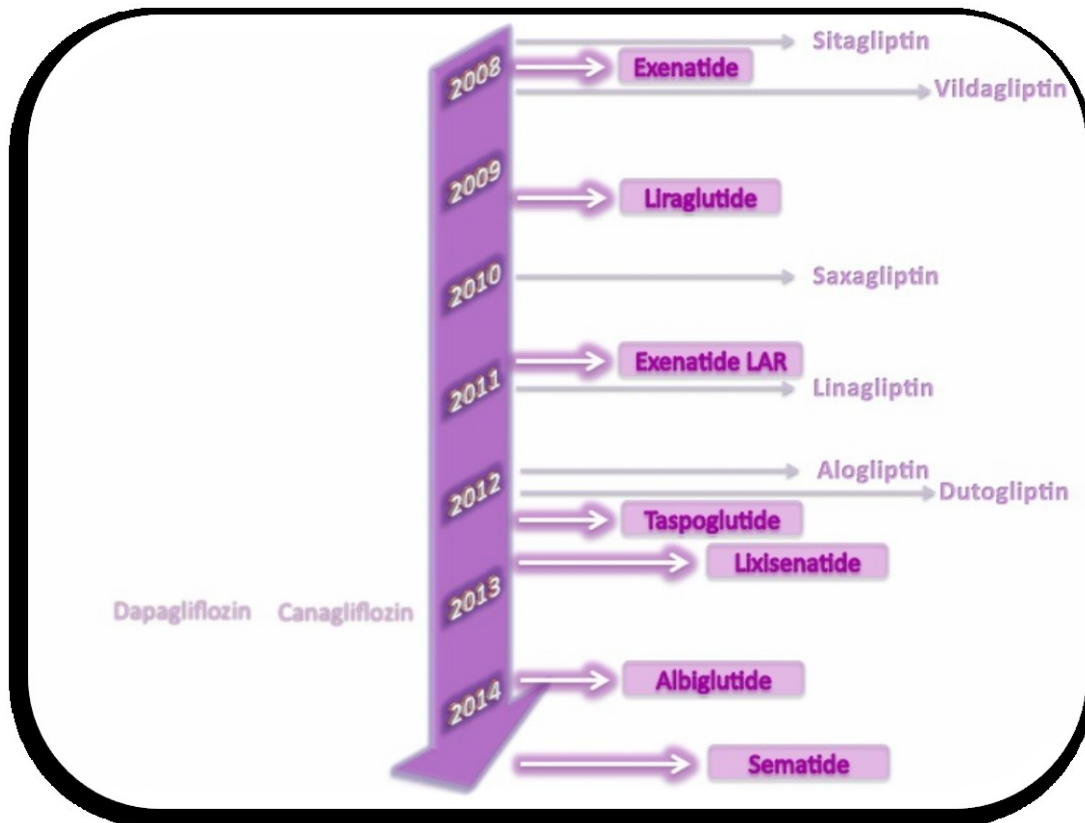


Figura 6: Linea temporale delle più recenti e delle future molecole per il trattamento del diabete mellito di tipo 2;

Tra questi negli ultimi anni hanno destato il maggiore interesse le incretine, ormoni secreti in maniera nutriente-dipendente in grado di migliorare notevolmente la secrezione di insulina glucosio-dipendente[75].

– Incretine: analoghi del GLP-1 e inibitori delle DPP4

Nell'uomo e in molti mammiferi, in risposta all'ingestione di cibo, vengono prodotti ormoni, quali GIP (glucose-dependent peptide) e GLP1 (glucagon-like peptide), in grado di preparare l'intestino ed il pancreas alla digestione ed alla secrezione ormonale, tali ormoni sono noti come "ormoni incretinici". [75-77].

È noto come in seguito all'assunzione di glucosio per via orale venga scatenata una maggiore risposta insulinica rispetto alla somministrazione per via endovenosa [77]. Questo fenomeno, noto come «effetto incretinico» è responsabile di quasi il 60% della secrezione postprandiale di insulina [78].

Il diabete di tipo 2 è caratterizzato da un difetto incretinico, infatti mentre il GIP non stimola la secrezione di insulina, l'azione del GLP-1 è ancora conservata in condizioni sovrafisiologiche.

Il GLP-1 è un prodotto post-traduzionale del gene del proglucagone, è noto, infatti, che il gene del proglucagone non è espresso solo nelle cellule alfa del pancreas, ma anche nelle cellule L della mucosa intestinale [79], così come in certi neuroni del tronco cerebrale [80]. Tale proormone a livello della cellula alfa viene scisso dalla pro-ormone convertasi 2 (PC2) per la produzione di glucagone, mentre nelle cellule L, viene scisso da PC1/3 rilasciando GLP-1 e GLP-2 [81](Fig. 7).

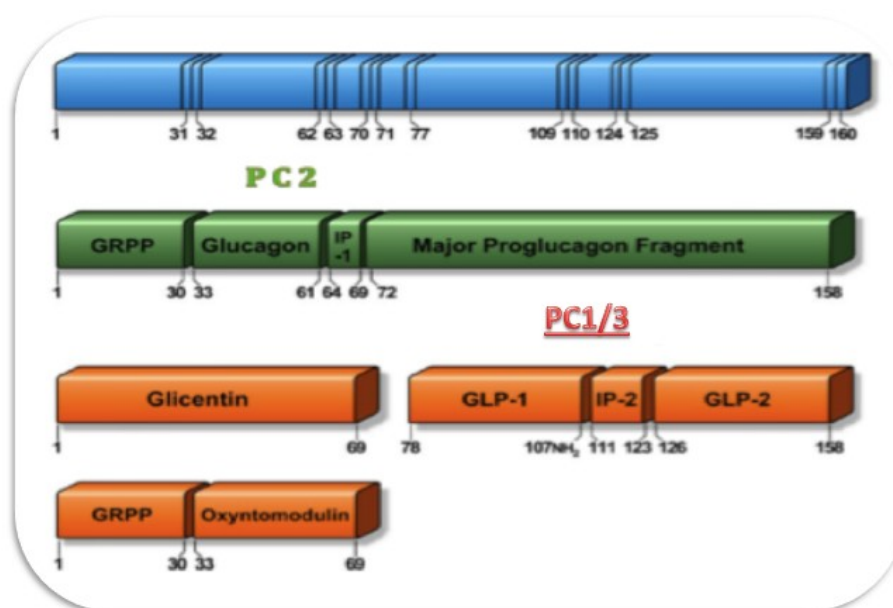


Figura 7. Processamento del proglucagone ad opera di PC2 e PC1/3. [82]

Proprio per tale motivo questi ormoni mostrano omologia di circa il 50% di aminoacidi al glucagone, tuttavia, anche se il GLP-2 non è insulintropico e non ha proprietà ipoglicemizzanti, il GLP-1 aumenta fortemente la secrezione di insulina glucosio-dipendente [83]. Il GLP-1 è uno delle più efficaci sostanze note come insulino-stimolanti. L'attività insulintropica del GLP-1, che è strettamente dipendente dal glucosio, viene esercitata tramite legame ad un recettore specifico (GLP1 Receptor o GLP1R), tale associazione determina, tramite una proteina G stimolatoria, l'attivazione e la formazione di cAMP ed aumento delle concentrazioni di calcio intracellulare. Questi eventi sfociano nella esocitosi dei granuli contenenti insulina dalle cellule beta [84]. In aggiunta al suo effetto insulintropico, GLP-1 inibisce lo svuotamento gastrico, riduce l'assunzione di cibo [85]inibisce la secrezione di glucagone [86] e riduce il tasso di produzione di glucosio endogeno [87]. Il GLP-1 migliora fortemente l'azione insulintropica del glucosio stesso e trasmette "glucosio competenza" alla beta cellula.

Infine, e forse più importante, in diversi modelli sperimentali, questo ormone intestinale è in grado di proteggere le cellule beta da apoptosi [88], stimolare la proliferazione delle cellule beta [89] e migliorare la differenziazione di nuove cellule beta a partire da cellule progenitrici del pancreas epiteliolo del condotto [90].

Inoltre, anche se il recettore del GLP-1 è espresso prevalentemente nelle cellule beta e delta del pancreas, si pensa possa essere presente anche a livello delle cellule alfa. Pertanto, l'inibizione della secrezione di glucagone da parte del GLP-1 può essere dovuto ad un effetto paracrino (indiretto) derivante dalla stimolazione della secrezione di insulina e somatostatina dalle vicine cellule beta e delta e/o un effetto diretto attraverso il recettore del GLP-1 sito a livello delle cellule alfa.

Risulta ampiamente dimostrato in letteratura come la somministrazione di GLP-1 nei pazienti con diabete di tipo 1 porta ad una lieve riduzione nei livelli di glucagone plasmatico postprandiale [91], ed ancora più importante, è in grado di sopprimere la secrezione di glucagone nei soggetti con diabete di tipo 1 che non presentano residui di funzione beta cellulare [92, 93]

Con l'identificazione del GLP-1 nei primi anni ottanta e la successiva dimostrazione dei suoi effetti metabolici si è iniziato ad ipotizzare un possibile impiego terapeutico di tale ormone, soprattutto nel diabete di tipo 2. Nei primi studi effettuati è stato dimostrato come il GLP1, ottenuto in forma ricombinante e somministrato per infusione endovenosa continua (per un breve periodo) [94], è in grado di migliorare significativamente il controllo glicemico in pazienti con diabete di tipo 2 ed inoltre, nell'arco di sei settimane induce una significativa riduzione dell'appetito e conseguentemente riduzione del peso corporeo [95]. Questi risultati hanno dimostrato inequivocabilmente un potenziale terapeutico per il GLP-1, fino a quel momento soltanto ipotizzato.

Dato dunque il ruolo importante dell'iper glucagonemia nello sviluppo e nella progressione del diabete di tipo [96], sembra che l'effetto glucagonostatico del GLP-1 possa essere clinicamente importante tanto quanto il suo effetto insulintropico [97].

Nei pazienti con diabete di tipo 2, la potenza insulintropica del GLP-1 può essere ridotta [98], e questo può influire sulla tolleranza al glucosio tipica della malattia.

Fin dall'inizio però risultava evidente come un trattamento basato sulla somministrazione della molecola del GLP-1 non poteva rappresentare una terapia facilmente applicabile su larga scala, a causa della necessità di ricorrere ad infusione continua, per ovviare alla breve emivita dell'ormone stesso [99], che una volta prodotto nella sua forma attiva viene rapidamente inattivato dal DPPIV.

A tale scopo nel corso degli ultimi anni sono state portate avanti diverse possibili alternative all'infusione del GLP-1, incentrate sul principio di riprodurne o potenziare l'azione dell'ormone.

I principali metodi possono essere collocati in tre gruppi di sostanze che inducono un effetto incretinomimetico, ovvero ormoni naturali agonisti del GLP-1, analoghi sintetici e inibitori dell'enzima DPP-IV.

Lo sviluppo terapeutico, in questo senso, ha portato alla produzione di nuovi farmaci, agonisti/analoghi del GLP1 (Exenatide, Liraglutide, exenatide LAR, albiglutide, taspoglutide, AVE0010 o Lixisenatide, ancora sotto revisione) ed inibitori delle DPP4 (Sitagliptin, Vildagliptin, Saxagliptin, Linagliptin ancora in sperimentazione), generando un forte interesse clinico.

Entrambi gli approcci stimolano la secrezione di insulina ed inibiscono il rilascio di glucagone [91, 100].

Gli analoghi del GLP1 sono proteine iniettabili che, comparate con il GLP-1 nativo, hanno un maggiore effetto sull'appetito e sulla perdita di peso, inoltre gli inibitori delle DPP4 hanno maggiore effetto sull'iperglicemia postprandiale ma un minore effetto sull'iperglicemia a digiuno[101].

Le terapie basate sulle incretine hanno diversi potenziali vantaggi se comparate con le altre classiche terapie per la cura del diabete, per il basso rischio di ipoglicemia e gli effetti benefici sull'omeostasi del glucosio. Inoltre vi sono crescenti evidenze sui potenziali benefici di questi medicinali nel trattamento e la prevenzione del rischio cardiovascolare.

Alla luce di queste osservazioni, soprattutto sulla base dell'ipotesi bi-ormonale [102] e le prove che l'iper-glucagonemia è importante nella patogenesi del diabete mellito, vale la

pena di rivalutare il contributo sostanziale ed il potenziale clinico dell'utilizzo del GLP-1 per il trattamento di questa patologia metabolica multifattoriale.

Progetti Scientifici

La stesura di questa tesi di dottorato mi permette di poter riassumere il lavoro svolto durante questo periodo formativo di Dottorato.

L'interesse del mio studio è stato rivolto principalmente alla caratterizzazione della funzione e del comportamento dell'alfa cellula pancreatica. In particolare mi sono occupata di studiare i meccanismi di secrezione di glucagone dopo stimolo fisiologico (glucosio e aminoacidi) e la risposta di queste cellule all'insulina, fisiologico inibitore della secrezione. Ho anche studiato il possibile ruolo dannoso di questi stessi stimolanti, quando presenti cronicamente ed in maniera aumentata.

Durante questo periodo ho potuto studiare la fisiopatologia dell'alfa cellula da diversi punti di vista, sviluppando differenti progetti di ricerca; tali progetti mi hanno permesso di conoscere a fondo gli aspetti che caratterizzano l'alfa cellula pancreatica nonché identificare il ruolo chiave che essa svolge all'interno dell'intero panorama diabete.

Un primo progetto, pubblicato dal nostro gruppo di ricerca nel 2010 [103], ha avuto come principale scopo quello di identificare la risposta da parte dell'alfa cellula ad una condizione di lipotossicità, in termini di secrezione. Come sappiamo infatti la lipotossicità rappresenta un evento di norma presente nei pazienti diabetici; se però gli effetti di questo fenomeno sulle beta cellule pancreatiche sono ben note, quale sia il ruolo della lipotossicità sulle alfa cellule risulta ancora poco noto; il nostro studio ha contribuito ad apportare un tassello fondamentale all'interno dell'enorme puzzle panorama del diabete. Abbiamo, infatti, dimostrato come la presenza prolungata di palmitato induce insulino-resistenza

specifica nelle alfa cellule pancreatiche. Questo potrebbe spiegare l'iperglucagonemia presente nei pazienti con diabete mellito di tipo 2. I risultati in dettaglio verranno illustrati di seguito, ma questi sono già stati pubblicati su una rivista a buon impact factor [103].

Poiché nel complesso sistema che porta all'insorgenza del diabete è stato ampiamente dimostrato che anche le citochine, in combinazione tra loro, inducono l'apoptosi nelle beta cellule del pancreas umano e in quello del roditore [104, 105]; abbiamo sviluppato un secondo progetto, in collaborazione con il gruppo di ricerca del professore Michele Purrello, al momento in fase di revisione. In questo progetto, lo scopo principale è stato quello di verificare sperimentalmente il coinvolgimento del macchinario apoptotico nella patogenesi del Diabete Mellito (DM). I nostri dati hanno messo in luce per la prima volta le basi molecolari della maggiore resistenza e differente risposta, in termini di induzione dell'apoptosi indotta da citochine, di alfa e di beta cellule pancreatiche.

Proseguendo gli studi per la caratterizzazione molecolare della alfa cellula, poiché è risaputo che una delle principali disfunzioni presente nei pazienti diabetici è rappresentata dalla mancata risposta allo stimolo insulino; attraverso tecniche di silenziamento genico abbiamo sviluppato un terzo progetto, in fase di completamento. In questo progetto il nostro interesse è stato rivolto verso il recettore insulinico presente sulle alfa cellule pancreatiche. Abbiamo quindi sviluppato metodiche di silenziamento genico in grado di bloccare specificamente l'espressione del recettore insulinico sul nostro sistema cellulare. Ottenendo quindi alfa cellule prive di recettore insulinico abbiamo potuto analizzare il contributo specifico del segnale insulinico intracellulare sia per la funzione secretoria di queste cellule sia per la funzione proliferativa. Oltre alla comprensione di quei meccanismi molecolari che permettono alla cellula alfa di sopprimere, in condizioni fisiologiche, al

mancato funzionamento del recettore insulinico (IR); e alle conseguenze, su tali meccanismi, indotte da condizioni sfavorevoli, quali ad esempio la lipotossicità.

Infine, per caratterizzare ulteriormente quali ormoni siano in grado di controllare la cellula alfa, ho portato avanti un progetto che ha previsto l'analisi dell'effetto del GLP-1 sulla cellula alfa pancreatica. Questo progetto, ultimato dal punto di vista sperimentale e in atto in fase di scrittura, ha voluto valutare se il GLP-1 potesse avere un'azione diretta a livello delle cellule alfa pancreatiche. I risultati di questo studio contribuiranno a spiegare l'effetto degli ormoni gastro-intestinali, in particolare del GLP-1 e dei suoi analoghi ed agonisti recettoriali, sulla cellula alfa pancreatica permettendo la comprensione degli effetti sistemici sui livelli di glucagone riscontrabili nei pazienti diabetici in terapia con incretine.

"Effetto del palmitato sul segnale intracellulare dell'insulina in una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche"

[i risultati di questo progetto sono stati pubblicati su Endocrinology [103]]

In fisiologia le alfa cellule pancreatiche producenti glucagone, in sinergia con le beta cellule pancreatiche producenti insulina, regolano la normale omeostasi glicemica e dei nutrienti nell'organismo.

Concentrazioni fisiologicamente basse di glucosio e di insulina stimolano il rilascio di glucagone, mentre l'iper-glicemia e l'iper-insulinemia sopprimono la secrezione di tale ormone. È noto come inappropriati livelli di glucagone siano tipicamente presenti in pazienti affetti da diabete di tipo 2, tanto in condizioni basali quanto nella fase postprandiale, nonostante gli elevati livelli circolanti di glucosio ed insulina[51, 52, 102, 106-109]. È stato ipotizzato che questa alterazione potrebbe essere secondaria ad una specifica insensibilità delle alfa cellule all'insulina e/o al glucosio. Sebbene sia stato ampiamente dimostrato come elevati livelli di acidi grassi siano in grado di alterare il funzionamento delle cellule beta sia nelle isole di roditori sia in quelle umane[107, 110], meno dati sono disponibili per le cellule alfa. La lipotossicità potrebbe dunque essere considerata un possibile candidato in grado di agire a livello delle alfa cellule pancreatiche, sia alterando il metabolismo del glucosio, sia agendo negativamente sul segnale insulinico intracellulare, inducendo cioè insulino-resistenza. Questa possibile alterazione potrebbe spiegare il ruolo di fattori ambientali (ipernefemia) nell'indurre alterazioni funzionali della cellula alfa pancreatica che si ripercuotono in ultima analisi sull'omeostasi metabolica dell'organismo intero.

L'insulina, ormone prodotto dalle vicine cellule beta, agisce sulla secrezione di glucagone attraverso il legame con il suo recettore specifico di superficie sulle alfa [58, 110-113]; un'alterazione nel segnale insulinico potrebbe compromettere questo effetto.

Lo scopo dello studio, quindi, è stato quello di analizzare la funzionalità della cellula alfa in termini di secrezione di glucagone sia in condizioni di controllo che dopo esposizione cronica ad acidi grassi liberi (FFA). Inoltre, poiché gli FFA possono determinare insulino-resistenza in svariati tessuti [112, 113], abbiamo studiato il possibile ruolo del palmitato sulla funzione del recettore insulinico e del suo segnale insulinico intracellulare nelle alfa cellule pancreatiche, al fine di comprendere il ruolo del segnale insulinico nel nostro sistema. I nostri esperimenti sono stati condotti in una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche murine (α -TC1 clone 6) esposte cronicamente (48 h) a palmitato (50 mmol/L per 48 h). Dopo l'esposizione cronica a palmitato è stata valutata la risposta acuta (5 minuti ad insulina) e valutata la capacità di soppressione di questo ormone sulla secrezione di glucagone.

Materiali e metodi

- **Modelli cellulari**

Le cellule α TC-1, acquistate dall'American Type Culture Collection (ATCC), provengono da glucagonoma di topo capaci di produrre solo glucagone e non insulina.

Le α TC1 sono state coltivate a 37°C con il 5% di CO² in mezzo D-MEM (SIGMA Aldrich), supplementato con 10% FBS (Fetal Bovine Serum), albumina, 2% Glutamina, 1% aminoacidi non essenziali, antibiotici, penicillina e streptomina, all'1%.

Le cellule sono state tripsinizzate due volte la settimana.

- Preparazione del palmitato

La soluzione di palmitato è stata preparata come descritto in precedenza.[114-116]. Il palmitato è stato preparato miscelando e riscaldando concentrazioni uguali di NaOH e palmitato in acqua distillata per ottenere una concentrazione finale di 50 mmol/L. Questa soluzione è stata diluita con il 5% di BSA (priva di acidi grassi) per ottenere una concentrazione finale di 50mmol/L. La soluzione stock è stata filtrata, aliquotata e conservata a -20°C. La soluzione di palmitato è stata preparata fresca prima di ogni esperimento.

- Stimolazione con insulina

Trascorse 24 ore dall'impianto le α -TC1-6 sono state incubate per 48 ore a 37°C in terreno D-MEM completo, in presenza o assenza di palmitato. Al termine delle 48 ore, le cellule sono cresciute per 24 ore con terreno privo di FBS e successivamente stimulate acutamente con insulina a concentrazione crescenti, da 10^{-10} a 10^{-8} M, per 5 minuti. Tale tempo di stimolazione è stato scelto dopo una specifica dose risposta ed uno specific *time course* con insulina. Il recettore insulinico appariva attivato in maniera massimale dopo 5 minuti di esposizione. Al fine di testare l'attivazione completa di MAPK, in alcuni esperimenti la stimolazione con insulina è stata effettuata per 10 minuti.

Sono stati condotti alcuni esperimenti per testare il ruolo di MAPK nella regolazione dell'espressione di PAX6 e del glucagone, a tale scopo sono stati testati due inibitori specifici di MEK , U0126[117]e PD 98059[118], utilizzati a una concentrazione rispettivamente di 25 μ mol/L or 50 μ mol/L durante le ultime 24 ore di crescita.

- Secrezione di glucagone

Dopo 48 ore di crescita in presenza o assenza di palmitato 0.5 mmol/L, le cellule sono state sottoposte a deprivazione di siero (FBS) per 24 ore e successivamente incubate per 2 ore in Krebs-Ringer (KRB) buffer contenente 16.7mmol/L di glucosio e 0.5% di BSA a pH 7.4 in presenza o in assenza di palmitato (0.5 mmol/L) e/o insulina (10^{-9} M). Alcuni esperimenti sono stati condotti con stimolazioni in acuto con Arginina 10 mmol/L per 2 ore al fine di valutare la normale risposta secretoria delle cellule.

Il surnatante è stato aliquotato in vials contenenti aprotinina (0.1 mg/ml) e conservato a -20°C fino al dosaggio del glucagone, che è stato effettuato tramite metodica RIA (radioimmunoassay) (Millipore, Millipore Corporation, Billerica, MA).

- Preparazione dei lisati proteici cellulari

Dopo il periodo di trattamento le cellule sono state lavate due volte con PBS (pH 7.4), incubate con terreno (privo di FBS) per 24h e successivamente sono state trattate in base agli esperimenti da condurre. La stimolazione è stata bloccata con tre lavaggi in PBS freddo (pH 7.4), il liquido in eccesso è stato aspirato ed aggiunto buffer di lisi freddo (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1 % Di sodio dodecil solfato [SDS], 50 mM Tris [pH 7.4], 10 mM sodio pirofosfato, 100 mM NAF, 2 mM PMSF, 2 mM vanadato di sodio, 1 mg di pepstatin per ml, 1 mg di aprotinina per ml, 1 mg di leupeptin per ml). Dopo la lisi, i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 4 °C. Il materiale insolubile è stato separato dal materiale solubile. La concentrazione di proteine è stata quantificata tramite BCA (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA).

- Immunoprecipitazione e Western blot

I lisati proteici sono stati sottoposti ad analisi Western blot, immunoprecipitazione e co-immunoprecipitazione.

L'immunoprecipitazione è stata condotta incubando il complesso proteico G/A-Sepharose per 2 ore a 4°C, sotto costante rotazione, con 4 µg di anticorpi diretti contro specifiche proteine di interesse (IR, IGF-1R, IRS-1 or IRS-2). Successivamente, effettuati 3 lavaggi in PBS, il complesso G/A-Sepharose/anticorpo formatosi è stato incubato per 2 ore a 4°C con 500 µg di lisato proteico e sottoposto a rotazione continua. L'immunoprecipitato ottenuto è stato eluito in gel di acrilammide, trasferito su membrana di nitrocellulosa, incubato prima con specifici anticorpi (anti-IR, IGF-1, IRS-1 o IRS-2) e successivamente con anti-phosphotyrosine (anti-PY) per determinare lo stato di attivazione. La stessa metodica è stata applicata per la co-immunoprecipitazione utilizzando come secondo anticorpo l'anti-PI3K p85α.

I Western blots sono stati effettuati come descritto precedentemente[119].

Brevemente, dopo normalizzazione con BCA, le proteine sono state eluite in gel di acrilamide, trasferite su membrane di nitrocellulosa ed una volta incubate con specifici anticorpi rilevate con metodo ECL. Per la normalizzazione dei lisati, le membrane di nitrocellulosa sono state trattate con Restore stripping buffer (Pierce) per 10 minuti a temperatura ambiente e successivamente incubate con anticorpo anti-actina monoclonale o, in alcuni casi, con gli anticorpi delle rispettive proteine non fosforilate.

- Estrazione, quantificazione dell'mRNA ed analisi dell'espressione genica

L'RNA totale è stato estratto secondo il protocollo TRIzol (Invitrogen Carlsbad,CA), purificato con RNase-free DNase I (SIGMA, St. Louis, MO) e quantificato mediante esame spettrofotometrico. L'RNA è stato retrotrascritto in cDNA mediante RT-PCR con enzima Supertrascript II e primers Oligo dT.

Il differente livello di espressione genica è stato quantificato usando Master Mix Cyber Green (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA), utilizzando lo strumento ABI PRIMS 7700 (PE Applied Biosystems).

I geni sono stati amplificati utilizzando specifici primers per il topo (Tabella 1).

Pax6	5' CCG CTT CAG CTG AAG CTG CA 3' (Rw)
	5' CCT GGT TGG TAT CCC GGG A 3' (Fw)
Glucagone	5' TCT CGC CTT CCT CGG CCT TTC A 3' (Rw)
	5' CCC TTC AAG ACA CAG AGG AGA A 3' (Fw)
Actina	5' TGC CGA TAG TGA TGA CCT GAC C 3' (Rw)
	5' GCC AAC CGT GAA AAG ATG ACC 3' (Fw)

Tabella 1: Coppie di primer per i diversi geni Pax6, Glucagone e Actina.

I primers sono stati disegnati utilizzando il programma Primer Express Software versione 1.5 fornito dall'Applied Biosystems e sintetizzati da MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). Ogni singolo campione è stato analizzato in triplicato e le differenze tra le medie sono state comparate tramite calcolo del $\Delta\Delta CT$, metodica standardizzata per la *Real Time* PCR.

- Analisi mediante Real-time-PCR

Le sequenze dei Primers sono state elaborate dal software Primer Express (Applied Biosystems), e sintetizzati dalla MWG-Biotech (Ebersberg, Germania). Ogni campione è stato eseguito in triplice copia; quando la differenza tra le triplette è stata superiore a 0,5 Ct, la PCR quantitativa è stata ripetuta. I livelli di mRNA sono stati determinati o con elettroforesi su gel di agarosio (RT-PCR) o attraverso l'analisi comparativa dei TC ($\Delta\Delta CT$).

- Metodica RIA

La metodica RIA è stata effettuata incubando i campioni con anticorpo specifico per 20-24 ore a 4°C, al termine dell'incubazione in ogni tubo è stata inserita una concentrazione fissa di antigene tracciante marcato e nuovamente incubato per 22-24 ore a 4°C. Trascorso il periodo di incubazione, in seguito all'aggiunta dell'agente precipitante, i campioni sono stati centrifugati a 4°C per 20 minuti a 2000-3000xg ed il risultante pellet è stato lasciato decantare al fine di eliminare ogni possibile traccia di antigene marcato residuo. Per ogni esperimento condotto una curva standard è stata impostata con concentrazioni crescenti di antigene standard non marcato, al fine poter effettuare le relative misurazioni.

Il saggio così ottenuto è stato rilevato tramite utilizzo di strumentazioni per la conta della radioattività.

- Analisi densitometrica

L'analisi densitometrica dei Western Blot è stata effettuata tramite software *ImageJ*, i dati così ottenuti sono stati analizzati utilizzando Graphpad Prism v.4.0 (Statcom, Germany).

- Analisi statistica

I risultati ottenuti sono presentati con le relative deviazioni standard ($\pm$ SE) ed analizzati con t-test o analisi delle varianti (ANOVA). I valori p minori di 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati

Il disegno sperimentale ha previsto dopo un periodo di esposizione (48 h) con palmitato, una stimolazione con insulina in acuto, al fine di valutare il segnale intracellulare dell'insulina. In particolare abbiamo studiato sia la via metabolica del recettore insulinico (IR-IRS-1, PI3-K, AKT), nota per regolare la sensibilità dei canali K_{ATP} dipendenti e la secrezione di glucagone nelle alfa cellule [58], sia la via mitogenetica di MAPKinasi, che culmina con l'attivazione di fattori trascrizionali e la trascrizione genica.

Dopo esposizione cronica a palmitato il nostro sistema cellulare ha evidenziato un aumento della secrezione nelle cellule pre-esposte rispetto alle cellule di controllo.

Inoltre l'effetto del palmitato sulla secrezione di glucagone era ampiamente visibile anche in seguito a stimolazione con insulina; l'insulina inibiva significativamente la secrezione di glucagone nelle cellule di controllo, mentre lo stesso effetto non era riscontrabile nelle cellule pre-esposte a palmitato [Fig.1].

Ulteriori esperimenti condotti con Arginina (10mmol/L) hanno evidenziato un aumento significativo della secrezione di glucagone sia nel controllo che nelle cellule pre-esposte a palmitato, indicando appunto che la secrezione di glucagone non era compromessa[Fig. 1].

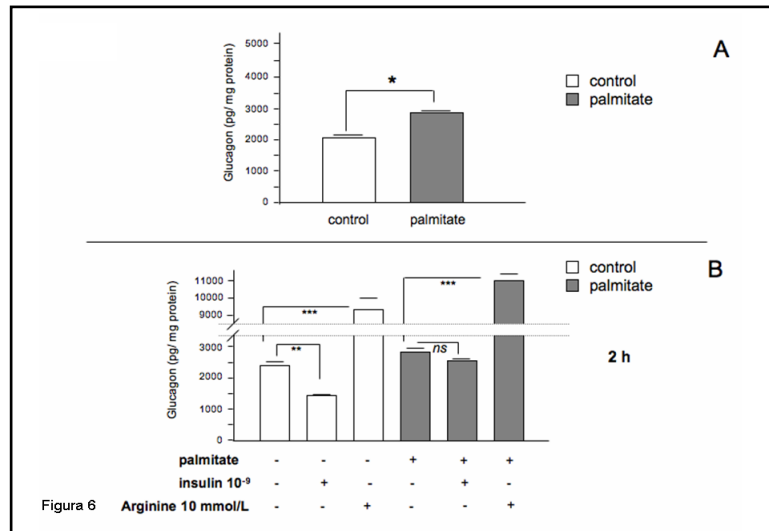


Figura 1. Secretione di glucagone: Secrezione di glucagone nelle cellule di controllo α -TC1 e nelle cellule pre-esposte a palmitato.

Questi dati risultano ampiamente convalidati dagli ulteriori esperimenti condotti sulla fosforilazione del recettore insulinico. La stimolazione con diverse concentrazioni di insulina (da 10^{-10} a 10^{-8} M) ha mostrato un effetto dose-risposta nel gruppo di controllo [Fig. 2]; lo stesso effetto non era riscontrabile nel gruppo di cellule pre-esposte a palmitato; solo ad elevate dosi di insulina (10^{-8} M) la fosforilazione del recettore risultava essere debolmente incrementata [Fig. 2].

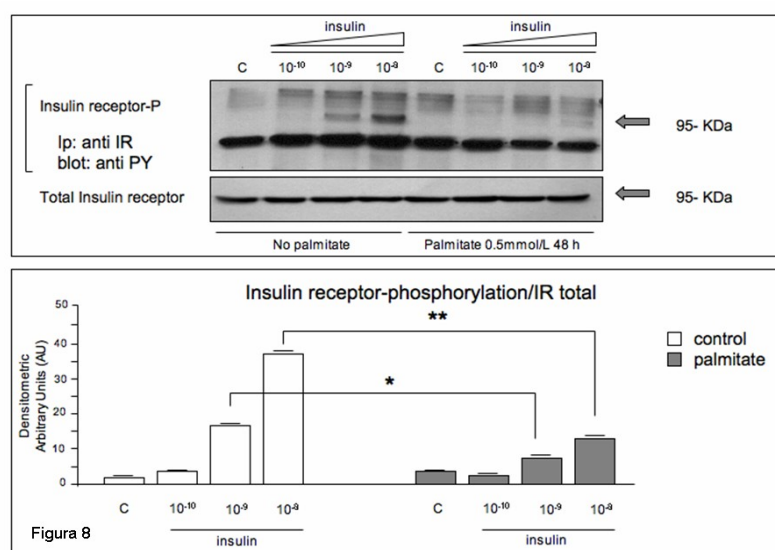


Figura 2. Analisi Western blot per la fosforilazione del recettore dell'insulina (immunoprecipitazione): C, 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} indicano i gruppi di controllo e i gruppi esposti ad insulina. Il pannello superiore mostra blots rappresentativi della proteina P-IR e IR totale. Il pannello inferiore del grafico mostra la media $\pm$ SE dei dati acquisiti da 5 esperimenti separati. * $P < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs gruppo di controllo.

IRS-1 rappresenta uno tra i primi substrati intracellulari del recettore insulinico ad essere attivato dopo il legame dell'insulina con il suo recettore. Abbiamo dunque proseguito il nostro progetto analizzando l'effetto a livello di IRS-1 e misurato la sua fosforilazione. Anche in questo caso in seguito alla stimolazione con insulina si otteneva un'attivazione dose-dipendente Tyr612^{IRS-1} nelle cellule di controllo, con un effetto significativo già a 10^{-10} M e massimo a 10^{-9} M [Fig. 3].

Nelle cellule pre-esposte a palmitato sono stati ottenuti risultati simili a quelli evidenziati per la fosforilazione del recettore insulinico; l'insulina, a basse dosi, non era in grado di attivare IRS-1 mentre a dosi elevate (10^{-8} M) risultava attivato [Fig. 3].

Poichè IRS-1 rappresenta il punto di partenza del segnale insulinico all'interno della cellula, il nostro progetto ha previsto l'analisi dell'intera via di trasduzione del segnale. Generalmente la fosforilazione di IRS-1 porta al legame e conseguente attivazione di PI3-

Kinase (fosfotidil-inositolo 3-Kinase), in particolare il dominio src homology 2 (SH2) della subunità p85 alpha[120, 121].

Abbiamo dunque effettuato la specifica co-immunoprecipitazione di IRS-1 e successiva incubazione con l'anticorpo anti-PI3-K85 α , al fine di identificare se l'effetto del palmitato osservato finora agisse lungo tutta la via di trasduzione del segnale. L'Analisi Western blot per la fosforilazione di Tyr612^{IRS-1} e co-immunoprecipitazione di PI3-K (P85) ha mostrato lo stesso andamento finora osservato [Fig. 3].

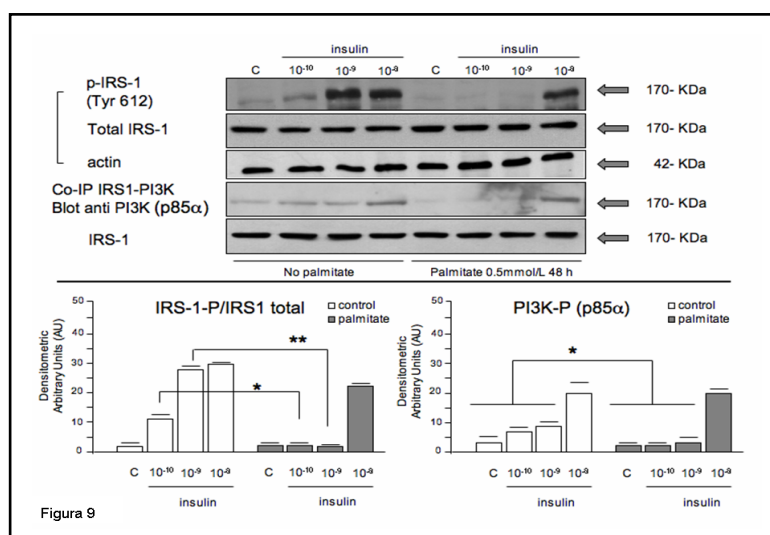


Figura 3: Analisi di Western blot per IRS-1 P (Tyr 612), IRS-1 totale, actina e per PI3-K (P85) e IRS-1. Il pannello superiore mostra due esperimenti rappresentativi per IRS-1 P (Tyr 612) e per la PI3-K (P85). Il pannello inferiore mostra media $\pm$ SE dell'analisi densitometrica di 5 diversi esperimenti; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs gruppi di controllo.

La successiva analisi dell'attivazione di AKT ha evidenziato un analogo andamento, ovvero la presenza di un effetto dose-dipendente nei gruppi di controllo in seguito a stimolazione con insulina [Fig. 4], ed un'assenza di segnale nelle cellule pre-esposte a palmitato, né in Thr308^{AKT} né in Ser473^{AKT}[Fig. 4].

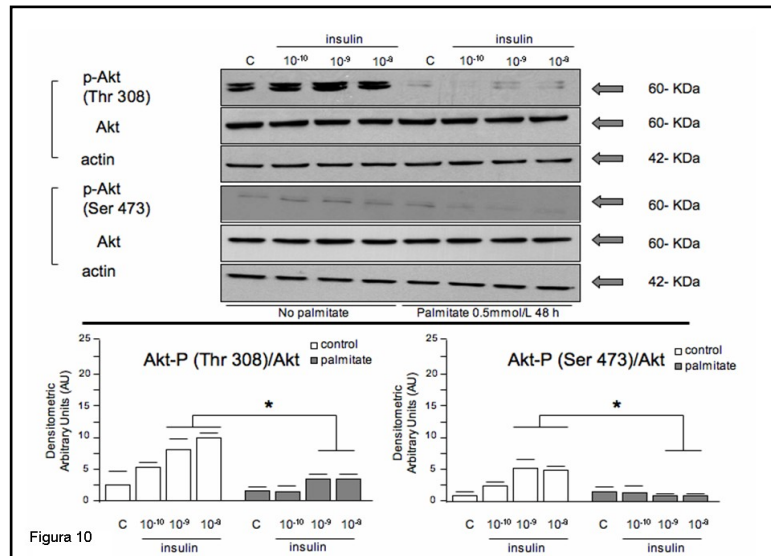


Figura 4: Analisi Western blot per la fosforilazione di Akt a (Ser 473) e (Thr 308):Il pannello superiore mostra un esperimento rappresentativo. Il pannello inferiore mostra media $\pm$ SE dell'analisi densitometrica da 5 diversi esperimenti, * $p < 0.05$ vs gruppi di controllo.

Parallelamente allo studio condotto sulla via metabolica, sono stati effettuati esperimenti per analizzare l'effetto del palmitato sul segnale intracellulare mitogenetico.

A tale scopo abbiamo valutato la fosforilazione di IRS-2 (Insulin Receptor Substrate 2), la via di MAPK ed i suoi effetti sulla sintesi proteica e sull'espressione genica del glucagone.

I dati mostravano un aumento di espressione di IRS-2 attivo nel gruppo pre-trattato con palmitato, già in condizioni basali (cioè in assenza di stimolazione con insulina) rispetto alle cellule di controllo. In entrambi i gruppi, le esposizioni acute con insulina non incrementavano significativamente la fosforilazione del substrato[Fig. 4].

Alla luce dei dati ottenuti al fine di studiare il segnale proliferativo abbiamo analizzato la via intracellulare di MAPK, in particolare la fosforilazione di ERK 44/42 e p38. Nelle cellule α -TC1 pre-trattate con palmitato, la fosforilazione basale (cioè in assenza di insulina) era significativamente più alta rispetto alle cellule non esposte al palmitato; la stimolazione acuta con insulina per 5 minuti determinava un leggero incremento dell'attivazione di ERK 44/42 (p-Erk 44/42) nel gruppo di controllo [Fig. 5]. Nelle cellule pre-trattate con il

palmitato, l'insulina a basse concentrazioni (10^{-10} , 10^{-9} M) aumentava la fosforilazione della proteina, mentre ad alte concentrazioni (10^{-8} M) la fosforilazione non aumentava ulteriormente.

Inoltre per studiare il mantenimento della risposta insulinica sulla fosforilazione di ERK 44/42, nonostante la resistenza del recettore insulinico mostrata precedentemente, abbiamo studiato la fosforilazione del recettore di IGF-1.

Gli esperimenti mostravano che, il basale delle cellule pre-trattate con palmitato presentava un'attivazione significativamente più alta rispetto alle cellule non trattate con palmitato; questa attivazione perdurava anche nelle cellule stimulate con insulina 10^{-10} M ed era in accordo con i dati osservati con pERK 44/42 [Fig. 6]. Abbiamo infine analizzato il segnale a valle di ERK 44/42 esaminando la fosforilazione di MAPKp38. L'attivazione di MAPKp38 risultava significativamente più alta nelle colture con palmitato rispetto alle cellule di controllo; in entrambi i gruppi le stimolazioni in acuto con insulina non determinavano un ulteriore incremento di P-p38 rispetto al basale [Fig. 6].

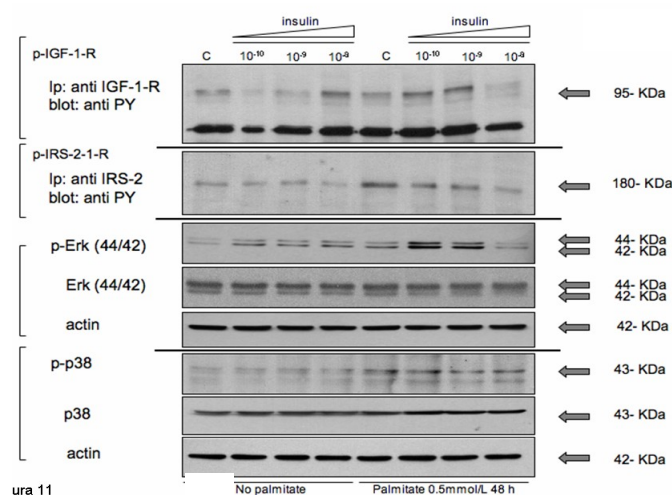


Figura 5. Immunoprecipitazione per IGF-1R-P, IRS-2-P e analisi Western blot per Erk 44-42-P, MAPK p38-P:

La figura mostra alcuni esperimenti rappresentativi per IGF-1R-P, IRS-2-P, Erk 44-42-P (con Erk 44/42 totale e actina), MAPK p38-P (con p38 MAPK totale e actina) basale e dopo stimolazione insulinica acuta da 10^{-10} a 10^{-8} M per 5 minuti

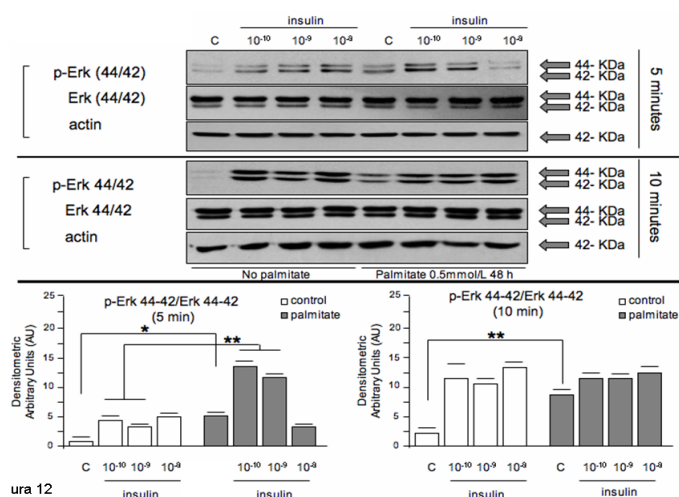


Figura 6: Analisi Western blot per Erk 44-42-P La figura mostra alcuni esperimenti rappresentativi per Erk 44-42-P (con Erk 44/42 totale e actina), esposti ad insulina per 5 e 10 minuti. Il pannello inferiore mostra media + ES di 5 differenti esperimenti.

Risulta ampiamente dimostrato e discusso come la via di MAPK rappresenti uno fra i sistemi in grado di regolare diversi fattori trascrizionali essenziali nello sviluppo ontogenetico di alcuni tra i principali organi, incluso il pancreas e le cellule pancreatiche; la regolazione di questi fattori di trascrizione passa attraverso il coinvolgimento di Pax6[35, 122]. Basandoci su osservazioni studiate in altri sistemi cellulari e considerando il ruolo chiave di Pax6 per la biosintesi del glucagone, abbiamo analizzato l'espressione di Pax6 tramite Real-Time PCR e Western blot al fine di studiare l'effetto di MAPK su questo fattore di trascrizione.

L'espressione del gene Pax6 era significativamente incrementata nelle cellule coltivate con palmitato rispetto al controllo [Fig. 7]; questi dati erano ulteriormente confermati a livello proteico [Fig. 7]. Poiché è noto che Pax6 rappresenti un fattore trascrizionale capace di regolare la trascrizione del gene del glucagone, abbiamo proseguito i nostri studi misurando i livelli di espressione genica e proteica del Glucagone. I livelli genici del pro-glucagone risultavano significativamente incrementati nelle cellule pre-trattate con

palmitato [Fig. 7]; questo dato era confermato anche a livello proteico nelle cellule pre-esposte a FFA [Fig. 7].

Per verificare se veramente MAPK fosse in grado di controllare Pax6, abbiamo utilizzato specifici inibitori di MEK al fine di bloccare la via di MAPK ed osservare le principali conseguenze. Abbiamo utilizzato come inibitore specifico della via di MAPK, U0126, in grado di inibire selettivamente MEK. Come atteso U0126 inibiva la fosforilazione sia di Erk 44/42 sia di p38 [Fig. 8]. Una volta dimostrata l'efficienza di tale inibitore abbiamo analizzato l'espressione proteica di Pax6 e Glucagone. I dati mostravano una riduzione dell'espressione di entrambe le proteine nelle cellule trattate con FFA [Fig. 8]. Per validare ulteriormente i dati abbiamo utilizzato un secondo inibitore delle MAPKs, PD98059, che ha confermato ulteriormente i dati ottenuti in precedenza. L'inibizione della fosforilazione di Erk 44/42 determinava una diminuzione della fosforilazione di p38 e della trascrizione della proteina del glucagone sia in condizioni basali sia sotto stimolazione con insulina [Fig. 9]. L'utilizzo degli inibitori U0126 e PD98059 non influenzava il segnale insulinico da IR-P/IRS-1P/AKT-P nè la vitalità cellulare.

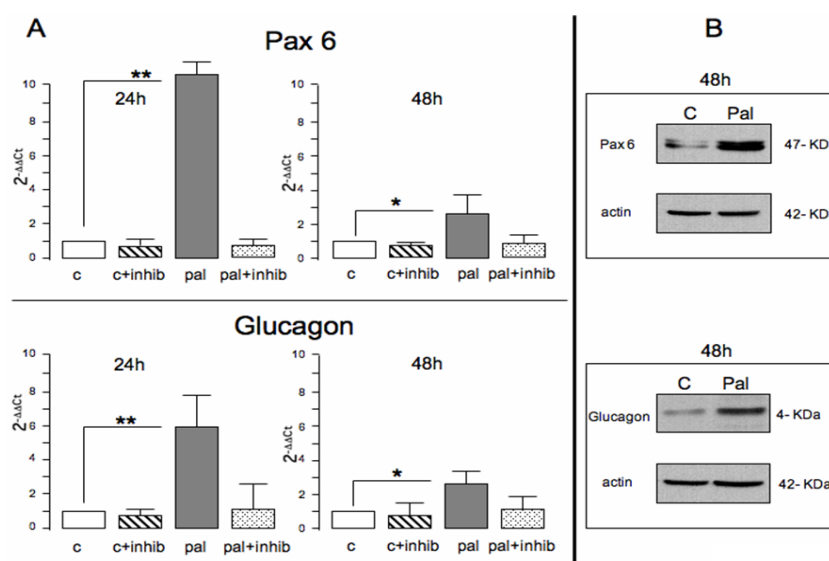


Figura 7. Analisi Real time per l'espressione genica di pax 6 e glucagone e Western blot per Pax 6 e per l'espressione della proteina Glucagone:

(A) I grafici mostrano media $\pm$ SE di 5 esperimenti diversi per l'espressione genica pax6 e glucagone dopo 24 (a sinistra) o 48 h (parte destra) di esposizione palmitato. "C" indica i gruppi coltivati in assenza di palmitato, "Pal" indica i gruppi cresciuti in presenza di palmitato 0,5 mmol / L per 24 o 48 h. "C + Inhib" e "+ pal Inhib" indicano i gruppi che hanno ricevuto inibitore di MEK (U0126) 25 μ mol / L, con o senza pre-esposizione a palmitato. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs controllo. (B) La figura mostra esperimenti rappresentativi per l'espressione della proteina di Pax 6 e glucagone nelle cellule di controllo e in cellule pre-esposte palmitato (48 h). La parte superiore mostra Pax 6 e l'espressione di actina in gruppi di controllo ed esposti a palmitato. La parte inferiore mostra l'espressione di glucagone e la normalizzazione per actina.

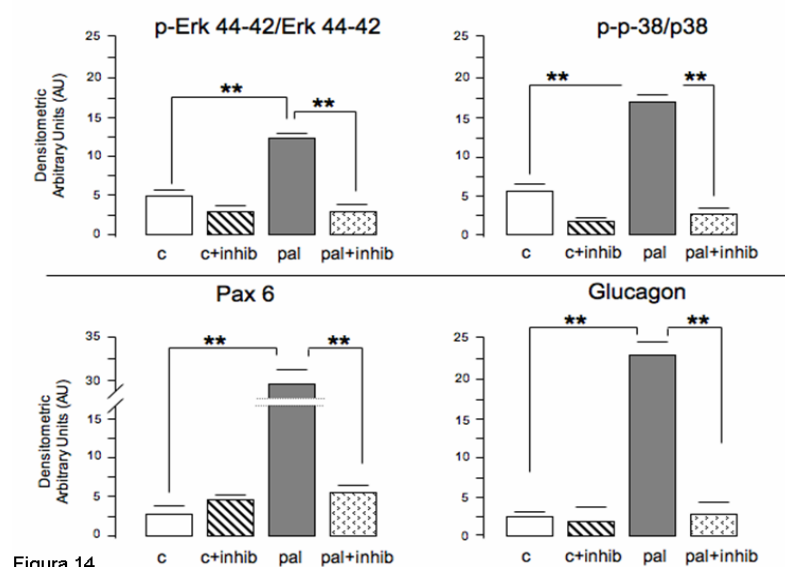


Figura 14

Figura 8. analisi Western blot per la fosforilazione di Erk 44/42, fosforilazione di MAPK p38, PAX 6 e l'espressione della proteina glucagone, prima e dopo il trattamento con l'inibitore MEK (U0126): Rappresentazione grafica per P-Erk 44/42, p38-P, Pax 6 e le espressioni della proteina glucagone, nelle cellule di controllo (c) e nelle cellule pre-esposte a palmitato (pal), in assenza o in presenza di inibitore U0126 (Inhib). I valori sono la media $\pm$ SE di 5 esperimenti differenti. ** $P < 0,01$.

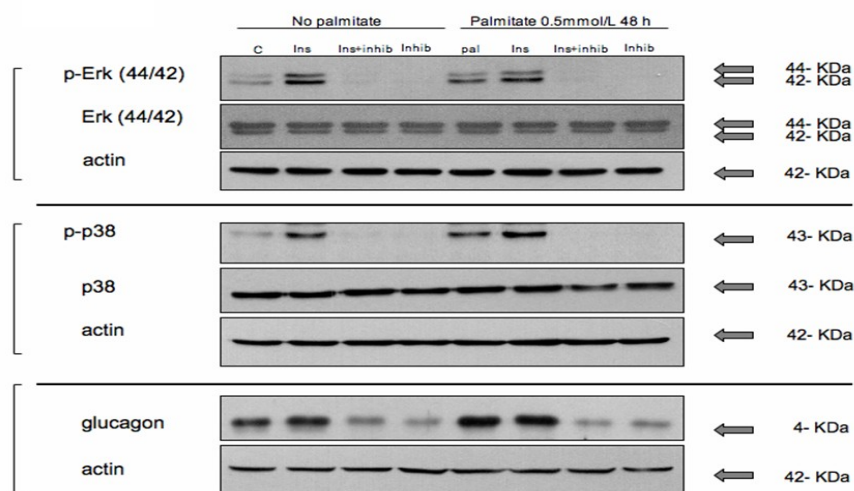


Figura 9. Analisi Western blot della fosforilazione di Erk 44/42, fosforilazione di MAPK p38 e l'espressione della proteina glucagone, prima e dopo il trattamento con l'inibitore PD 98059: La figura mostra alcuni esperimenti rappresentativi per P-Erk 44/42, p38-P, Pax 6 e le espressioni della proteina glucagone, in controllo (c) e nelle cellule pre-esposte a palmitato (pal), in assenza o in presenza di inibitore PD 98059 50 μ mol/L (inhib) ed in presenza o in assenza di insulina 10⁻⁹ M ("ins" and "ins+inhib"). I valori sono la media $\pm$ SE di 5 esperimenti differenti. ** P <0,01.

Discussioni

Lo scopo del nostro progetto è stato quello di studiare la secrezione di glucagone ed il segnale insulinico in una linea di alfa cellule pancreatiche murine, α -TC1, esposte cronicamente (48 h) ad alte concentrazioni di palmitato (0.5 mmol/L). Questo sistema *in vitro* ci ha permesso di mimare i processi che si instaurano in condizioni di lipotossicità, condizione generalmente presente nei pazienti affetti da malattia diabetica.

I nostri dati mostrano una maggiore secrezione di glucagone nelle cellule pre-esposte a palmitato rispetto alle condizioni basali ed inoltre è stato evidenziato una diminuzione dell'effetto inibitorio dell'insulina sulla secrezione di glucagone.

Lo studio è stato condotto analizzando, a partire dal recettore dell'insulina, la via metabolica e la via proliferativa del segnale insulinico intracellulare.

Sebbene vi sia un continuo dibattito sui fattori chiave che modulano la secrezione del glucagone è certo che gli ormoni secreti dai componenti dell'isola pancreatica, inclusa l'insulina, giocano un ruolo fondamentale[3].

L'attivazione del recettore insulinico, sulla superficie dell'alfa cellula, permette la fosforilazione e la conseguente attivazione di diversi substrati molecolari intracellulari. Nelle alfa cellule murine, l'insulina agisce determinando diversi processi che portano all'iperpolarizzazione di membrana nonché all'inibizione della secrezione di glucagone[123].

Pertanto, nelle alfa cellule pancreatiche l'attivazione della via di IR/IRS1/PI3K/AKT potrebbe condurre ad una iperpolarizzazione della membrana cellulare ed una riduzione della secrezione di glucagone [124]. È stato inoltre dimostrato in studi condotti su modelli di animali knock-out per il recettore insulinico sulla cellule alfa (α IRKO) che la mancanza del recettore insulinico è associato ad iperglucagonemia, intolleranza al glucosio, iperglicemia durante i pasti ed elevata secrezione di glucagone in risposta alla stimolazione con L-arginina, questo rappresenta un ulteriore supporto alla tesi per cui l'insulina ed il suo recettore regolano il rilascio del glucagone [124, 125]. Nel nostro modello, abbiamo dimostrato che l'esposizione a palmitato inibisce la fosforilazione di IR, IRS-1, PI3K e AKT e che questi effetti sono associati con un incremento della secrezione di glucagone. Abbiamo dunque ipotizzato che l'esposizione a palmitato sia in grado di indurre insulino-resistenza della via di IR, IRS-1, PI3K e AKT ed attraverso questo meccanismo potrebbe essere giustificabile anche l'incremento della secrezione di glucagone.

Questo studio risulta particolarmente interessante perché la stimolazione con palmitato nelle α -TC1 ha evidenziato un significativo aumento dell'attività della via intracellulare di

MAPK rispetto al controllo, anche in assenza di stimolazione insulinica. Questo potrebbe essere spiegato con l'attivazione del recettore dell'IGF-1 nelle cellule pre-trattate.

Inoltre in questo progetto abbiamo dimostrato che nelle colture pre-trattate con palmitato, sia Pax6, fattore trascrizionale coinvolto nel normale sviluppo del pancreas endocrino[126] ed implicato nello sviluppo delle alfa cellule [127, 128], sia il glucagone, risultano significativamente più espressi rispetto alle cellule di controllo.

In conclusione i nostri dati indicano che le α -TC1 clone 6 in condizioni di lipotossicità mostrano una marcata insulino-resistenza e presentato elevati livelli di secrezione di glucagone.

Nei pazienti con diabete mellito tipo 2 la concentrazione plasmatica di glucagone è impropriamente alta negli stati post-prandiali. Il funzionamento di questo meccanismo d'azione non è noto. Questi risultati supportano l'ipotesi che l'esposizione cronica ad acidi grassi potrebbe contribuire all'alterazione della regolazione del rilascio di glucagone.

"Ruolo delle citochine pro-infiammatorie nel diabete mellito e loro effetto su popolazioni di alfa cellule pancreatiche"

Spesso l'analisi di un sistema complesso (quale è il sistema cellula) comporta lo studio di un fenomeno globale, come ad esempio i meccanismi che portano all'apoptosi, e non i singoli *componenti* costituenti il modello studiato, ciò risulta essenziale per comprendere i meccanismi biologici sottostanti alle malattie complesse. In questo progetto abbiamo voluto valutare sperimentalmente il coinvolgimento del macchinario apoptotico (MA) nella patogenesi del Diabete Mellito (DM), in particolar modo il coinvolgimento da parte delle cellule alfa pancreatiche.

L'apoptosi rappresenta la forma dominante di morte delle β cellule in entrambe le forme di diabete, sia in modelli animali che umani. Le citochine proinfiammatorie, ed in particolare IL-1 β , sono considerate importanti effettori patogenetici responsabili dell'induzione dell'apoptosi delle β cellule [129], ma poco è noto sul loro ruolo a livello delle cellule alfa.

Sebbene risulta ancora controversa l'identificazione del ruolo delle citochine nel diabete, studi sui livelli della proteina C reattiva (CRP) [130], in grado di dare una misura dei *biomarker* infiammatori circolanti, hanno mostrato come in individui diabetici i livelli di CRP risultavano elevati rispetto ai soggetti sani. Inoltre livelli più elevati di marker infiammatori sono stati rilevati in individui apparentemente sani, che solo in seguito sviluppavano diabete [131-133]. Tali dati suggeriscono un coinvolgimento dei processi infiammatori nell'evolversi del diabete, in particolare, l'infiammazione si verifica precocemente durante il periodo di ridotta tolleranza al glucosio, ancor prima della diagnosi di diabete di tipo 2.

Risulta pertanto necessario riuscire ad identificare nuovi geni potenzialmente coinvolti nell'innescare del fenomeno patologico.

Tre principali citochine proinfiammatorie agiscono per indurre danneggiamento ed apoptosi cellulare: IL-1 β , TNF- α ed IFN- γ . IL-1 β secreta dai macrofagi ed in qualche circostanza dalle β cellule [134]. TNF α secreto dai macrofagi, IFN γ secreto dalle cellule T-helper. IL-1 β è la citochina più citotossica, sufficiente a causare l'inibizione cellulare e spesso sufficiente a promuoverne l'apoptosi. Per ottenere in vitro apoptosi cellulare viene generalmente usato un cocktail di IL-1 β , IFN γ e/o TNF α .

Abbiamo dunque analizzato la risposta cellulare, in alfa e beta cellule, all'azione infiammatoria delle citochine. In modo da poter identificare e confrontare la risposta delle cellule alfa rispetto alle beta ai processi infiammatori che si verificano in corso di diabete.

Le analisi del trascrittoma sono state effettuate attraverso approccio High Throughput (HT), in Real Time PCR, sfruttando una piattaforma TLDA® (TaqMan Low Density Array) (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) custom.

Negli ultimi anni, tale tecnica, grazie alla sua velocità e sensibilità è diventata il metodo più utilizzato per il profiling dei microRNA, piccole molecole endogene di RNA a singolo filamento non codificante (20-22 nucleotidi), la cui funzione principale attualmente nota è la regolazione post-trascrizionale e l'inibizione della traduzione di determinati RNA messaggeri (mRNA).

Variazioni anche molto piccole nei livelli di espressione, ad esempio quando si confrontano diversi stadi della malattia, potrebbero essere biologicamente significative.

Per identificare ciò abbiamo analizzato le variazioni trascrizionali che subiscono 92 geni *core* del MA nella linea cellulare murina α TC-1, confrontando il profilo di espressione con le

cellule β TC1 dopo esposizione ad un *cocktail* di citochine (IL-1Beta 50 U/ml, INT-gamma 1000 U/ml, TNF-alpha 1000 U/ml) per diversi tempi (24h; 48h; 72h).

Inoltre abbiamo analizzato il profilo globale dei microRNA dopo trattamento con citochine, questo ci ha permesso di identificare otto microRNA differenzialmente espressi (mmu-miR-146a, -149, -191*, -203, -296-3p, -298-5p, -411*, -700) nelle cellule alfa pancreatiche. In particolare due microRNA, miR-296-3p e miR-298-5p, risultavano specificatamente espressi nelle alfa cellule, ma non nelle beta cellule, e regolati negativamente dall'azione delle citochine.

Materiali e Metodi

- Colture cellulari e trattamento con cocktail di citochine

Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato due linee cellulari derivanti da α e β cellule di isole pancreatiche murine: le α TC1 clone 6 (cellule di glucagonoma) [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. 39:406-414 (1990)] e le β TC1 (cellule di insulinoma) [135]. Le cellule sono state coltivate in fiasche da 25 cm² in D-MEM addizionato con 10% di FBS (siero bovino fetale), 1% di Penicillina/Streptomicina, 1% di L-glutamina.

Dopo che le cellule sono andate in adesione, entrambi i fenotipi sono stati stimolati con un cocktail di citochine costituito da IL-1Beta (50 U/ml), INT-gamma (1000 U/ml), TNF-alpha (1000 U/ml) per diversi tempi (24h, 48h e 72h). In particolare ciascun *time point* (TP) ha previsto la presenza di un controllo (non trattato) ed un corrispondente campione stimolato per linea cellulare.

- Determinazione dell'apoptosi

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) [136]

- Disegno della TLDA® ed analisi dei dati

La TLDA® è stata disegnata per l'analisi in Real Time (RT-PCR) (mediante sonde TaqMan®) del trascrittoma di 96 geni murini, 92 dei quali geni core del MA ed i rimanenti 4 (Actb, Hprt, Tuba1a, 18S RNA) usati come possibili *housekeeping* (HK). Il formato specifico dell'array (Format 96A, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) ha consentito di effettuare contemporaneamente 96 saggi in Real Time per 4 campioni diversi. Pertanto in ciascuna TLDA® è stato analizzato il trascrittoma di 2 campioni trattati, insieme con i loro 2 rispettivi controlli. 3 (Actb, Hprt, Tuba1a) dei 4 putativi geni HK hanno mantenuta costante la loro espressione e pertanto sono stati usati come controlli (normalizzatori). Le variazioni di espressione dei campioni trattati rispetto ai relativi controlli sono state determinate attraverso quantificazione relativa, usando il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, con l'ausilio del software RQ Manager 1.2 software (AppliedBiosystem, Foster City, CA, USA) [137]. Sono stati considerati sovra- o sotto- espressi geni che variavano la loro espressione almeno 3 volte (verso l'alto o verso il basso rispettivamente) rispetto ai corrispettivi controlli.

- REAL-TIME PCR

L'RNA totale delle cellule α TC1 e β TC1 controllo e trattate è stato estratto attraverso l'utilizzo del kit commerciale TriZol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) secondo quanto

specificato nel protocollo dello stesso. Dopo 72 ore di trattamento è stata effettuata l'estrazione di RNA. 2,5 µg di RNA totale estratto da entrambe le linee cellulari per ciascun TP sono stati trattati con DNasi I Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per eliminare il DNA genomico. 2 µg di RNA trattato con DNasi sono stati quindi retro-trascritti usando il kit commerciale High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). L'RNA per l'analisi dell'espressione dei miR è stato retrotrascritto in cDNA attraverso l'utilizzo del "Megaplex™ PreAmpRodentPrimerPoolsets" per 519 miR specifici per il topo e 68 miR specifici per il ratto. 200 ng di cDNA di ogni singolo campione sono stati caricati su due corsie adiacenti (ciascuna delle quali permette l'amplificazione di 48 geni di interesse) della TLDA®. Il profilo termico della reazione di RT-PCR è stato il seguente: 50°C, 2'; 94.5°C, 10'; 40 cycles a 97°C, 30"; 50.7°C, 1'. La reazione è stata eseguita utilizzando il termoblocco per TLDA® della ABI PRISM 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). I dati di espressione delle 2 linee per tutti e 3 i TP sono stati clusterizzati attraverso il software Cluster 3.0 e visualizzati attraverso Java TreeView.

- Western blot

Le variazioni di espressione delle proteine ATF3, BNIP3 e NOS2 sono state valutate tramite analisi Western. In breve, dopo estrazione con RIPA Buffer, le proteine sono state quantificate allo spettrofotometro attraverso il saggio BCA. Masse equivalenti di lisato proteico dei trattati e dei rispettivi controlli sono dunque state caricate su gel di poliacrilammide (sistema Hoefer miniVE, Amersham Biosciences) a % variabili dal 7 al 12%, a seconda del peso molecolare (PM) della proteina da analizzare e trasferite mediante elettroblotting su membrana di nitrocellulosa (Amersham Pharmacia Biotech,

Buckinghamshire, UK). L'efficienza di trasferimento è stata valutata mediante colorazione di tale membrana con rosso Ponceau. Dopo essere state bloccate con blocking solutions per 1h a TA (Temperatura Ambiente), le membrane sono state incubate a 4°C per 16h con i relativi Ab diluiti. La proteina b-Actina è stata utilizzata come normalizzatore di massa. La densitometria è stata fatta utilizzando il software ImageJ.

- Analisi del trascrittoma del MA di cellule α e β pancreatiche di ratto a steady-state

I dati del trascrittoma delle cellule α e β di ratto a steady-state ottenuti da analisi microarrays sono stati scaricati da NCBI-GEO [138, 139]. I geni differenzialmente espressi nei due tipi cellulari sono stati selezionati dopo t-test tra campioni. I geni stabiliti essere significativamente differenzialmente espressi sono stati filtrati al fine di selezionare tra questi solamente i geni del MA. A questo punto è stato calcolato il Log_{10} del rapporto della media dei valori di espressione del gruppo B rispetto a quella del gruppo A. Il cut-off al di sopra ed al di sotto del quale un gene è stato considerato rispettivamente sovra e sotto-espresso è stato stabilito in 0,175 (equivalente ad $\text{FC}=1,5$). I geni con valori compresi tra +0,175 e -0,175 sono stati considerati non significativamente variati nella loro espressione [140]. Per l'analisi statistica e la visualizzazione dei dati microarray ci si è serviti del software MeV4.2.

- Meta-analisi dei geni del MA in topo, uomo e ratto

I dati riguardanti la posizione genomica, l'informazioni sulla funzione (e.g.: funzione pro-od anti-apoptotica) e la presenza di una nota associazione con T1DM o T2DM, dei geni murini e dei loro ortologhi umani e di ratto del MA da noi analizzati, sono stati ricavati dai database T1DBase [141, 142].

Tramite il software Caryoscope MA è stata visualizzata la sovrapposizione tra regioni genomiche note per essere associate alle due forme di DM.

- Analisi delle pathways alterate

Per ciascun candidato trascrizionale sono state ricavate le pathways potenzialmente coinvolte attraverso interrogazione del DB InnateDB [Lynn DJ, Winsor GL, Chan C, Richard N, Laird MR, Barsky A et al. InnateDB: facilitating systems-level analyses of the mammalian innate immune response. Mol Syst Biol.4:218 (2008).]. La lista di pathways ottenuta è stata sottoposta ad analisi di sovra rappresentazione delle pathways (ORA - Pathway Over-Representation Analysis) attraverso algoritmo ipergeometrico e metodo di correzione di Benjamini-Hochberg.

- Identificazione in silico dei siti di legame (TFBSs) di fattori di trascrizione

Le regioni genomiche conservate (70% di identità, in almeno 100 bp) tra Homo sapiens e Mus musculus in una finestra di 10 Kbp (5 Kbp a monte e 5 Kbp a valle del sito di inizio della trascrizione o TSS) contenenti segnali TFBSs ed i rispettivi fattori di trascrizione (TF) sono stati ricavati per ciascuno dei candidati trascrizionali dal DB ECRbase.

- Costruzione della network

La posizione dei candidati trascrizionali e dei TF predetti regolare l'espressione all'interno dell'interattoma umano e di topo è stata determinata a partire dalle informazioni contenute nel DB di interattomica IntAct. I microRNA di topo predetti avere come bersaglio i candidati trascrizionali sono stati ricavati dal DB miRNAmap 2.0 e filtrati secondo i seguenti parametri: (i) tutti e tre i tools predittivi integrati nel DB (miRanda,

RNAhybrid, TargetScan) dovevano essere concordi nella predizione microRNA-target; (ii) i microRNA predetti dovevano possedere siti multipli di legame all'interno di regioni accessibili del 3'UTR dell'mRNA bersaglio. Il DB miRecords è stato interrogato per ricavare i microRNA murini validati sperimentalmente avere geni del MA come target. La network costituita dai candidati trascrizionali, dai TFs predetti e dai microRNAs validati sperimentalmente e predetti è stata visualizzata tramite Cytoscape 2.6.1.

- Gene ontology

Le ontologie (in particolare le funzioni biologiche) dei geni (GO) le cui proteine sono rappresentate nella network sono state ricavate dall'utilizzo di SigTerms (un algoritmo di arricchimento di termini ontologici) (<http://sigterms.sourceforge.net/>) e del DB DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). In entrambi i casi multipli metodi di correzione statistica (Benjamini, Bonferroni, FDR) sono stati applicati per valutare la significatività dell'arricchimento dei termini GO ($p < 0,001$).

Risultati

Analisi del trascrittoma:

In seguito all'analisi dei dati RT-PCR con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sono stati identificati 33 geni candidati trascrizionali (circa il 36% dei 92 geni del MA analizzati) la cui espressione variava in almeno un TP in una od in entrambe le linee cellulari in seguito ad esposizione con citochine (Fig.1) [Tabella 1].

I risultati dell'analisi del trascrittoma possono essere riassunti in 2 punti fondamentali: 1) Variazioni di geni pro- od anti-apoptotici comuni ad entrambi i fenotipi nell'intero TC; 2)

Variazione di geni pro- od anti- apoptotici comuni ad entrambi i fenotipi in singoli specifici TP;

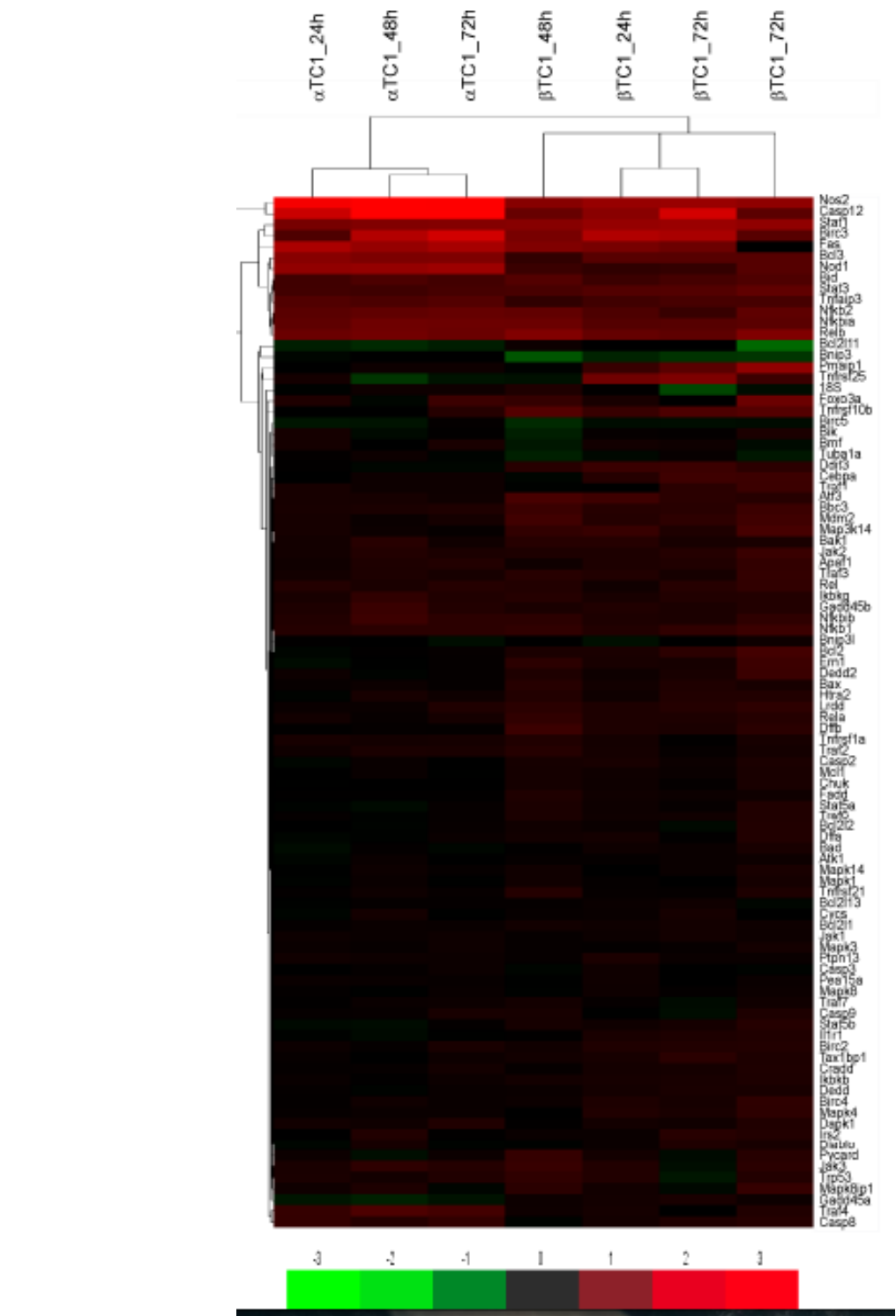


Figura 1: Variazione del trascrittoma dei geni core del MA in alfa e beta cellule dopo differenti tempi di esposizione a citochine;

Gene	Function	PubMed IDs
18S RNA	Cell Growth Marker	
Atf3	Pro	18057093
Bbc3	Pro	17896961
Bcl2	Anti	18313386
Bcl2l1	Pro	15452118
Bcl3	Anti	16732314
Bid	Pro	11375329
Birc3	Anti	19343319
Bnip3	Pro	18092960
Casp12	Pro	12031969
Cebpa	Pro	19168033
Ddit3	Pro	18776938
Dffb	Pro	18178165
Fas	Pro	19239902
Jak3	Pro	18793127
Map3k14	Pro	15084608
Mdm2	Pro	18802403
Nfkb1	Pro	18481952
Nfkb2	Pro	18481952
Nfkbia	Anti	18481952
Nod1	Pro	10224040
Nos2	Pro	18217711
Rela	Pro	18481952
Relb	Pro	18481952
Stat1	Pro	17620422
Stat3	Anti	12949733
Tnfaip3	Anti	16936197
Tnfrsf10b	Pro	15173180, 17172650
Ikbkg	Anti	15528996
Traf4	Pro	12788948
Nfkbib	Anti	18481952
Gadd45b	Anti	16528573, 17659913
Casp8	Pro	17563067

Tabella 1: Classificazione dei geni candidati

Variazioni di geni pro- od anti- apoptotici comuni ad entrambi i fenotipi nell'intero TC

L'analisi dei dati ottenuti ha rilevato un core di tre geni pro- (Bid, Relb, Stat1) e tre anti- (Nfkbia, Stat3, Tnfaip3) apoptotici che è risultato over-espresso in entrambi i tipi cellulari per l'intero time course (TC). Tre geni (Casp12, Fas, Nos2) venivano attivati in entrambi i fenotipi per l'intero TC (geni generalmente considerati pro apoptotici). Infine, due geni potenzialmente pro apoptotici, Nfkb2 e Nod1, erano up regolati in entrambe le linee cellulari per l'intero TC [Fig.2].

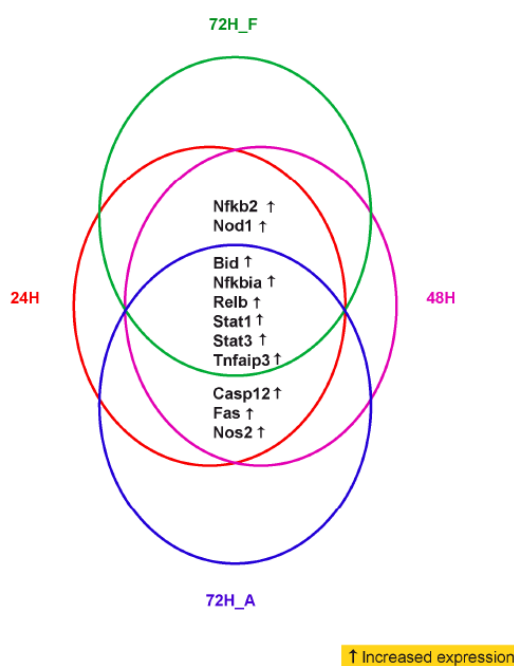


Figura 2: Geni attivi comunemente in alfa e beta cellule;

Variazioni di geni pro- o anti- del MA comuni ad entrambi i fenotipi in singoli specifici TP

A 24h di esposizione 8 geni pro- (Bid, Casp12, Fas, Nfkb2, Nod1, Nos2, Relb, Stat1) e 3 anti- (Nfkbia, Relb, Tnfaip3) apoptotici erano up-regolati in entrambi i fenotipi cellulari. Alle 48h 8 geni pro- (Bid, Casp12, Fas, Nfkb2, Nod1, Nos2, Relb, Stat1) e 4 anti- (Birc3, Nfkbia, Stat3, Tnfaip3) apoptotici aumentavano la loro espressione in entrambi i fenotipi cellulari. Alle 72h le α TC1 e le β TC1 condividevano 6 geni pro- (Bid, Casp12, Fas, Nos2, Relb, Stat1) e 4 anti- (Birc3, Nfkbia, Stat3, Tnfaip3) apoptotici attivati. Infine, comparando il trascrittoma delle α TC1 e delle β TC1 a 72h, 5 geni pro- (Bid, Nfkb2, Nod1, Relb, Stat1) e 3 anti- (Nfkbia, Stat3, Tnfaip3) apoptotici erano sovra-espressi in entrambe le linee cellulari.

Analisi dell'alterazione delle pathway:

Abbiamo considerato un pathway come potenzialmente alterato se almeno tre suoi geni risultavano sovra- o sotto- espressi in ogni TP. Sulla base di ciò un totale di sei differenti sotto pathways apoptotiche risultavano potenzialmente affette in entrambe le linee cellulari almeno in un TP dopo trattamento con citochine [Tabella 2].

αTC1_24h	αTC1_48h	αTC1_72h	
Apoptosis	Adipocytokine signaling pathway	Apoptosis	
MAPK signaling pathway	Apoptosis	MAPK signaling pathway	
NF-kB signaling	MAPK signaling pathway	NF-kB signaling	
P53 signaling pathway	NF-kB signaling	P53 signaling pathway	
Toll-like receptor signaling pathway	P53 signaling pathway	Toll-like receptor signaling pathway	
	Toll-like receptor signaling pathway		
βTC1_24h	βTC1_48h	βTC1_72hA	βTC1_72hD
Apoptosis	Adipocytokine signaling pathway	Apoptosis	Apoptosis
MAPK signaling pathway	Apoptosis	MAPK signaling pathway	NF-kB signaling
NF-kB signaling	Jak-STAT signaling pathway		
	MAPK signaling pathway		
	NF-kB signaling		
	P53 signaling pathway		
	Toll-like receptor signaling pathway		

Tabella 2: Pathways potenzialmente coinvolte.

L'analisi dell'intero TC, dei due fenotipi cellulari, ha mostrato nelle α TC1 un core di 5 pathways (Apoptosi, MAPK signaling pathway, NFkB signaling, P53 signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway) costantemente affetto durante tutti i TP mentre solo il pathway generale dell'Apoptosi (senza un sub pathway specificamente individuato) era comunemente alterato durante l'intero TC delle β TC1. Un confronto fra le due linee cellulari per singolo TP ha mostrato che 2 pathways (MAPK signaling pathway, NF-kB signalling) erano comunemente alterate durante le prime 24h, 5 pathways (Adipocytokine

signaling pathway, MAPK signaling pathway, NF-kB signalling, P53 signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway) dopo 48h di esposizione, mentre MAPK signaling pathway ed NF-kB signalling dopo 72h. Le pathways P53 signaling e Toll-like receptor signaling erano specificamente alterate nelle α TC1 dopo 24 ore di trattamento. 3 pathways (NF-kB signalling, P53 signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway) erano specificamente alterati nella popolazione α TC1 a 72 ore se comparata con la popolazione β TC1 72h. Infine i pathways MAPK signaling, P53 signaling e Toll-like receptor signaling sembravano essere specifici della popolazione α TC1 72 h se confrontata con la popolazione β TC1 72h. [Fig. 3 - 4]

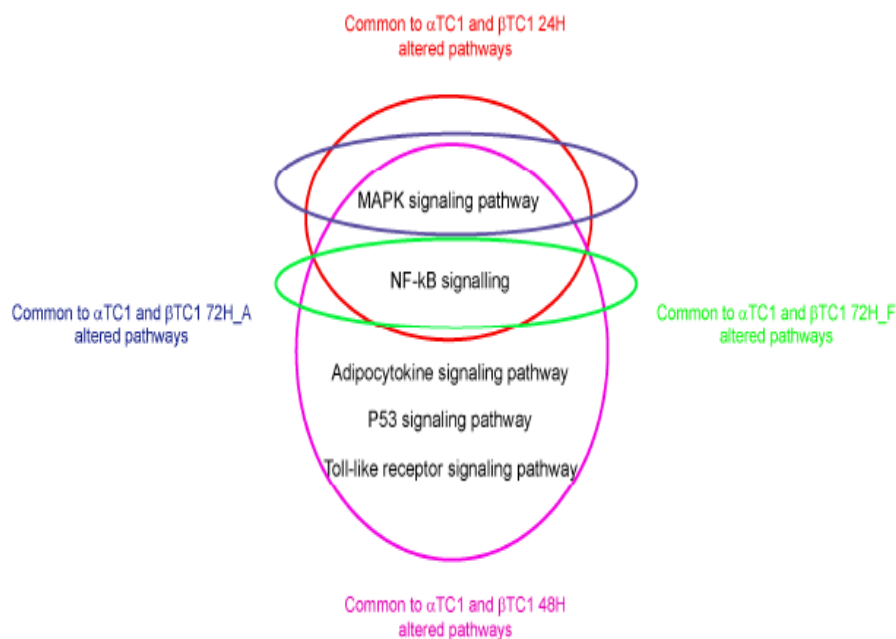


Figura 3. Pathways comunemente indotte nelle aTC1 e nelle bTC1. Le 2 pathways comunemente alterate nei due fenotipi a 24h sono cerchiare in rosso; le 5 pathways comuni dopo 48h di esposizione sono cerchiare in rosa; l'unico pathway comune alle aTC1 e bTC1 (sottopopolazione a 72h in adesione) è cerchiato in blu; l'unico pathway comunemente alterato nelle aTC1 e bTC1 (sottopopolazione in sospensione) è cerchiato in verde.

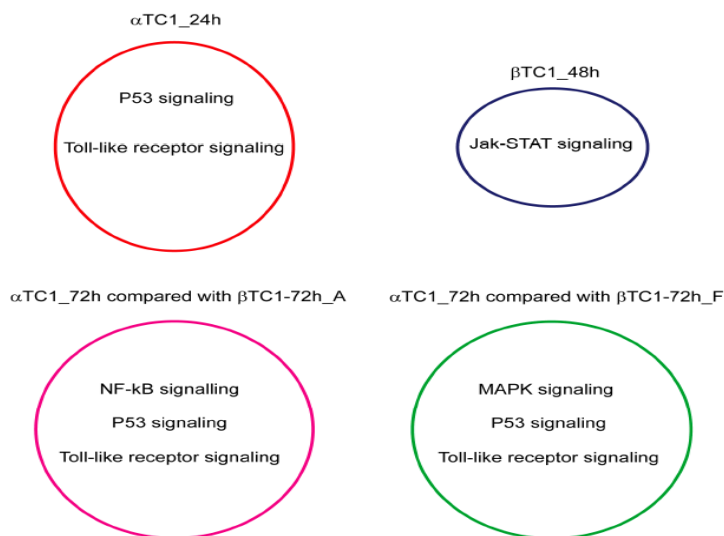


Figura 4. Le pathways specificamente attivate nelle aTC1. Le pathways specificamente attivate nelle aTC1 dopo 24h di esposizione al cocktail di citochine sono cerchiato in rosso; l'unico pathway indotto bTC1 dopo 48h è cerchiato in blu; le 3 pathways specificamente attivate nelle aTC1 (se confrontate con le bTC1, popolazione in adesione) a 72h sono cerchiato in rosa; le 3 pathways specificamente attivate nelle aTC1 (se confrontate con le bTC1, popolazione in sospensione) a 72h sono cerchiato in verde.

Analisi del profilo dei microRNA in α TC1-6 e β TC1

Nelle cellule α TC1-6 di controllo 23 miR risultavano espressi esclusivamente (α -miRs), mentre 26 erano espressi a livello delle cellule β TC1 (β -miRs); 50 miR risultavano significativamente più espressi nelle cellule α TC1-6 rispetto alle β TC1 mentre 74 erano maggiormente espressi nelle cellule β TC1. In seguito a trattamento con citochine, 22 e 15 miR erano significativamente espressi rispettivamente nelle cellule α TC1-6 e β TC1 (≤ 0.05) (Tables 2, 3). Per caratterizzare maggiormente quei miR coinvolti nella differente risposta alle citochine da parte delle cellule α o β , abbiamo focalizzato la nostra attenzione su due miR, miR-296-3p e miR-298-5p. Entrambi questi miR sono espressi esclusivamente nelle cellule alfa di controllo e risultano significativamente alterati dopo trattamento con citochine.

miR	FC α TC1-6 Cyt vs α TC1-6 Ctrl 24H	p-value	FC α TC1-6 Cyt vs α TC1-6 Ctrl 48H	p-value
mmu-let-7a*	-1.56	9.93E-01	-3.09	1.31E-01
mmu-miR-125b-5p	2.53	9.75E-01	2.79	1.51E-01
mmu-miR-130b*	-1.49	9.93E-01	-2.01	1.31E-01
mmu-miR-134	-2.10	9.75E-01	-2.02	3.33E-01
mmu-miR-142-3p	5.02	9.75E-01	2.61	6.68E-01
mmu-miR-146a	8.18	1.88E-01	14.90	5.22E-03
mmu-miR-149	-1.91	9.93E-01	-3.68	6.63E-02
mmu-miR-155	2.34	9.75E-01	2.35	3.08E-01
mmu-miR-15b*	-1.36	9.93E-01	-1.71	3.09E-01
mmu-miR-190	-2.58	9.75E-01	-1.25	6.32E-01
mmu-miR-191*	-2.25	9.93E-01	-3.07	6.63E-02
mmu-miR-203	3.92	1.88E-01	6.03	3.53E-02
mmu-miR-21	1.12	9.75E-01	2.02	1.51E-01
mmu-miR-296-3p	-4.63	9.75E-01	-4.76	8.48E-02
mmu-miR-298-5p	-2.19	9.75E-01	-7.50	4.36E-02
mmu-miR-34a	2.02	9.75E-01	2.29	3.11E-01
mmu-miR-361	-1.12	9.75E-01	-2.46	1.51E-01
mmu-miR-369-5p	-1.45	9.75E-01	-2.14	2.87E-01
mmu-miR-409-3p	-1.43	9.75E-01	-2.23	1.51E-01
mmu-miR-411*	-2.88	9.93E-01	-3.44	6.63E-02
mmu-miR-494	-1.01	9.98E-01	-2.01	1.78E-01
mmu-miR-700	-2.03	9.93E-01	-2.64	6.63E-02

Tabella 2. miRs in α TC1-6 dopo 24 e 48 h di trattamento con citochine, in grassetto i *Fold Changes* (FC) e i relativi p-values ≤ 0.05 (Limma Test).

miR	FC β TC1 Cyt vs β TC1 Ctrl 24H	p-value	FC β TC1 Cyt vs β TC1 Ctrl 48H	p-value
mmu-let-7a*	-1.81	5.58E-01	-8.30	1.58E-01
mmu-miR-106b*	-1.09	8.31E-01	-6.10	5.45E-01
mmu-miR-146a	4.09	8.23E-01	12.46	7.32E-01
mmu-miR-149	-2.85	5.58E-01	-8.94	1.58E-01
mmu-miR-15b*	-1.19	8.31E-01	-6.19	5.45E-01
mmu-miR-203	2.70	4.86E-01	1.66	7.38E-01
mmu-miR-216a	-6.40	8.67E-01	-106.15	7.32E-01
mmu-miR-216b	-5.08	8.65E-01	-178.02	7.32E-01
mmu-miR-22	1.83	7.06E-01	-1.03	9.64E-01
mmu-miR-325	-1.90	9.30E-01	-1.66	7.32E-01
mmu-miR-547	2.00	8.23E-01	-1.15	9.75E-01
mmu-miR-678	2.10	5.58E-01	1.31	9.36E-01
mmu-miR-709	2.04	5.58E-01	3.48	5.45E-01
mmu-miR-804	2.80	5.58E-01	3.65	5.45E-01
mmu-miR-872*	1.01	8.68E-01	-2.74	5.45E-01

Tabella 3. miRs in β TC1 dopo 24 e 48 h di trattamento con citochine, in grassetto i *Fold Changes* (FC) e i relativi p-values ≤ 0.05 (Limma Test).

Discussioni

Il disegno sperimentale ha previsto per entrambe le popolazioni cellulari, α TC1 clone 6 e β TC1, un tempo di adesione ed accrescimento di 24h, ed una successiva stimolazione con *cocktail* di citochine pro-infiammatorie (IL-1Beta 50 U/ml, INT-gamma 1000 U/ml, TNF-alpha 1000 U/ml) per diversi tempi (24h, 48h, 72h). In seguito abbiamo proseguito gli esperimenti, al fine di osservare l'effetto dell'esposizione sui processi apoptotici, analizzando i livelli di espressione genica, mediante real-time effettuata con *fluidic cards*.

L'analisi dell'espressione genica mediante real-time, ha permesso di analizzare 96 geni scelti tra quelli implicati nel macchinario apoptotico, tali esperimenti hanno messo in evidenza un pattern di espressione genico molto differente nelle due popolazioni cellulari, α TC1 e β TC1 [Fig.1].

I dati ottenuti dall'analisi del trascrittoma (relativamente ai geni del MA) e delle variazioni attraverso l'analisi in silico dei sub *pathways* apoptotici potenzialmente alterati, unitamente alla costruzione della *network* regolatoria (comprendente TFs e microRNAs) dei candidati ottenuti sperimentalmente, ci ha permesso di identificare nuovi geni potenzialmente coinvolti nell'innescare del fenomeno patologico. Tali nuovi candidati sono di particolare interesse poichè risiedono a monte dei due pathways (NFkB e Jak/Stat) fin'ora considerati come principali responsabili dell'apoptosi delle β cellule soggette cronicamente ad esposizione con citochine pro-infiammatorie. Tali dati hanno per la prima volta descritto l'assetto molecolare del MA nelle α cellule pancreatiche dopo loro stimolazione con il cocktail di citochine pro-infiammatorie e gettato le basi per una migliore comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della morte cellulare in tali cellule.

Questi studi hanno rappresentato il punto di partenza per l'analisi dell'intero profilo dei microRNA potenzialmente implicati nei processi di risposta cellulare al danno causato da citochine.

L'utilizzo di tecnologie *high throughput* (HT) in studi di BioMedicina dei Sistemi è sicuramente un punto di partenza essenziale per cercare di comprendere le basi molecolari delle malattie complesse. Lo sviluppo di piattaforme tecnologiche innovative per analisi *High Throughput* ci permette di acquisire migliori conoscenze della biologia delle cellule alfa pancreatiche, al fine di individuare possibili applicazioni nei trattamenti più efficaci per la cura del diabete. In particolare questo progetto ha evidenziato la maggiore resistenza della alfa cellula alle condizioni avverse causate, ad esempio, dall'azione delle citochine proinfiammatorie. Questo conferisce all'alfa cellula un ruolo di primaria importanza nella scelta dei trattamenti farmacologici come principale target terapeutico, questo perchè in grado di sopperire al meglio all'azione, a volte "aggressiva", dei farmaci utilizzati.

La maggior parte degli sforzi nel campo della ricerca sono stati fatti per scoprire nuove regioni cromosomiche o polimorfismi genici associati a varie malattie, principalmente il cancro. Uno degli obiettivi finali di questo progetto è stato quindi quello di identificare l'analisi il genotipo, di differenti pazienti diabetici e dei loci, al fine di riconoscere i potenziali candidati. Inoltre questi dati hanno permesso l'identificazione di due miR, miR-296-3p e miR-298-5p, come potenziali componenti dei processi molecolari che conferiscono maggiore resistenza alle citochine da parte delle cellule alfa rispetto alle beta. Questo lavoro non solo permetterà di trovare nuovi geni candidati associati al diabete, ma anche di riclassificare le malattie sulla base del genoma personalizzato.

Questo sistema *in vitro* ci ha permesso di mimare in particolare le fasi che portano all'insulite, stato infiammatorio transitorio o cronico delle isole del Langerhans che, con il passare del tempo (più o meno rapido a seconda che si innescino o no fenomeni di autoimmunità), conduce alla morte delle β cellule e, quindi, al Diabete [143]. Circa il 36% (33/92) dei 92 geni del MA analizzati hanno mostrato una significativa variazione nella loro espressione (> 3 volte) rispetto ai controlli non trattati. In questo progetto abbiamo dunque messo in luce per la prima volta le basi molecolari della maggiore resistenza ad apoptosi indotta da citochine nelle α rispetto alle β cellule di pancreas e puntano l'attenzione sull'individuazione di nuovi geni candidati per successivi studi di associazione con la malattia.

" Silenziamento di IR: analisi comparativa del ruolo dell'insulin-like growth factor 1 receptor nel segnale insulinico intracellulare"

La trasmissione del segnale insulinico all'interno della cellula rappresenta un processo complesso e potenzialmente suscettibile di numerose interferenze.

L'insulina porta con se un messaggio biologico che può essere espresso in modo differente da soggetto a soggetto, in relazione con alcune caratteristiche cliniche che modificano l'efficienza con cui il messaggio viene decodificato, dapprima dal recettore insulinico (IR) e di seguito dal sistema di trasduzione del segnale [144].

Il legame dell'insulina al suo recettore attiva una serie di meccanismi atti alla trasduzione del segnale intracellulare; tra questi si ha l'attivazione della tirosin-chinasi intrinseca alla molecola recettoriale che determina la fosforilazione della proteina IRS1, quando fosforilata IRS1 permette il legame da parte della subunità regolatoria della PI3K (fosfatidilinositolo 3 kinasi) inducendo la trasformazione in PI3P (fosfatidilinositolo 3 fosfato). Quest'ultimo rappresenta un'ulteriore segnale biochimico che induce l'attivazione di un'altra proteina, AKT; questa proteina attivata attraverso una serie di segnali induce la iperpolarizzazione della membrana cellulare e la conseguente inibizione della secrezione di Glucagone nelle alfa cellule pancreatiche. Questo fenomeno si verifica in pochi minuti in seguito allo stimolo insulinico.

La trasmissione del messaggio biologico a livello cellulare rappresenta un sistema complesso che coinvolge, oltre a quelli descritti, un gran numero di fattori; risulta dunque evidente la complessità di tale sistema che peraltro dipende anche da molteplici meccanismi di regolazione che, se da una parte permettono il normale mantenimento

fisiologico della cellula, dall'altro possono rappresentare l'anello debole della catena, poichè potrebbero causare alterazioni in grado di compromettere l'azione ormonale generando così insulino-resistenza, condizione tipica dei pazienti affetti da diabete.

Risulta quindi necessario, al fine di poter individuare possibili nuove strategie terapeutiche, identificare dapprima i meccanismi di riparazione, insiti nel sistema cellulare, capaci di sopperire al difetto cellulare, in modo da identificare possibili target terapeutici.

In questo progetto abbiamo voluto valutare, in due differenti linee cellulari, α TC1-6 (provenienti da glucagonoma di topo) e InR1G9 (provenienti da glucagonoma di criceto), la capacità da parte delle cellule alfa di sopperire all'inefficienza del recettore insulinico, attivando vie alternative.

Il recettore insulinico insieme al recettore per l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1R) e 2 (IGF2R), ai recettori ibridi (formato da una subunità α - β di InsR e una subunità α - β di IGF-1R, HybridR), ed ai relativi ligandi appartiene alla famiglia delle IGF (Insulin-like Growth Factor) (Fig. 1).

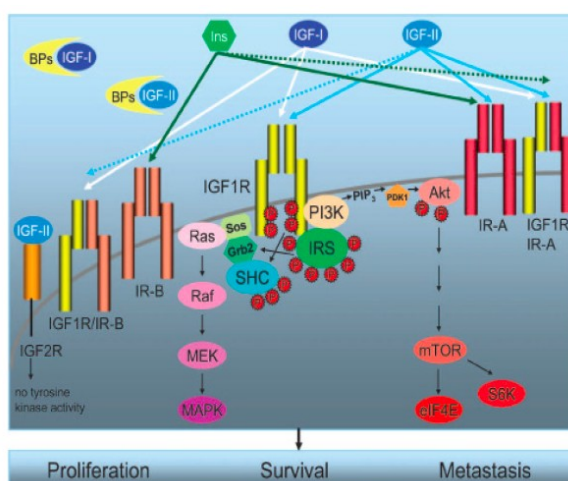


Figura 1: Famiglia delle IGF. Insulina, IGF-I e IGF-II interagiscono con diversa affinità con i recettori IR, IGF-1R e HybridRs attivandone la cascata di trasduzione del segnale. [145]

La maggior parte degli studi attribuiscono ad IGF-1R un ruolo fondamentale nella crescita tissutale e nello sviluppo [146], mentre conferiscono all'attivazione di IR da parte dell'insulina un ruolo nel controllo dell'omeostasi del glucosio. Dati ottenuti con tecniche di delezione gene specifica evidenziano come in realtà ci sia una parziale sovrapposizione tra le funzioni dei due recettori, con IR capace di stimolare la proliferazione [147] e IGF-1R in grado di regolare la risposta metabolica [148], inoltre tali studi mostrano come sia necessaria la corretta espressione di entrambi i recettori per avere una corretta regolazione di numerosi processi biologici, quali proliferazione, migrazione, apoptosi nonché il metabolismo.

Per tale motivo abbiamo analizzato il ruolo di IGF1R nella trasduzione del segnale insulinico in seguito a silenziamento dell'IR.

Nello specifico abbiamo dimostrato il coinvolgimento dell'IGF1R nella trasduzione del segnale intracellulare dell'insulina, nonché nella secrezione di glucagone, quando il recettore insulinico risultava compromesso.

Materiali e metodi

- **Modelli cellulari**

Le cellule α TC-1, acquistate dall'American Type Culture Collection (ATCC), provengono da glucagonoma di topo capaci di produrre solo glucagone e non insulina.

Le α TC1 sono state coltivate a 37°C con il 5% di CO² in mezzo D-MEM (SIGMA aldrich), supplementato con 10% FBS, albumina, 2% Glutamina, 1% aminoacidi non essenziali, antibiotici, penicillina e streptomina, all'1%.

Le cellule di criceto, InR1G9 [149], sono state cresciute in terreno RPMI 1640 (R-6504, Sigma, Basel, CH) supplementate con il 5% di siero bovino fetale, 5% di siero di vitello neonato, , 2% glutammina, 100 unità/ml di penicillina e 100 μ g/ml di streptomicina.

Le cellule sono state tripsinizzate due volte la settimana.

- Silenziamento genico

Dopo un primo periodo di crescita di 24 ore, al fine di raggiungere una confluenza pari al 50%, le cellule sono state trattate per il silenziamento genico. Dapprima abbiamo sostituito il mezzo di coltura utilizzando terreno OPTI-MEM, necessario per il silenziamento.

Abbiamo dunque preparato la miscela di siRNA (small interfering RNA) e lipofectamina ed incubato a temperatura ambiente per 20 minuti, al fine di permettere la formazione del complesso lipofectamia/siRNA. Al termine dei 20 minuti il terreno è stato supplementato con la miscela e le cellule sono state incubate per 12-14 ore a 37°C con il 5% di CO². Al termine della transfezione abbiamo cambiato il mezzo e proseguito con le relative stimolazioni, necessarie per i diversi esperimenti.

- Preparazione dei lisati proteici cellulari

Dopo il periodo di trattamento le cellule sono state lavate due volte con PBS (pH 7.4), incubate con terreno (privo di FBS) per 24h e successivamente sono state trattate in base agli esperimenti da condurre. La stimolazione è stata bloccata con tre lavaggi in PBS freddo (pH 7.4), il liquido in eccesso è stato aspirato ed aggiunto Buffer di lisi freddo (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxycholate, 0,1 % Di sodio dodecil solfato (SDS), 50 mM Tris (pH 7,4), 10 mM sodio pirofosfato, 100 mM NAF, 2 mM PMSF, 2 mM vanadato di sodio, 1 mg di pepstatin per ml, 1 mg di aprotinina per ml, 1 mg di leupeptin per ml). Dopo la lisi, i

campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 4 °C, al termine del quale il materiale insolubile è stato separato dal materiale solubile. La concentrazione di proteine è stata quantificata tramite BCA (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA).

- Western blot

I Western blots sono stati effettuati come descritto precedentemente [119].

Brevemente, dopo normalizzazione con BCA, le proteine sono state eluite in gel di acrilamide, trasferite su membrane di nitrocellulosa ed una volta incubate con specifici anticorpi rilevate con metodo ECL. Per la normalizzazione dei lisati, le membrane di nitrocellulosa sono state trattate con Restore stripping buffer (Pierce) per 10 minuti a temperatura ambiente e successivamente incubate con anticorpo anti-actina monoclonale o, in alcuni casi, con gli anticorpi delle rispettive proteine non fosforilate.

- Secrezione di Glucagone e GLP1

Dopo silenziamento genico le cellule sono state incubate per 2 ore in Krebs-Ringer (KRB) buffer contenente 16.7mmol/L di glucosio e 0.5% di BSA a pH 7.4 in presenza o in assenza di insulina (10^{-9} M).

Il surnatante è stato aliquotato in provette contenenti aprotinina (0.1 mg/ml) e conservato a -20°C fino al dosaggio degli ormoni, glucagone e GLP-1, effettuati tramite metodica RIA (radioimmunoassay) (Millipore, Millipore Corporation, Billerica, MA) ed ELISA rispettivamente.

- Metodica RIA

La metodica RIA è stata effettuata incubando i campioni con anticorpo specifico per 20-24 ore a 4°C, al termine dell'incubazione in ogni tubo è stata inserita una concentrazione fissa di antigene tracciante marcato e nuovamente incubato per 22-24 ore a 4°C. Trascorse le quali, in seguito all'aggiunta dell'agente precipitante, i campioni sono stati centrifugati a 4°C per 20 minuti a 2000-3000xg ed il risultante *pellet* è stato lasciato decantare al fine di eliminare ogni possibile traccia di antigene marcato residuo. Per ogni esperimento condotto una curva standard è stata impostata con concentrazioni crescenti di antigene standard non marcato, al fine poter effettuare le relative misurazioni.

Il saggio così ottenuto è stato rilevato tramite utilizzo di strumentazioni per la conta della radioattività.

- Analisi densitometrica

L'analisi densitometrica dei Western Blot è stata effettuata tramite software *ImageJ*, i dati così ottenuti sono stati analizzati utilizzando Graphpad Prism v.4.0 (Statcom, Germany).

- Analisi statistica

I risultati ottenuti sono presentati con le relative deviazioni standard ($\pm$ SE) ed analizzati con T-test o analisi delle varianti (ANOVA). I valori *p* minori di 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati

Silenziamento di IR:

Per valutare l'effettivo silenziamento del recettore abbiamo analizzato mediante Western Blot l'espressione del recettore insulinico. La figura 2 mostra il Western Blot per il recettore insulinico in campioni di controllo (controllo negativo e non trattato), ed in campioni silenziati, in cui non è possibile osservare alcun segnale proteico, anche dopo stimolazione con insulina (10^{-9} M) e IGF1 (1nM).

Analisi dell'attivazione di IRS1:

L'analisi proteica di IRS1 dopo silenziamento ha mostrato un'attivazione in seguito a stimolazione con insulina, nonostante il silenziamento del suo recettore (fig. 2).

Analisi dell'attivazione di AKT:

L'analisi mediante western blot della fosforilazione di AKT (ser 476) mostrava una marcata attivazione dopo stimolazione con insulina, rispetto ai campioni di controllo (controllo negativo e non trattato) ed ai campioni silenziati non stimolati e stimolati con IGF1 (1nM) (Fig. 2).

Secrezione di Glucagone:

L'analisi della secrezione di glucagone, mediante metodica RIA, mostrava un aumento dei livelli di secrezione dopo stimolazione con insulina (10^{-9} M), dopo silenziamento del recettore insulinico, rispetto ai campioni di controllo (controllo negativo e non trattato) ed ai campioni silenziati non stimolati e stimolati con IGF1 (1nM) (Fig. 3).

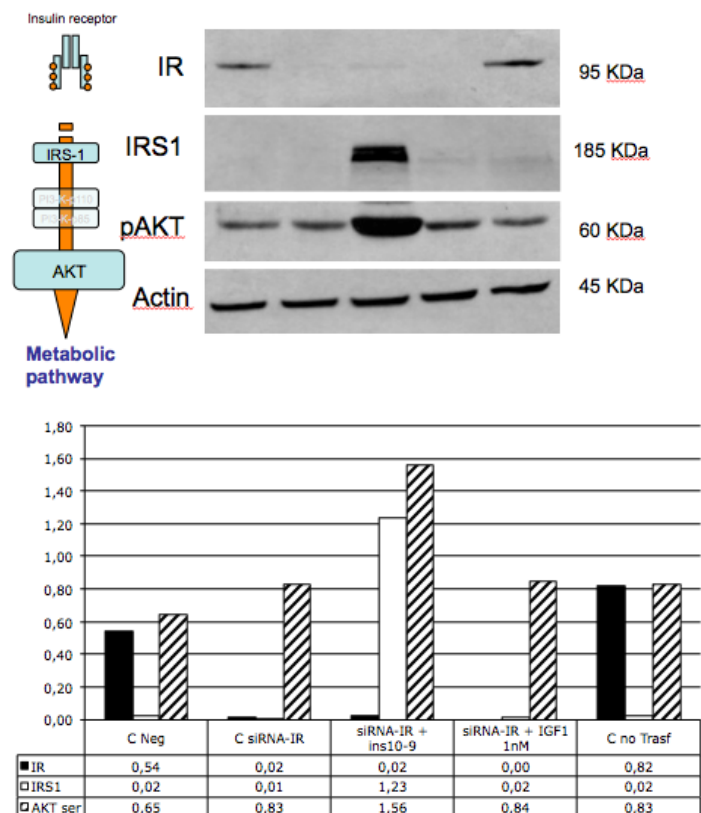


Figura 2: Analisi proteica della via di trasduzione del segnale dell'insulina: Analisi proteica per le principali componenti del segnale insulinico e relativa analisi densitometrica, dopo silenziamento, in campioni di controllo e stimolati con insulina 10^{-9} M e IGF1 1nM.

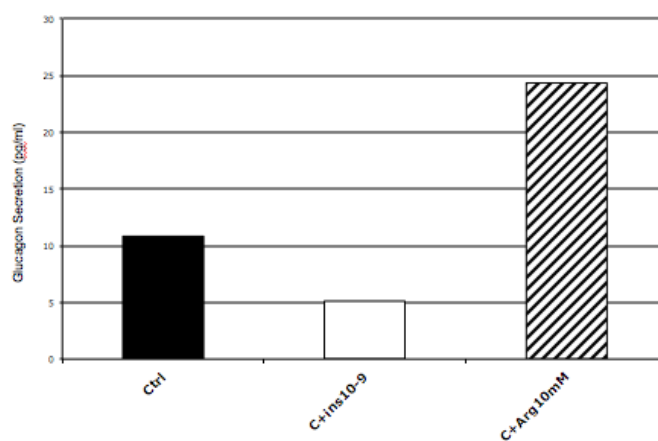


Figura 3: Secrezione di glucagone: analisi della secrezione di glucagone dopo silenziamento di IR;

Analisi dei livelli di espressione di IGF1R:

L'analisi proteica dei livelli di espressione del recettore per le IFG, dopo silenziamento di IR, non mostrava alcuna alterazione. I livelli di espressione proteica di IGF1R risultavano uguali sia nei campioni di controllo (controllo negativo e non trattato) sia nei campioni silenziati e stimolati (con insulina 10^{-9} M o IGF1 1nM) (Fig 4).

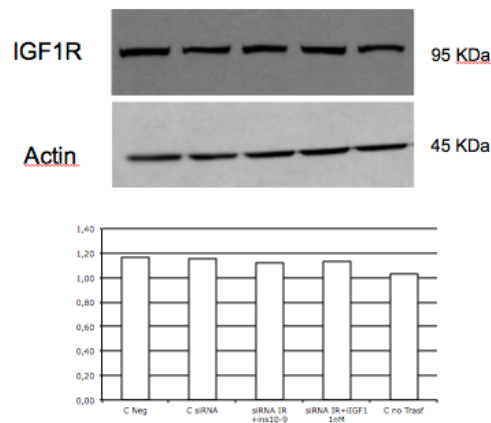


Figura 4: Analisi proteica di IGF1R e relativa analisi densitometrica;

Analisi dei livelli di espressione di ERK 44/42:

L'analisi proteica mediante western blot dei livelli di fosforilazione di ERK 44/42 mostrava una significativa attivazione della fosforilazione nei campioni silenziati sia quando stimolati con insulina (10^{-9} M) (fig. 5).

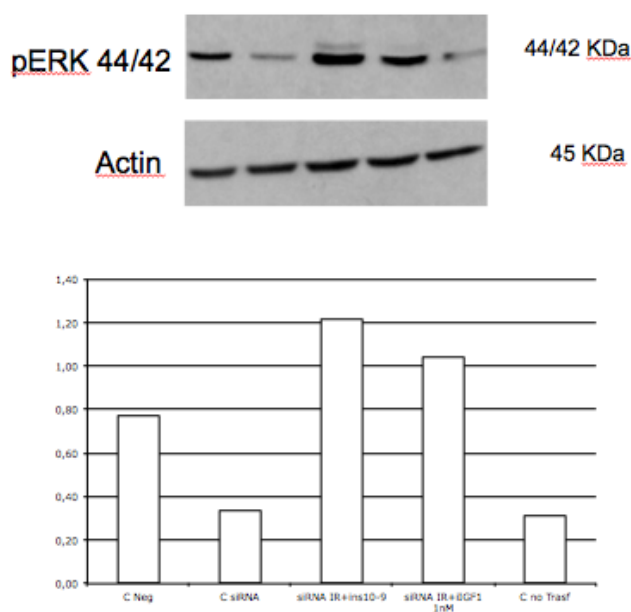


Figura 5: Analisi proteica di pERK 44/42 e relativa analisi densitometrica;

Discussione

In questo progetto abbiamo analizzato la capacità da parte della cellula alfa pancreatica, in particolare α TC1-6 e InR1G9, di utilizzare meccanismi intracellulari alternativi in condizioni sfavorevoli, come, nel nostro caso, la perdita o il malfunzionamento del recettore insulinico.

Le cellule sono state dapprima sottoposte a silenziamento del recettore insulinico, al fine di identificare le soluzioni alternative adoperate dalle cellule, di seguito abbiamo analizzato la via intracellulare del segnale insulinico ed identificato un plausibile sostituto di IR.

L'insulina è un ormone essenziale per l'organismo. Come tale ormone agisca a livello del proprio recettore e conseguentemente sulla cascata di trasduzione del segnale è stato ampiamente discusso e riportato in letteratura [150-152]. Il primo punto sviluppato all'interno di questo progetto è stato quello di silenziare il recettore per l'insulina ed analizzare le reazioni cellulari a tale evento sfavorevole.

Una volta messe a punto le condizioni per il silenziamento abbiamo proseguito i nostri studi lungo la via intracellulare di trasduzione del segnale.

Abbiamo innanzitutto dimostrato che, in queste linee cellulari, in seguito a silenziamento di IR, il segnale intracellulare, innescato dalla stimolazione con insulina, viene ugualmente trasdotto all'interno della cellula. Questo probabilmente potrebbe verificarsi grazie all'intervento di un altro recettore, IGF1R, poichè come accennato precedentemente IGF1R e IR rappresentano due elementi della stessa famiglia, in grado di agire interscambiando i propri ruoli. Inoltre, non solo il segnale insulinico risultava in grado di agire attivando la via di MAPKinasi, bensì si tratta di un segnale in grado di agire a livello intracellulare, influenzandone la secrezione, questo si traduce in una diminuzione della secrezione di glucagone.

I nostri dati suggeriscono inoltre che non è la sola attivazione di IGF1R ad indurre il segnale intracellulare verso la via metabolica, ma è proprio l'attivazione da parte dell'insulina, infatti in seguito ad attivazione di IGF1R da parte del suo principale ligando, IGF1, si ha la sola attivazione della via proliferativa (fig. 6).

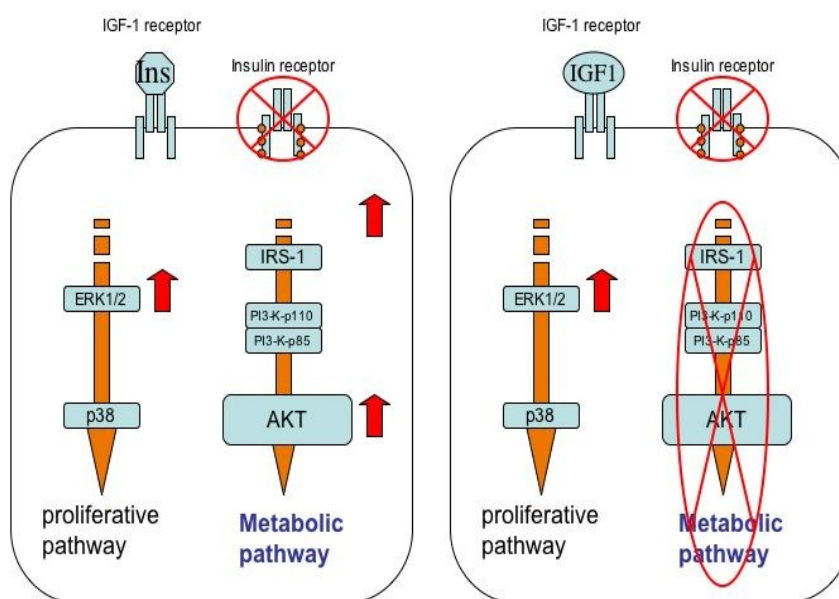


Figura 6: schema rappresentativo dei sistemi di trasduzione del segnale, attivati dopo silenziamento di IR: Quando IGF1R è attivato dall'insulina il segnale si propaga lungo entrambe le vie di trasduzione del segnale, inducendo inibizione della secrezione di glucagone e proliferazione cellulare (dati non mostrati); l'attivazione da parte di IGF influenza la sola via proliferativa;

Questi dati dimostrano come, in presenza di un'alterata funzionalità del recettore insulinico, la cellula sia in grado di ovviare a tale problematica, tramite l'utilizzo di vie alternative per la trasduzione del segnale.

Se da un lato però questi dati possono sembrare risolutivi in questo senso, dall'altro va precisato che limitarsi alla sola analisi del blocco del recettore insulinico risulta riduttivo.

Per tale motivo tali dati necessitano ulteriore supporto, come l'aggiunta di fattori normalmente implicati nella disfunzione del segnale insulinico, quali ad esempio lipotossicità e glucotossicità.

Questi dati hanno rappresentato il punto di partenza per lo sviluppo di nuovi progetti. Le tecniche e le informazioni acquisite in questo studio sono risultate propedeutiche non solo per lo studio degli altri progetti ma per l'intero gruppo di ricerca.

"Possibili terapie per il Diabete Mellito: GLP1 e alfa cellula pancreatica"

Il diabete mellito di tipo 2 è una patologia ad elevata incidenza nella popolazione generale; i cambiamenti nello stile di vita e le nuove abitudini alimentari hanno portato ad un graduale aumento, nell'ultimo decennio, dell'insorgenza di tale patologia nelle popolazioni industrializzate [153]. Le alterazioni coinvolte nella patogenesi del diabete riguardano alcuni aspetti classici, quali la secrezione insulinica e la sensibilità dei tessuti a tale ormone, nonché alcuni nuovi elementi che negli ultimi anni hanno contribuito alla comprensione della patologia. Tra questi, due in particolare hanno assunto un ruolo sempre più determinante: l'asse delle incretine e gli ormoni gastro-intestinali. Entrambi questi due aspetti hanno contribuito al cambiamento delle conoscenze sul diabete e hanno permesso di apportare modificazioni negli schemi terapeutici finora utilizzati per il trattamento di questa patologia.

Negli ultimi anni l'interesse scientifico e terapeutico ha puntato lo sguardo sullo sviluppo di nuove terapie mirate ad incrementare l'azione delle incretine, ormoni secreti in seguito all'ingestione di cibo, in grado di migliorare la risposta delle cellule dell'isola pancreatica. In particolare la ricerca farmacologica ha concentrato la propria attenzione sulla produzione di farmaci capaci di mimare l'attività del GLP1.

In vivo nell'uomo, somministrando glucosio *per os* o per via endovenosa, si ottiene una risposta, in termini di secrezione insulinica, differente. In particolare il glucosio *per os*, stimolando direttamente le cellule endocrine intestinali, è in grado di potenziare la secrezione insulinica stessa da parte del pancreas. Questo effetto è noto come "effetto

incretinico” ed è responsabile della maggiore secrezione insulinica in vivo. È noto in letteratura che l’effetto incretinico, risulta essere significativamente ridotto in pazienti con DMT2[77]. Cosa determini la perdita dell’effetto incretinico nei soggetti con diabete mellito non è ad oggi nota. Cause genetiche di malfunzionamento delle cellule intestinali o cause acquisite sono in fase di studio, ma nessun dato certo esiste ad oggi. [154]. Gli ormoni responsabili di tale fenomeno sono il GLP-1 ed il GIP (rispettivamente Glucagon Like Piptide 1 e Glucose dependent insulintropic peptide) prodotti rispettivamente dalle cellule L ntestinali e dalle cellule K. In corso di diabete sono state riscontrate alterazioni funzionali di tali cellule, anche se non è noto cosa possa determinare tali alterazioni. [155]. Inoltre non è del tutto noto se nei pazienti con diabete sia solo la riduzione dei livelli di GLP-1 a determinare una riduzione dell’effetto incretinico o se indipendentemente dai valori circolanti di GLP-1 sia invece una resistenza dei tessuti a tale ormone a causare la mancata risposta funzionale e quindi la riduzione dell’effetto incretinico.

Pertanto, poiché risulta ampiamente dimostrato in letteratura che le terapie attualmente in uso, non sono in grado di indurre la produzione endogena di tale ormone [156], la ricerca di potenziali strategie per il trattamento del DMT2 sembra dirigere l’attenzione verso questi ormoni gastrointestinali e sui possibili nuovi target farmacologici e terapeutici.

Risulta tuttavia ancora un quesito aperto se i pazienti con diabete abbiano ridotti livelli di incretine o se il problema legato all’asse pancreatico-intestinale sia solo alterato in termini di resistenza ormonale. La terapia del diabete mellito negli ultimi anni si è arricchita di nuove armi terapeutiche; analoghi del GLP-1 e molecole in grado di aumentare l’emivita plasmatica del GLP-1 endogeno, fanno parte dell’armamentario farmacologico del diabetologo. Con queste nuove armi terapeutiche tuttavia si ottengono livelli sovra fisiologici e prolungati di GLP-1 nel paziente; non è evidente se questi aumenti cronici

possano avere effetti a lungo termine e/o se le azioni positive riscontrate all'inizio delle terapie (soprattutto in termini di maggiore regolazione dei livelli di glucagone) perdurano nel tempo o se invece vengono persi con il perdurare delle terapie.

Il quesito che ci siamo posti in questo progetto è stato quindi quello di studiare l'azione del GLP-1 a livello della cellula alfa pancreatica e in seguito abbiamo cercato di capire se l'aumento sovra fisiologico e cronico dei livelli di GLP-1 nell'organismo, e quindi a livello delle alfa cellule pancreatiche, possa causare effetti di tipo funzionale o alterazioni secretorie quando prolungato nel tempo.

Non è infatti ancora ben chiaro se il GLP-1 agisca direttamente sulla cellula alfa pancreatica o se invece l'azione riscontrata in termini di riduzione di glucagone sia invece indiretta, mediata cioè da altri ormoni (insulina/somatostatina) (fig. 1); inoltre non è noto se il GLP-1, nel caso agisca direttamente a livello delle alfa cellule pancreatiche, sia in grado di alterare la funzione di queste cellule e se queste alterazione (proteiche/geniche) siano sempre positive o se invece possano essere avverse.

In questo progetto abbiamo esposto cronicamente le cellule α TC1 a GLP1 (100 nM) e successivamente abbiamo analizzato quali fossero le conseguenze di tale esposizione. Abbiamo anche studiato i recettori per il GLP-1 e gli effetti secondari alla stimolazione del recettore per il GLP-1 (GLP1R).

Una volta dimostrata la presenza del recettore e la sua funzione a livello del nostro sistema cellulare in seguito ad esposizione all'ormone, abbiamo analizzato quali potessero essere i target intracellulari.

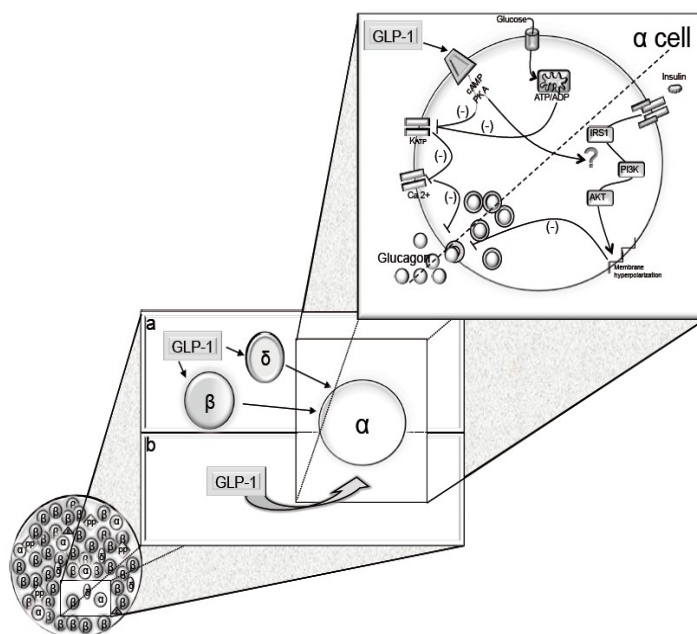


Figura 1: Azione diretta o indiretta del GLP1 sulla cellula alfa pancreatica

Materiali e metodi

- **Modelli cellulari**

Le cellule α TC-1, acquistate dall'American Type Culture Collection (ATCC), provengono da glucagonoma di topo capaci di produrre solo glucagone e non insulina.

Le α TC1 sono state coltivate a 37°C con il 5% di CO² in mezzo D-MEM (SIGMA aldrich), supplementato con 10% FBS, albumina, 2% Glutamina, 1% aminoacidi non essenziali, antibiotici, penicillina e streptomicina, all'1%.

Le cellule sono state tripsinizzate due volte la settimana.

- **Secrezione di Glucagone e GLP1**

Dopo 48 ore di crescita in presenza o assenza di GLP1 (100 nM), le cellule sono state sottoposte a deprivazione di siero (FBS) per 24 ore e successivamente incubate per 2 ore in

Krebs-Ringer (KRB) buffer contenente 16.7mmol/L di glucosio e 0.5% di BSA a pH 7.4 in presenza o in assenza di GLP1 (100 nM). Alcuni esperimenti sono stati condotti in assenza di stimolazione per 2h al fine di valutare la risposta secretoria delle cellule in termini di GLP-1.

Il surnatante è stato aliquotato in provette contenenti aprotinina (0.1 mg/ml) e conservato a -20°C fino al dosaggio degli ormoni, glucagone e GLP-1, effettuati tramite metodica RIA (radioimmunoassay) (Millipore, Millipore Corporation, Billerica, MA) ed ELISA rispettivamente.

- Preparazione dei lisati proteici cellulari

Dopo il periodo di trattamento le cellule sono state lavate due volte con PBS (pH 7.4), incubate con terreno (privo di FBS) per 24h e successivamente sono state trattate in base agli esperimenti da condurre. La stimolazione è stata bloccata con tre lavaggi in PBS freddo (pH 7.4), il liquido in eccesso è stato aspirato ed aggiunto Buffer di lisi freddo (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxycholate, 0,1 % Di sodio dodecil solfato [SDS], 50 mM Tris [pH 7,4], 10 mM sodio pirofosfato, 100 mM NAF, 2 mM PMSF, 2 mM vanadato di sodio, 1 mg di pepstatin per ml, 1 mg di aprotinina per ml, 1 mg di leupeptin per ml). Dopo la lisi, i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 4 °C, al termine del quale il materiale insolubile è stato separato dal materiale solubile. La concentrazione di proteine è stata quantificata tramite BCA (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA).

- Western blot

I Western blots sono stati effettuati come descritto precedentemente [119]. Brevemente, dopo normalizzazione con BCA, le proteine sono state eluite in gel di acrilamide, trasferite

su membrane di nitrocellulosa ed una volta incubate con specifici anticorpi rilevate con metodo ECL. Per la normalizzazione dei lisati, le membrane di nitrocellulosa sono state trattate con Restore stripping buffer (Pierce) per 10 minuti a temperatura ambiente e successivamente incubate con anticorpo anti-actina monoclonale o, in alcuni casi, con gli anticorpi delle rispettive proteine non fosforilate.

- Estrazione, quantificazione dell'mRNA ed analisi dell'espressione genica

L'RNA totale è stato estratto secondo il protocollo TRIzol (Invitrogen Carlsbad,CA), purificato con RNase-free DNase I (SIGMA, St. Louis, MO) e quantificato mediante esame spettrofotometrico. L'RNA è stato retrotrascritto in cDNA mediante RT-PCR con enzima Supertrascript II e primers Oligo dT.

Il differente livello di espressione genica è stato quantificato usando Master Mix Cyber Green (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA), utilizzando lo strumento ABI PRIMS 7700 (PE Applied Biosystems).

I geni sono stati amplificati utilizzando specifici primers per il topo.

- Disegno dei primers

I primers sono stati disegnati utilizzando il programma Primer Express Software versione 1.5 fornito dall'Applied Biosystems e sintetizzati da MWG-Biotech (Ebersberg, Germany).

Ogni singolo campione è stato analizzato in triplicato e le differenze tra le medie sono state comparate tramite calcolo del $\Delta\Delta CT$, metodica standardizzata per la *Real Time* PCR.

- Analisi mediante Real-time-PCR

Ogni campione è stato eseguito in triplice copia; quando la differenza tra le triplette è stata superiore a 0,5 Ct, la PCR quantitativa è stata ripetuta. I livelli di mRNA sono stati determinati o con elettroforesi su gel di agarosio (RT-PCR) o attraverso l'analisi comparativa dei TC ($\Delta\Delta CT$).

- Metodica RIA

La metodica RIA è stata effettuata incubando i campioni con anticorpo specifico per 20-24 ore a 4°C, al termine dell'incubazione in ogni tubo è stata inserita una concentrazione fissa di antigene tracciante marcato e nuovamente incubato per 22-24 ore a 4°C. Trascorse le quali, in seguito all'aggiunta dell'agente precipitante, i campioni sono stati centrifugati a 4°C per 20 minuti a 2000-3000xg ed il risultante *pellet* è stato lasciato decantare al fine di eliminare ogni possibile traccia di antigene marcato residuo. Per ogni esperimento condotto una curva standard è stata impostata con concentrazioni crescenti di antigene standard non marcato, al fine poter effettuare le relative misurazioni.

Il saggio così ottenuto è stato rilevato tramite utilizzo di strumentazioni per la conta della radioattività.

- Metodica ELISA

La metodica ELISA è stata effettuata incubando i campioni dapprima per 20-24 ore a 4°C in una soluzione specifica, al termine delle 24h ore incubato nuovamente per 2h con anticorpo specifico a temperatura ambiente. Trascorse le quali, in seguito all'aggiunta dell'agente rilevante ed un'ulteriore incubazione di 20 min., la reazione è stata bloccata con

l'aggiunta di una *stop solution*. Il saggio così ottenuto è stato rilevato tramite utilizzo di strumentazioni per la lettura della fluorescenza.

Per ogni esperimento condotto una curva standard è stata impostata con concentrazioni note, al fine di poter effettuare le relative misurazioni.

- *Analisi densitometrica*

L'analisi densitometrica dei Western Blot è stata effettuata tramite software *ImageJ*, i dati così ottenuti sono stati analizzati utilizzando Graphpad Prism v.4.0 (Statcom, Germany).

- *Analisi statistica*

I risultati ottenuti sono presentati con le relative deviazioni standard ($\pm$ SE) ed analizzati con T-test o analisi delle varianti (ANOVA). I valori *p* minori di 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati

Espressione del recettore del GLP1 (GLP1R) nella cellule alfa pancreatiche:

Per identificare la presenza del recettore del GLP1 (GLP1R) nel nostro modello cellulare (α TC1-6) abbiamo eseguito sia analisi realtime PCR sia analisi western blot; un modello di beta cellule pancreatiche, le cellule β TC1, sono state usate come controllo positivo. Sia mediante real time PCR che tramite Western Blot abbiamo rilevato che il nostro modello di alfa cellule pancreatiche possedeva il recettore per il GLP-1. I livelli di espressione erano inferiori rispetto al controllo positivo di beta cellule. Questo è un dato atteso e già noto in letteratura, così come dimostrato anche da De Marinis et al. [157](fig.2).

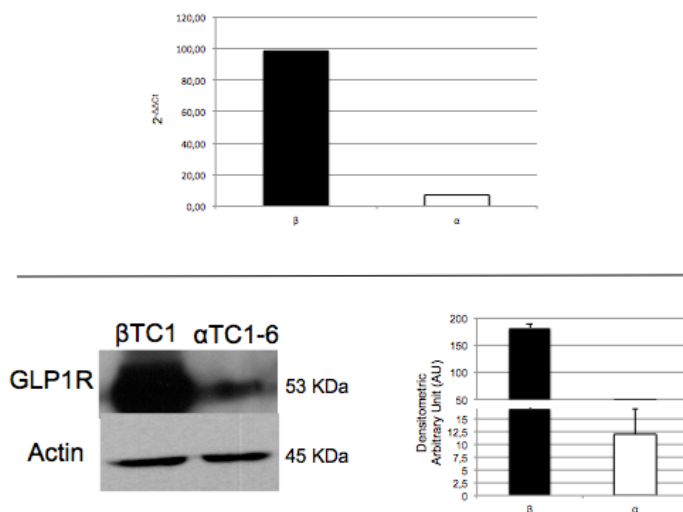


Figura 2: Realtime PCR e Western Blot per il recettore del GLP1R:

La parte superiore della figura mostra un esperimento rappresentativo dell'analisi, mediante realtime PCR, della presenza del recettore per il GLP1 sulle cellule alfa; La parte inferiore mostra un esperimento rappresentativo dell'analisi, mediante realtime western blot e relativa densitometria, della presenza del recettore per il GLP1 sulle cellule alfa;

Effetto del GLP1 sui livelli di cAMP intracellulare:

Per validare la presenza del recettore del GLP-1 nel nostro modello, abbiamo inoltre misurato la produzione di cAMP indotta dal GLP1. Abbiamo coltivato le cellule α TC1-6 in presenza o assenza di GLP1 (100 nM). inoltre, per verificare la specificità dell'effetto del GLP-1 sul suo recettore, abbiamo utilizzato stimolatori specifici di cAMP (Forskolina 50nM), e inibitori specifici (Exendina 9 100nM); dopo esposizione a questi composti è stato valutato l'effetto sulla produzione di cAMP. Nel nostro modello sperimentale dopo esposizione cronica a GLP1 le cellule mostravano un significativo aumento della concentrazione di cAMP rispetto al gruppo di controllo ($P < 0.05$ vs. controllo) (fig.3). Inoltre, a dimostrazione del fatto che la stimolazione fosse mediata dal recettore del GLP1, l'esposizione con Forskolina mostrava una più marcata produzione di cAMP, così come la presenza contemporanea di Exendina 9 dimostrava una inibizione dell'effetto del GLP1 (fig.3).

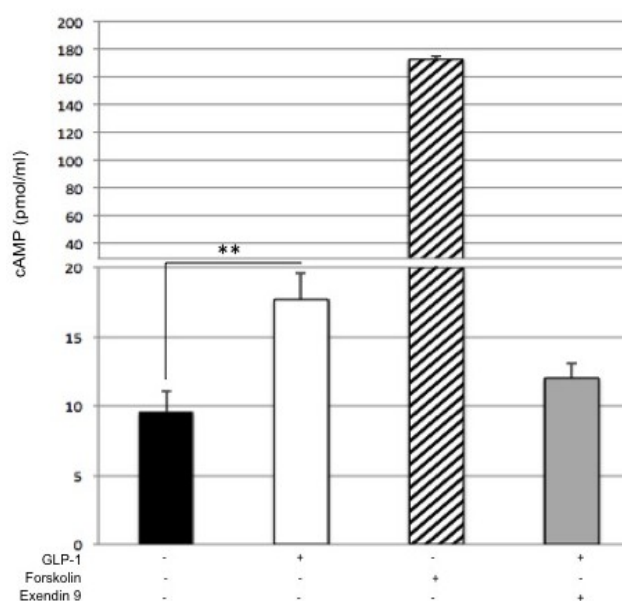


Figura 3: Livelli di cAMP: Analisi ELISA dei livelli di cAMP dopo esposizione cronica a GLP1;

Effetto del GLP1 sul contenuto e secrezione di glucagone:

Dopo aver dimostrato che il nostro sistema possiede il recettore per il GLP-1 e che questo recettore è funzionante, abbiamo voluto testare l'effetto del GLP-1 sulla secrezione di glucagone. Come mostrato dalla figura 4a la preincubazione cronica (48h) con GLP1 (100 nM) determinava una significativa inibizione della secrezione di glucagone rispetto alle cellule di controllo. Questa inibizione risultava maggiore rispetto all'inibizione indotta dall'insulina (10^{-9} M) che rappresenta lo stimolo fisiologico per il blocco della secrezione di glucagone nelle alfa cellule pancreatiche (Fig 4). Per verificare se l'effetto del GLP-1 sulla inibizione della secrezione di glucagone fosse solo funzionale per la cellula, cioè determinato solo dall'inibizione del rilascio ormonale, o se l'effetto fosse a livello della sintesi ormonale, abbiamo misurato il contenuto intracellulare di glucagone dopo esposizione cronica a GLP-1. La figura 4b mostra come, nonostante le cellule esposte

cronicamente al GLP-1 rilascino meno glucagone, il contenuto intracellulare dell'ormone risultava lievemente ridotto, senza che si raggiungesse la significatività statistica (fig 4b).

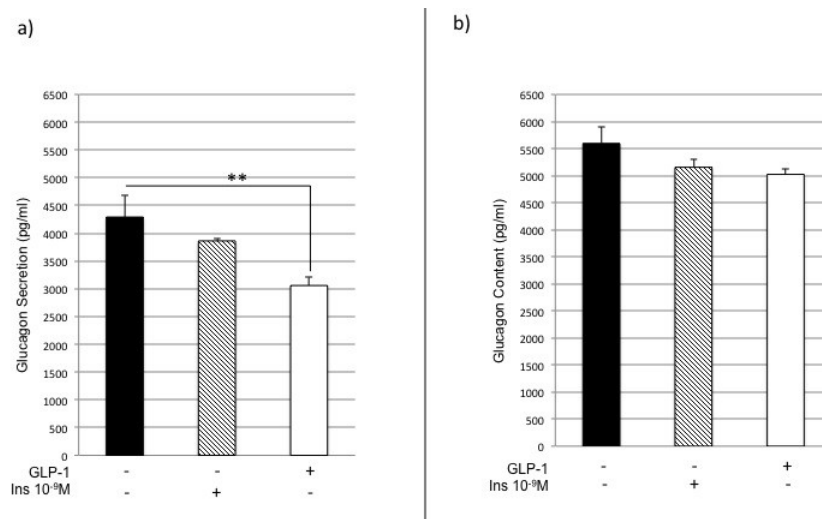


Figura 4: Secrezione e contenuto di Glucagone: a) Effetto dell'esposizione cronica a GLP1 sulla secrezione di glucagone; b) Effetto dell'esposizione cronica a GLP1 sul contenuto di glucagone;

Effetto del GLP1 sulla via intracellulare delle MAP Kinasi (MAPKs):

Poichè è noto in letteratura che cAMP regola la via delle MAP Kinasi (MAPKs) [158], abbiamo proseguito i nostri studi analizzando la principale componente della via di MAPKs, p44/42^{MAPK}, al fine di valutare la capacità da parte del GLP1 di agire a livello di tale via molecolare intracellulare.

Nel nostro modello cellulare, le α -TC1-6 coltivate cronicamente con GLP-1 (100 nM) per 48h, i livelli di p44/42^{MAPK} fosforilato erano significativamente più alti ($P < 0.05$ vs. controllo) rispetto alle cellule di controllo non trattate (fig.5a).

Al fine di dimostrare come tale fenomeno di attivazione di p44/42^{MAPK} fosse specifico dell'azione di GLP-1, abbiamo utilizzato exendina 9 (100 nM), noto antagonista del GLP-1R. Nelle cellule alfa pre-esposte a GLP1 (100 nM) per 48h in presenza di Exendina 9 (100 nM) per le ultime 6h, la fosforilazione di p44/42^{MAPK} era assente (fig.5a).

Per comprendere meglio l'interazione diretta tra l'attivazione di cAMP, mediata dal GLP1, e la fosforilazione di p44/42^{MAPK} abbiamo proseguito i nostri esperimenti utilizzando un attivatore dell'adenilato ciclasi, forskolina (50 nM per 12h), ed un inibitore, KH7 (25 μ M per 6h).

Nelle cellule α TC1-6 trattate con forskolina la fosforilazione di p44/42^{MAPK} era significativamente elevata (fig. 5a), inoltre quando trattate con KH7 la fosforilazione della proteina p44/42^{MAPK} risultava assente (fig.5a).

Per confermare ulteriormente il dato abbiamo condotto lo stesso esperimento in una linea cellulare priva di recettore per il GLP1, le InR1G9. In queste cellule la stimolazione con GLP1 non determinava alcun effetto ne su cAMP (dati non mostrati), ne sulla fosforilazione di p44/42^{MAPK} (fig.5b)

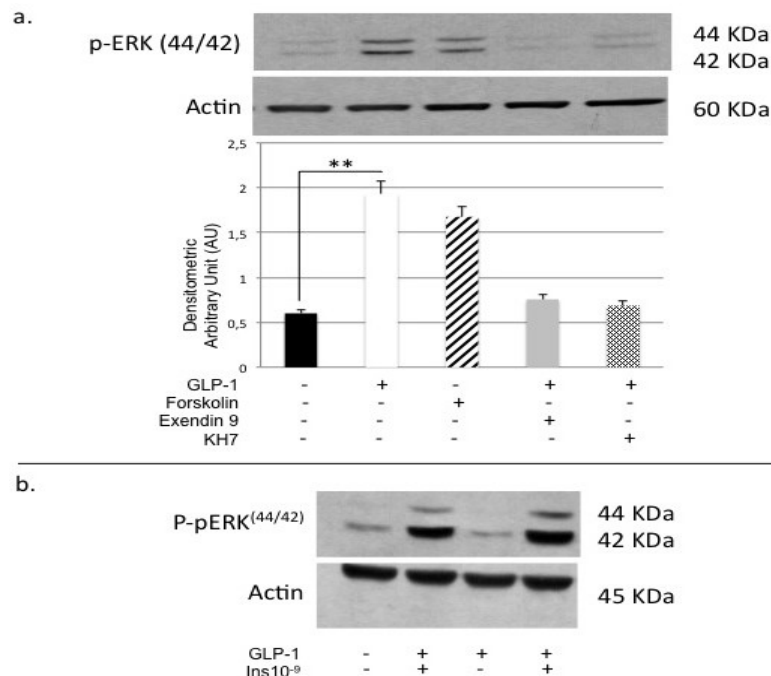


Figura 5: Analisi western blot di pERK 44/42: a) western blot per pERK44/42 in presenza di GLP1, Forskolina, Exendina 9, KH7 e relativa actina, in basso analisi densitometrica; b) western blot per pERK44/42 in cellule InR1G9 e relativa actina.

Effetto del GLP1 su Pax6:

Poichè la via di MAPKs, attraverso la fosforilazione di P38 [103], regola l'induzione di Pax6, fattore trascrizionale necessario per il normale sviluppo di diversi organi, incluso il pancreas [35, 122], abbiamo analizzato quale fosse il ruolo di MAPKs nell'espressione di Pax6 nel nostro sistema. Dopo 48h di esposizione a GLP1 l'espressione del gene codificante per Pax6, analizzata mediante real time PCR, risultava significativamente elevata rispetto al controllo ($P < 0.001$ vs. controllo) (fig 6a).

Inoltre anche l'analisi western blot per la proteina Pax6 mostrava un aumento della sua espressione rispetto al gruppo di controllo ($P < 0.05$ vs. controllo)(fig.6b).

Effetto del GLP1 sul proglucagone:

Poichè Pax6 nelle alfa cellule pancreatiche controlla la sintesi del gene del proglucagone [103], nel nostro modello abbiamo valutato i livelli di espressione del gene e della proteina del proglucagone. Dopo esposizione cronica (48h) a GLP1 (100 nM) sia il gene del proglucagone, analizzato mediante real time PCR, sia la proteina, analizzata mediante western blot, risultavano aumentati nei gruppi preesposti rispetto ai controlli (fig.6b).

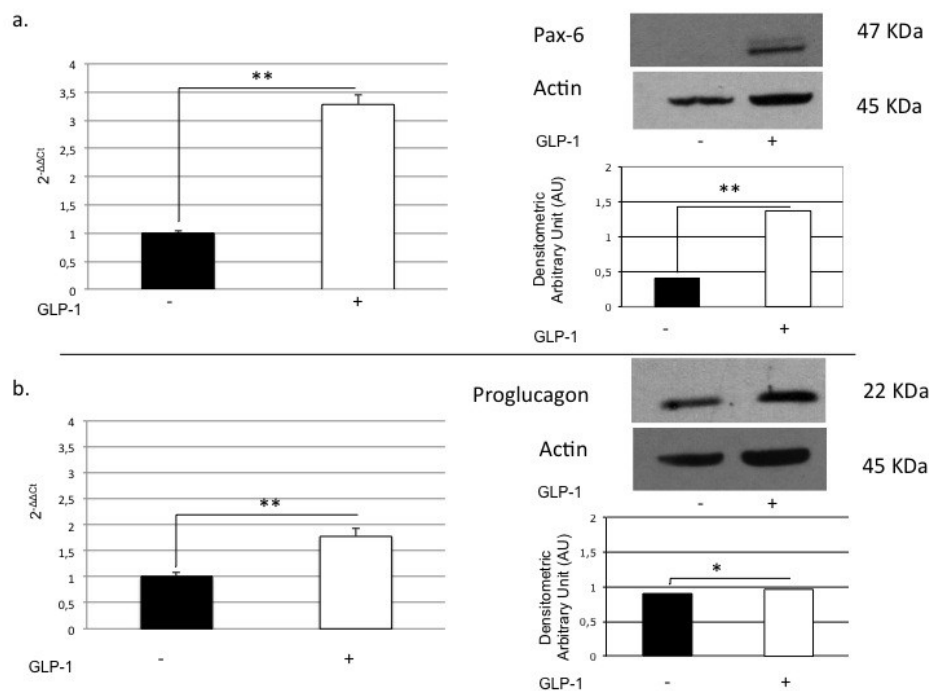


Fig 6. Analisi real time PCR e Western Blot per Pax6 e proglucagone: a) a sinistra analisi real time PCR per il gene codificante per Pax6, a destra analisi Western Blot per Pax6 e relativa actina; b) a sinistra analisi real time PCR per il gene codificante per il proglucagone, a destra analisi Western Blot per il proglucagone e relativa actina;

Livelli di espressione di PC1/3 e PC2 dopo stimolazione cronica con GLP1:

In fisiologia il gene del proglucagone contiene le sequenze di codifica per la proteina glucagone ma anche della proteina GLP-1, del GLP-2 e dell'oxintomodulina. E' comunemente noto che questo gene presente nelle alfa cellule pancreatiche, è posseduto anche dalle cellule L intestinali ed è indispensabile per la produzione di GLP-1. Il risultato ormonale prodotto è dato da specifici enzimi di conversione che clivando il trascritto originario determinano la produzione di glucagone (PC/2) o di GLP-1 (PC1/3). L'espressione di questi enzimi riveste quindi un ruolo critico per l'utilizzo finale da parte della cellula del trascritto del proglucagone. Nel nostro modello abbiamo analizzato l'espressione di questi enzimi di conversione al fine di comprendere l'effetto del GLP-1 anche su questo aspetto.

L'analisi dei livelli di espressione delle proteine codificanti per le pro-ormone convertasi PC1/3 e PC2 ha rivelato come, dopo esposizione cronica (48h) a GLP1 (100 nM), i livelli di espressione di PC1/3, convertasi in grado di indurre la conversione del proglucagone in GLP1, risultavano marcatamente incrementati rispetto ai gruppi di controllo ($P < 0.05$ vs. controllo) (fig. 7a). I livelli di espressione della proteina codificante per PC2, convertasi in grado di indurre la conversione del proglucagone in glucagone, risultavano invariati dopo esposizione cronica a GLP1 (fig. 7a). Questi risultati indicherebbero come le alfa cellule pancreatiche, quando stimulate cronicamente con GLP-1, potrebbero essere in grado di utilizzare il trascritto del proglucagone per produrre GLP-1 al posto di glucagone.

Analisi del GLP1 contenuto e secreto dopo esposizione cronica a GLP1:

Dopo 48h di esposizione cronica a GLP1 (100 nM) abbiamo misurato i livelli di contenuto di GLP1 nelle cellule α TC1-6, in modo da identificare una plausibile spiegazione all'attivazione della proormone convertasi PC1/3. Nei gruppi preesposti a GLP1 i livelli di contenuto di GLP1 risultavano significativamente elevati rispetto ai gruppi di cellule di controllo ($P < 0.05$) (fig. 7b). Inoltre le cellule sono state sottoposte ad ulteriori 24h di deprivazione di siero, sempre in presenza di GLP1, ed in seguito incubate per 2h in KRB in assenza di GLP1, quando a questo punto misuravamo i livelli di GLP1 secreto avevamo un aumento del rilascio di GLP-1 rispetto alle cellule di controllo ($P < 0.05$) (fig. 7b).

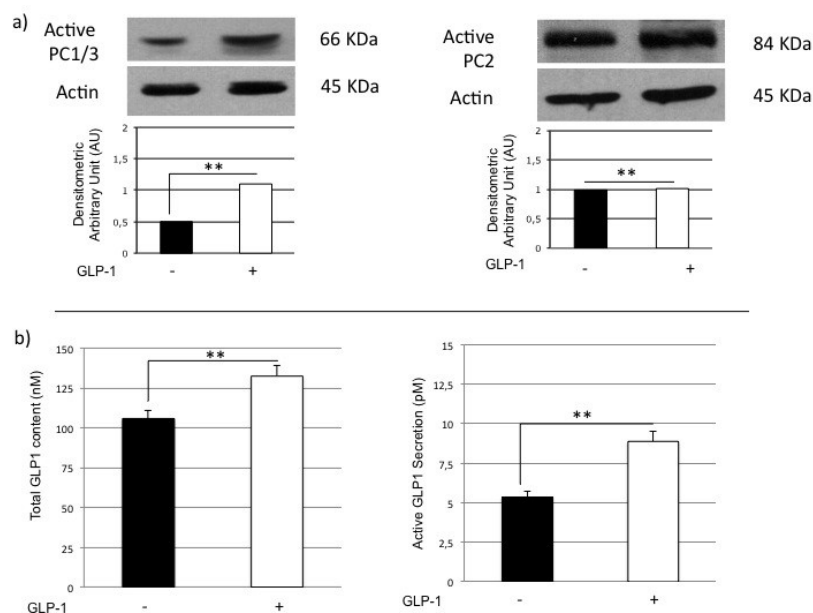


Figura 7: Analisi western blot di PC1/3-PC2 e Contenuto e secrezione di GLP1: a) A sinistra western blot rappresentativo per PC1/3, normalizzazione per actina e relativa densitometria; A destra western blot rappresentativo per PC2, normalizzazione per actina e relativa densitometria; b) A sinistra grafico dei livelli di contenuto di GLP1; A destra grafico dei livelli di secreto di GLP1;

Discussione

In questo progetto abbiamo analizzato il ruolo diretto del GLP1 su un modello cellulare murino di alfa cellule pancreatiche (α -TC1-6) dopo esposizione cronica (48 h) a GLP1 (100 nM).

Gli aspetti portati avanti in questo progetto hanno riguardato lo studio delle alfa cellule pancreatiche, spesso disfunzionali in corso di diabete mellito e il ruolo del GLP-1 a livello delle alfa cellule.

Sebbene negli ultimi anni l'interesse scientifico abbia diretto il proprio sguardo verso la cellula alfa pancreatica, la nostra comprensione generale dei sistemi di funzione di queste cellule risulta ancora carente. [3]

Questa mancanza di informazioni sulle cellule alfa pancreatiche è determinata in particolare dalla difficoltà con la quale è possibile purificare ed identificare le cellule alfa

all'interno dell'isola pancreatica umana; per tale motivo spesso modelli cellulari, come quello da noi utilizzato, vengono adoperati per gli studi *in vitro*[159].

Le cellule α -TC1 possiedono il vantaggio, rispetto alle colture primarie, di essere una popolazione cellulare omogenea, e per tale motivo viene utilizzata in molti dei lavori scientifici ad oggi pubblicati [114, 160-163].

L'interesse per l'azione diretta del GLP-1 sulle alfa cellule pancreatiche invece deriva dal fatto che sebbene in clinica il paziente diabetico risponde al GLP-1 modulando la secrezione di glucagone, allo stato attuale non è certo se le alfa cellule pancreatiche possiedano recettori per il GLP-1. L'azione di inibizione della secrezione di glucagone potrebbe quindi essere un'azione mediata dalle beta e dalle delta cellule pancreatiche. Queste ultime popolazioni cellulari, tramite la produzione di insulina e di somatostatina, potrebbero condizionare in maniera indiretta la secrezione delle cellule alfa pancreatiche. In questo progetto abbiamo valutato dimostrare se l'azione del GLP-1 sulle alfa cellule pancreatiche avviene in maniera diretta o mediata. I dati da noi ottenuti hanno dimostrato un'azione diretta che si verifica tramite uno specifico recettore per il GLP-1 presente nelle cellule alfa pancreatiche.

Un altro aspetto analizzato in questi studi ha riguardato l'effetto dell'esposizione cronica al GLP1 sulle cellule alfa pancreatiche. Questo aspetto rappresenta un particolare punto di interesse anche per la pratica clinica e farmacologica del diabete mellito. E' infatti noto che l'avvento della terapia con incretine per il diabete ha determinato in questi pazienti un aumento sovra fisiologico dei livelli di GLP-1; l'aumento è da riferirsi sia alla dose praticata che ai tempi di permanenza dell'azione dell'ormone in circolo. Ad oggi non è noto se il GLP-1 in cronico possa determinare cambiamenti nella funzione di cellule dell'organismo. In

questo studio abbiamo valutato questo aspetto su una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche.

In questo modello cellulare abbiamo dimostrato che questa linea di cellule possiede il recettore per il GLP1 e che quest'ultimo rappresenta un recettore funzionante.

La presenza del recettore del GLP-1 in questo modello, oltre ad essere dimostrata in maniera diretta, tramite l'identificazione del gene e della proteina, è stata testata anche dal punto di vista funzionale, tramite la misurazione del contenuto di cAMP che viene prodotto dopo stimolazione diretta con GLP-1.

Inoltre, in questo lavoro abbiamo dimostrato come l'esposizione al GLP1 determini una riduzione della secrezione di glucagone, così come osservato in vivo nell'uomo. Al fine di identificare i meccanismi molecolari intracellulari di queste cellule. Inoltre nel tentativo di analizzare l'effetto cronico del GLP-1 sulle alfa cellule pancreatiche, abbiamo analizzato la via di MAPK, coinvolta nei fenomeni di stimolo di cAMP. Analizzando queste vie intracellulari, abbiamo visto come l'esposizione cronica al GLP-1 determina aumento dei livelli intracellulari di proglucagone (gene e proteina), tramite l'induzione di Pax 6. Inoltre, l'analisi di espressione di PC2 e di PC 1/3, proteine di conversione del proglucagone, hanno dimostrato come le alfa cellule pancreatiche cronicamente esposte a GLP-1 modificano lo stato di produzione ormonale, forzando la sintesi verso la produzione di GLP-1 e riducendo la sintesi di glucagone (fig 10).

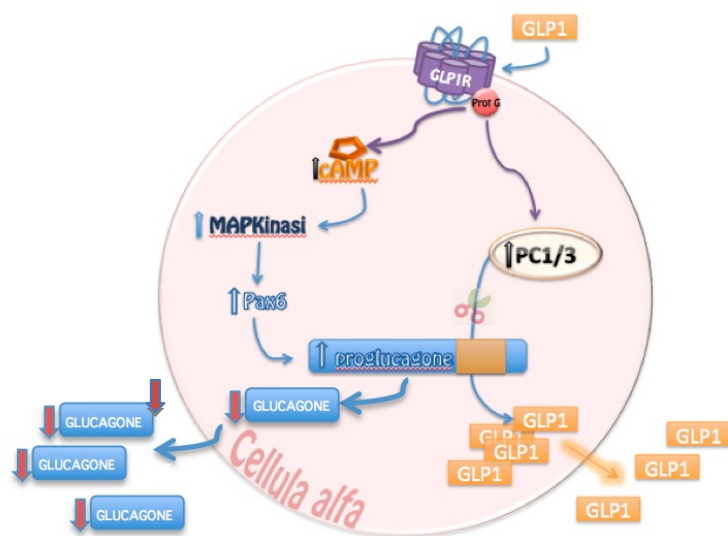


Figura 10: figura rappresentativa del modello d'azione del GLP1 sulla cellula alfa pancreatica

Nel presente studio, abbiamo quindi dimostrato che le cellule α sono in grado di produrre GLP-1. Questo aspetto assolutamente innovativo, trova conferma anche in altri modelli di cellule alfa pancreatiche e in isole [164, 165].

Nel nostro modello lo spunto di originalità deriva dal fatto che la produzione di GLP-1 è indotta dall'esposizione cronica al GLP-1 stesso, suggerendo un'azione di amplificazione del GLP-1 sulla propria produzione. Questo aspetto di notevole interesse per la patogenesi del diabete apre a nuovi spunti di speculazione, lasciando immaginare che l'isola è in grado di produrre GLP-1 normalmente. Questo GLP-1 prodotto a livello locale potrebbe servire all'isola per funzioni di secrezione ma anche per funzioni di trofismo e di sopravvivenza. Inoltre volendo speculare ulteriormente, la presenza di GLP-1 all'interno dell'isola potrebbe servire da supporto contro i meccanismi di eliminazione delle beta cellule che si verificano in corso di stress metabolico che portano allo sviluppo del diabete.

La comprensione di questi fenomeni e la possibilità di agire a questi livelli molecolari apporterà sicuramente vantaggi per lo studio e la cura del diabete mellito di tipo 2.

Conclusioni

La stesura di questa tesi rappresenta la sintesi delle ricerche effettuate durante il periodo di dottorato.

Per anni la ricerca nel campo del diabete ha considerato la beta-cellula pancreatica come principale, se non unico, protagonista. Per tale motivo negli ultimi anni lo studio delle altre componenti dell'isola pancreatica, così come la possibile interazione da parte di fattori esterni all'isola, hanno iniziato ad affacciarsi sulla scena, spostando l'area di interesse scientifico verso altri fronti.

I diversi progetti sviluppati durante il dottorato di ricerca mi hanno permesso di approfondire le conoscenze nel campo del diabete, ponendo un interesse maggiore sull'alfa cellula e su tutti quegli aspetti implicati nella fisiopatogenesi del diabete mellito.

Gli studi effettuati hanno previsto l'analisi principalmente dell'alfa cellula pancreatica, nel tentativo di comprenderne la funzionalità nonché il ruolo di questa popolazione cellulare nella patogenesi del diabete. Ho potuto così analizzare diversi aspetti, a partire dal recettore insulinico, passando per la via metabolica e la via proliferativa del segnale insulinico intracellulare, nonché la risposta alle condizioni sfavorevoli tipiche del diabete, lipotossicità e citochine. Inoltre ho potuto anche valutare le possibili strategie farmacologiche utilizzabili per il miglioramento della patologia.

A conclusione del lavoro effettuato posso affermare che l'alfa cellula pancreatica presenta un ruolo di primaria importanza nella patogenesi del diabete mellito. Tale ruolo, per anni ritenuto secondario, è tornato alla ribalta dopo l'avvento delle incretine nella cura e nello

studio del diabete. I risultati ottenuti nei progetti sviluppati suggeriscono come il comportamento delle alfa cellule pancreatiche risenta dell'effetto della lipotossicità. Tuttavia, basandosi sulle conoscenze di letteratura disponibili per le beta cellule pancreatiche, abbiamo potuto osservare come le alfa cellule rispondono in maniera diversa alla lipotossicità. Per esempio la stimolazione cronica con palmitato determina, quando prolungata, decremento della secrezione insulinica [103]; nel caso delle alfa cellule pancreatiche dopo esposizione prolungata a palmitato la secrezione aumenta e non risente dell'effetto inibitorio dell'insulina. Questo aspetto risulta di notevole interesse culturale perché potrebbe apportare notevoli avanzamenti nella comprensione della fisiopatologia del diabete. Inoltre ancora, mentre le beta cellule pancreatiche risentono del danno tossico indotto dalle citochine pro-infiammatorie, nel caso del nostro sistema le citochine non risultano in grado di indurre danno e morte nelle alfa cellule. Anche questo aspetto risulta di notevole interesse per lo studio del diabete non solo di tipo 2.

Conoscere a fondo la funzione ed il ruolo delle alfa cellule pancreatiche contribuirà sicuramente agli avanzamenti culturali per la cura e la prevenzione del diabete. Negli ultimi anni per esempio la scoperta delle incretine come ormoni in grado di curare il diabete ha indirizzato l'interesse delle case farmaceutiche verso questa direzione, portando alla produzione di farmaci in grado di migliorare la quantità di incretine circolanti; questi farmaci sviluppati, alcuni di questi già in uso hanno tra gli obiettivi di terapia, l'azione mirata sulle alfa cellule pancreatiche e sui livelli di produzione di glucagone. I nostri dati hanno dimostrato come l'azione delle incretine a livello dell'isola pancreatica può interessare direttamente la cellula alfa.

Sebbene questi risultati siano stati ottenuti con cellule immortalizzate, essi supportano la possibilità che le alfa cellule pancreatiche rappresentino un punto di fondamentale

importanza per l'identificazione e sviluppo di strategie alternative per il miglioramento della patologia diabetica. L'alfa cellula potrebbe dunque aggiungersi alla lista dei tessuti di primo interesse, rendendo ancora più complessa la relazione tra insulino-resistenza, alterazione della funzione dell'isola pancreatica e terapia farmacologica.

Bibliografia:

1. Mehring J von MO: **Diabetes mellitus nach Pankreasekstirpation.** . *Arch Exp Path Pharmako* 1889, **1** (26):371-387.
2. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA: **Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus.** *Canadian Medical Association journal* 1922, **12**(3):141-146.
3. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB: **Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains.** *Endocrine reviews* 2007, **28**(1):84-116.
4. American Diabetes A: **Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** *Diabetes care* 2012, **35** Suppl 1:S64-71.
5. P F: **Le basi razionali della terapia del diabete mellito. Da Le basi razionali della terapia.** . *Ed Piccin Editore Padova* 1987, **XVII**(4):291-310 (
6. **American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes.** *Diabetes care* 2009, **32**(Suppl 1):13-61.
7. Beckman JA, Creager MA, Libby P: **Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2002, **287**(19):2570-2581.
8. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O: **Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes.** *The New England journal of medicine* 2003, **348**(5):383-393.
9. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW: **Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment.** *Lancet* 2008, **371**(9631):2153-2156.
10. Gillespie KM: **Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention.** *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 2006, **175**(2):165-170.
11. Atkinson MA, Maclaren NK: **The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus.** *The New England journal of medicine* 1994, **331**(21):1428-1436.
12. Group DP: **Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999.** *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2006, **23**(8):857-866.
13. 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.
14. Yang Z, Long X, Shen J, Liu D, Dorman JS, Laporte RE, Chang YF: **Epidemics of type 1 diabetes in China.** *Pediatric diabetes* 2005, **6**(3):122-128.
15. Risch N: **Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease.** *American journal of human genetics* 1987, **40**(1):1-14.
16. Warram JH, Krolewski AS, Kahn CR: **Determinants of IDDM and perinatal mortality in children of diabetic mothers.** *Diabetes* 1988, **37**(10):1328-1334.
17. Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F: **An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment.** *Regulatory peptides* 2008, **146**(1-3):4-11.

-
18. 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.
 19. Marchetti P: **La β -cellula nel diabete mellito di tipo 2.** . *Grandangolo in Diabetologia La secrezione insulinica* 2002, **2**.
 20. Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A: **Gestational diabetes: the need for a common ground.** *Lancet* 2009, **373**(9677):1789-1797.
 21. Bardeesy N, DePinho RA: **Pancreatic cancer biology and genetics.** *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(12):897-909.
 22. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A: **The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(7):2334-2339.
 23. Bonner-Weir S, O'Brien TD: **Islets in type 2 diabetes: in honor of Dr. Robert C. Turner.** *Diabetes* 2008, **57**(11):2899-2904.
 24. Bonner-Weir S, Orci L: **New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat.** *Diabetes* 1982, **31**(10):883-889.
 25. Stagner JI, Samols E: **Retrograde perfusion as a model for testing the relative effects of glucose versus insulin on the A cell.** *The Journal of clinical investigation* 1986, **77**(3):1034-1037.
 26. Ohneda A, Watanabe K, Horigome K, Sakai T, Kai Y, Oikawa S: **Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1978, **46**(3):504-510.
 27. Heller RS, Kieffer TJ, Habener JF: **Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas.** *Diabetes* 1997, **46**(5):785-791.
 28. Steiner DF: **The proprotein convertases.** *Current opinion in chemical biology* 1998, **2**(1):31-39.
 29. Furuta M, Zhou A, Webb G, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, Steiner DF: **Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(29):27197-27202.
 30. Rouille Y, Bianchi M, Irminger JC, Halban PA: **Role of the prohormone convertase PC2 in the processing of proglucagon to glucagon.** *FEBS letters* 1997, **413**(1):119-123.
 31. Scopsi L, Gullo M, Rilke F, Martin S, Steiner DF: **Proprotein convertases (PC1/PC3 and PC2) in normal and neoplastic human tissues: their use as markers of neuroendocrine differentiation.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1995, **80**(1):294-301.
 32. Exton JH, Jefferson LS, Jr., Butcher RW, Park CR: **Gluconeogenesis in the perfused liver. The effects of fasting, alloxan diabetes, glucagon, epinephrine, adenosine 3',5'-monophosphate and insulin.** *The American journal of medicine* 1966, **40**(5):709-715.
 33. Unger RH, Orci L: **The role of glucagon in the endogenous hyperglycemia of diabetes mellitus.** *Annual review of medicine* 1977, **28**:119-130.

-
34. Scheen AJ, Castillo MJ, Lefebvre PJ: **Assessment of residual insulin secretion in diabetic patients using the intravenous glucagon stimulatory test: methodological aspects and clinical applications.** *Diabetes & metabolism* 1996, **22**(6):397-406.
 35. Prasad K, Daume E, Preuett B, Spilde T, Bhatia A, Kobayashi H, Hembree M, Manna P, Gittes GK: **Glucagon is required for early insulin-positive differentiation in the developing mouse pancreas.** *Diabetes* 2002, **51**(11):3229-3236.
 36. Vuguin PM, Kedes MH, Cui L, Guz Y, Gelling RW, Nejathaim M, Charron MJ, Teitelman G: **Ablation of the glucagon receptor gene increases fetal lethality and produces alterations in islet development and maturation.** *Endocrinology* 2006, **147**(9):3995-4006.
 37. Dinneen S, Alzaid A, Turk D, Rizza R: **Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM.** *Diabetologia* 1995, **38**(3):337-343.
 38. Orci L, Baetens D, Rufener C, Amherdt M, Ravazzola M, Studer P, Malaisse-Lagae F, Unger RH: **Hypertrophy and hyperplasia of somatostatin-containing D-cells in diabetes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1976, **73**(4):1338-1342.
 39. Ahren B, Larsson H: **Impaired glucose tolerance (IGT) is associated with reduced insulin-induced suppression of glucagon concentrations.** *Diabetologia* 2001, **44**(11):1998-2003.
 40. Larsson H, Ahren B: **Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance.** *Diabetes care* 2000, **23**(5):650-657.
 41. Mitrakou A, Kelley D, Mookan M, Veneman T, Pangburn T, Reilly J, Gerich J: **Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance.** *The New England journal of medicine* 1992, **326**(1):22-29.
 42. Raskin P, Unger RH: **Hyperglucagonemia and its suppression. Importance in the metabolic control of diabetes.** *The New England journal of medicine* 1978, **299**(9):433-436.
 43. Sherwin RS, Fisher M, Hendler R, Felig P: **Hyperglucagonemia and blood glucose regulation in normal, obese and diabetic subjects.** *The New England journal of medicine* 1976, **294**(9):455-461.
 44. Meier JJ, Kjemis LL, Veldhuis JD, Lefebvre P, Butler PC: **Postprandial suppression of glucagon secretion depends on intact pulsatile insulin secretion: further evidence for the inraisle insulin hypothesis.** *Diabetes* 2006, **55**(4):1051-1056.
 45. Amiel SA, Sherwin RS, Simonson DC, Tamborlane WV: **Effect of intensive insulin therapy on glycemic thresholds for counterregulatory hormone release.** *Diabetes* 1988, **37**(7):901-907.
 46. Gerich JE, Langlois M, Noacco C, Karam JH, Forsham PH: **Lack of glucagon response to hypoglycemia in diabetes: evidence for an intrinsic pancreatic alpha cell defect.** *Science* 1973, **182**(4108):171-173.
 47. Cryer PE: **Banting Lecture. Hypoglycemia: the limiting factor in the management of IDDM.** *Diabetes* 1994, **43**(11):1378-1389.

-
48. Heller SR, Cryer PE: **Reduced neuroendocrine and symptomatic responses to subsequent hypoglycemia after 1 episode of hypoglycemia in nondiabetic humans.** *Diabetes* 1991, **40**(2):223-226.
 49. Mookan M, Mitrakou A, Veneman T, Ryan C, Korytkowski M, Cryer P, Gerich J: **Hypoglycemia unawareness in IDDM.** *Diabetes care* 1994, **17**(12):1397-1403.
 50. Criego AB, Tkac I, Kumar A, Thomas W, Gruetter R, Seaquist ER: **Brain glucose concentrations in patients with type 1 diabetes and hypoglycemia unawareness.** *Journal of neuroscience research* 2005, **79**(1-2):42-47.
 51. Hope KM, Tran PO, Zhou H, Oseid E, Leroy E, Robertson RP: **Regulation of alpha-cell function by the beta-cell in isolated human and rat islets deprived of glucose: the "switch-off" hypothesis.** *Diabetes* 2004, **53**(6):1488-1495.
 52. Zhou H, Tran PO, Yang S, Zhang T, LeRoy E, Oseid E, Robertson RP: **Regulation of alpha-cell function by the beta-cell during hypoglycemia in Wistar rats: the "switch-off" hypothesis.** *Diabetes* 2004, **53**(6):1482-1487.
 53. Zhou H, Zhang T, Oseid E, Harmon J, Tonooka N, Robertson RP: **Reversal of defective glucagon responses to hypoglycemia in insulin-dependent autoimmune diabetic BB rats.** *Endocrinology* 2007, **148**(6):2863-2869.
 54. Gopel SO, Kanno T, Barg S, Weng XG, Gromada J, Rorsman P: **Regulation of glucagon release in mouse α -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na^+ channels.** *The Journal of physiology* 2000, **528**(Pt 3):509-520.
 55. Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Barg S, Buschard K, Renstrom E, Rorsman P: **Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the Ca^{2+} current and the number of granules close to the L-type Ca^{2+} channels.** *The Journal of general physiology* 1997, **110**(3):217-228.
 56. MacDonald PE, De Marinis YZ, Ramracheya R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, Cox R, Eliasson L, Rorsman P: **A K ATP channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans.** *PLoS biology* 2007, **5**(6):e143.
 57. Olsen HL, Theander S, Bokvist K, Buschard K, Wollheim CB, Gromada J: **Glucose stimulates glucagon release in single rat alpha-cells by mechanisms that mirror the stimulus-secretion coupling in beta-cells.** *Endocrinology* 2005, **146**(11):4861-4870.
 58. Franklin I, Gromada J, Gjinovci A, Theander S, Wollheim CB: **Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release.** *Diabetes* 2005, **54**(6):1808-1815.
 59. Quoix N, Cheng-Xue R, Mattart L, Zeinoun Z, Guiot Y, Beauvois MC, Henquin JC, Gilon P: **Glucose and pharmacological modulators of ATP-sensitive K^+ channels control $[\text{Ca}^{2+}]_c$ by different mechanisms in isolated mouse alpha-cells.** *Diabetes* 2009, **58**(2):412-421.
 60. Vieira E, Salehi A, Gylfe E: **Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells.** *Diabetologia* 2007, **50**(2):370-379.
 61. Gerich JE, Lorenzi M, Schneider V, Kwan CW, Karam JH, Guillemin R, Forsham PH: **Inhibition of pancreatic glucagon responses to arginine by somatostatin in normal man and in insulin-dependent diabetics.** *Diabetes* 1974, **23**(11):876-880.
 62. Cabrera O, Jacques-Silva MC, Speier S, Yang SN, Kohler M, Fachado A, Vieira E, Zierath JR, Kibbey R, Berman DM *et al*: **Glutamate is a positive autocrine signal for glucagon release.** *Cell metabolism* 2008, **7**(6):545-554.

-
63. Ahren B: **Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease.** *Diabetologia* 2000, **43**(4):393-410.
 64. Bloom SR, Edwards AV, Hardy RN: **The role of the autonomic nervous system in the control of glucagon, insulin and pancreatic polypeptide release from the pancreas.** *The Journal of physiology* 1978, **280**:9-23.
 65. Evans ML, McCrimmon RJ, Flanagan DE, Keshavarz T, Fan X, McNay EC, Jacob RJ, Sherwin RS: **Hypothalamic ATP-sensitive K + channels play a key role in sensing hypoglycemia and triggering counterregulatory epinephrine and glucagon responses.** *Diabetes* 2004, **53**(10):2542-2551.
 66. Marty N, Dallaporta M, Foretz M, Emery M, Tarussio D, Bady I, Binnert C, Beermann F, Thorens B: **Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors.** *The Journal of clinical investigation* 2005, **115**(12):3545-3553.
 67. Schuit FC, Pipeleers DG: **Differences in adrenergic recognition by pancreatic A and B cells.** *Science* 1986, **232**(4752):875-877.
 68. Vieira E, Liu YJ, Gylfe E: **Involvement of alpha1 and beta-adrenoceptors in adrenaline stimulation of the glucagon-secreting mouse alpha-cell.** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2004, **369**(2):179-183.
 69. Asplin CM, Paquette TL, Palmer JP: **In vivo inhibition of glucagon secretion by paracrine beta cell activity in man.** *The Journal of clinical investigation* 1981, **68**(1):314-318.
 70. Maruyama H, Hisatomi A, Orci L, Grodsky GM, Unger RH: **Insulin within islets is a physiologic glucagon release inhibitor.** *The Journal of clinical investigation* 1984, **74**(6):2296-2299.
 71. Samols E, Stagner JL: **Intra-islet regulation.** *The American journal of medicine* 1988, **85**(5A):31-35.
 72. Weir GC, Knowlton SD, Atkins RF, McKennan KX, Martin DB: **Glucagon secretion from the perfused pancreas of streptozotocin-treated rats.** *Diabetes* 1976, **25**(4):275-282.
 73. Bhatena SJ, Oie HK, Gazdar AF, Voyles NR, Wilkins SD, Recant L: **Insulin, glucagon, and somatostatin receptors on cultured cells and clones from rat islet cell tumor.** *Diabetes* 1982, **31**(6 Pt 1):521-531.
 74. Patel YC, Amherdt M, Orci L: **Quantitative electron microscopic autoradiography of insulin, glucagon, and somatostatin binding sites on islets.** *Science* 1982, **217**(4565):1155-1156.
 75. Nauck M, Schmidt WE, Ebert R, Strietzel J, Cantor P, Hoffmann G, Creutzfeldt W: **Insulinotropic properties of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in man: interactions with glucose, phenylalanine, and cholecystokinin-8.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1989, **69**(3):654-662.
 76. Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR: **Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man.** *Lancet* 1987, **2**(8571):1300-1304.
 77. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W: **Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes.** *Diabetologia* 1986, **29**(1):46-52.
 78. Baggio LL, Drucker DJ: **Biology of incretins: GLP-1 and GIP.** *Gastroenterology* 2007, **132**(6):2131-2157.
 79. Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF: **Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-**

-
- translational processing.** *The Journal of biological chemistry* 1986, **261**(25):11880-11889.
80. Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C: **Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem.** *Neuroscience* 1997, **77**(1):257-270.
81. Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FG, Poulsen SS, Nielsen OV: **Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas.** *Endocrinology* 1986, **119**(4):1467-1475.
82. Holst JJ: **The physiology of glucagon-like peptide 1.** *Physiological reviews* 2007, **87**(4):1409-1439.
83. Schmidt WE, Siegel EG, Creutzfeldt W: **Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets.** *Diabetologia* 1985, **28**(9):704-707.
84. Holz GG: **Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell.** *Diabetes* 2004, **53**(1):5-13.
85. Willms B, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Nauck MA: **Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1996, **81**(1):327-332.
86. Komatsu R, Matsuyama T, Namba M, Watanabe N, Itoh H, Kono N, Tarui S: **Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide I-(7-36)-amide.** *Diabetes* 1989, **38**(7):902-905.
87. Prigeon RL, Quddusi S, Paty B, D'Alessio DA: **Suppression of glucose production by GLP-1 independent of islet hormones: a novel extrapancreatic effect.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2003, **285**(4):E701-707.
88. Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, Perfetti R: **Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats.** *Endocrinology* 2002, **143**(11):4397-4408.
89. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S: **Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats.** *Diabetes* 1999, **48**(12):2270-2276.
90. Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM: **Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells.** *Diabetes* 1999, **48**(12):2358-2366.
91. Behme MT, Dupre J, McDonald TJ: **Glucagon-like peptide 1 improved glycemic control in type 1 diabetes.** *BMC endocrine disorders* 2003, **3**(1):3.
92. Creutzfeldt WO, Kleine N, Willms B, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA: **Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients.** *Diabetes care* 1996, **19**(6):580-586.
93. Kielgast U, Asmar M, Madsbad S, Holst JJ: **Effect of glucagon-like peptide-1 on alpha- and beta-cell function in C-peptide-negative type 1 diabetic patients.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2010, **95**(5):2492-2496.
-

-
94. Rachman J, Barrow BA, Levy JC, Turner RC: **Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM.** *Diabetologia* 1997, **40**(2):205-211.
 95. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ: **Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study.** *Lancet* 2002, **359**(9309):824-830.
 96. Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF, Rizza RA: **Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2000, **85**(11):4053-4059.
 97. Shah P, Basu A, Basu R, Rizza R: **Impact of lack of suppression of glucagon on glucose tolerance in humans.** *The American journal of physiology* 1999, **277**(2 Pt 1):E283-290.
 98. Kjems LL, Holst JJ, Volund A, Madsbad S: **The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects.** *Diabetes* 2003, **52**(2):380-386.
 99. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ: **Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH2-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects.** *Diabetes* 1995, **44**(9):1126-1131.
 100. Dunning BE, Foley JE, Ahren B: **Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1.** *Diabetologia* 2005, **48**(9):1700-1713.
 101. Kendall DM, Cuddihy RM, Bergenstal RM: **Clinical application of incretin-based therapy: therapeutic potential, patient selection and clinical use.** *European journal of internal medicine* 2009, **20 Suppl 2**:S329-339.
 102. Unger RH, Orci L: **The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus.** *Lancet* 1975, **1**(7897):14-16.
 103. Piro S, Maniscalchi ET, Monello A, Pandini G, Mascali LG, Rabuazzo AM, Purrello F: **Palmitate affects insulin receptor phosphorylation and intracellular insulin signal in a pancreatic alpha-cell line.** *Endocrinology* 2010, **151**(9):4197-4206.
 104. Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patane 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.
 105. Marchetti P BR, D'Aleo V. : **Alterazioni funzionali e di massa delle beta-cellule nel diabete di tipo 2.** *G It Diabetol Metab* 2008, **28**:19-25
 106. Ishihara H, Maechler P, Gjnovci A, Herrera PL, Wollheim CB: **Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells.** *Nature cell biology* 2003, **5**(4):330-335.
 107. Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY: **Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function.** *Diabetes* 2001, **50**(1):69-76.
 108. Raju B, Cryer PE: **Loss of the decrement in intraislet insulin plausibly explains loss of the glucagon response to hypoglycemia in insulin-deficient diabetes: documentation of the intraislet insulin hypothesis in humans.** *Diabetes* 2005, **54**(3):757-764.

-
109. Rorsman P, Berggren PO, Bokvist K, Ericson H, Mohler H, Ostenson CG, Smith PA: **Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABAA-receptor chloride channels.** *Nature* 1989, **341**(6239):233-236.
 110. Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL: **Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress.** *Endocrinology* 2004, **145**(11):5087-5096.
 111. Hamaguchi K, Leiter EH: **Comparison of cytokine effects on mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines. Viability, secretory function, and MHC antigen expression.** *Diabetes* 1990, **39**(4):415-425.
 112. Boden G: **Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM.** *Diabetes* 1997, **46**(1):3-10.
 113. Boden G, Jadali F, White J, Liang Y, Mozzoli M, Chen X, Coleman E, Smith C: **Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men.** *The Journal of clinical investigation* 1991, **88**(3):960-966.
 114. Hong J, Abudula R, Chen J, Jeppesen PB, Dyrskog SE, Xiao J, Colombo M, Hermansen K: **The short-term effect of fatty acids on glucagon secretion is influenced by their chain length, spatial configuration, and degree of unsaturation: studies in vitro.** *Metabolism: clinical and experimental* 2005, **54**(10):1329-1336.
 115. Hong J, Chen L, Jeppesen PB, Nordentoft I, Hermansen K: **Stevioside counteracts the alpha-cell hypersecretion caused by long-term palmitate exposure.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2006, **290**(3):E416-422.
 116. Xiao J, Gregersen S, Kruhoffer M, Pedersen SB, Orntoft TF, Hermansen K: **The effect of chronic exposure to fatty acids on gene expression in clonal insulin-producing cells: studies using high density oligonucleotide microarray.** *Endocrinology* 2001, **142**(11):4777-4784.
 117. Schuh K, Pahl A: **Inhibition of the MAP kinase ERK protects from lipopolysaccharide-induced lung injury.** *Biochemical pharmacology* 2009, **77**(12):1827-1834.
 118. Wang H, Wang AX, Liu Z, Barrett EJ: **Insulin signaling stimulates insulin transport by bovine aortic endothelial cells.** *Diabetes* 2008, **57**(3):540-547.
 119. Malaguarnera R, Vella V, Pandini G, Sanfilippo M, Pezzino V, Vigneri R, Frasca F: **TAp73 alpha increases p53 tumor suppressor activity in thyroid cancer cells via the inhibition of Mdm2-mediated degradation.** *Molecular cancer research : MCR* 2008, **6**(1):64-77.
 120. Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, Yoakim M, Schaffhausen B, Shoelson S, Cantley LC: **Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit.** *The Journal of biological chemistry* 1993, **268**(13):9478-9483.
 121. Lavan BE, Kuhne MR, Garner CW, Anderson D, Reedijk M, Pawson T, Lienhard GE: **The association of insulin-elicited phosphotyrosine proteins with src homology 2 domains.** *The Journal of biological chemistry* 1992, **267**(16):11631-11636.
 122. Mikkola I, Bruun JA, Bjorkoy G, Holm T, Johansen T: **Phosphorylation of the transactivation domain of Pax6 by extracellular signal-regulated kinase and**

-
- p38 mitogen-activated protein kinase.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(21):15115-15126.
123. Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, Liu S, Wendt A, Deng S, Ebina Y *et al*: **Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system.** *Cell metabolism* 2006, **3**(1):47-58.
124. Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J, Liew CW, Shih JL, Ford EL, Herrera PL, Polonsky KS, McGuinness OP, Kulkarni RN: **Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo.** *Cell metabolism* 2009, **9**(4):350-361.
125. Gromada J, Duttaroy A, Rorsman P: **The insulin receptor talks to glucagon?** *Cell metabolism* 2009, **9**(4):303-305.
126. Turque N, Plaza S, Radvanyi F, Carriere C, Saule S: **Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells.** *Molecular endocrinology* 1994, **8**(7):929-938.
127. Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS: **Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development.** *Genes & development* 1997, **11**(13):1662-1673.
128. St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P: **Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas.** *Nature* 1997, **387**(6631):406-409.
129. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ: **Apoptosis: controlled demolition at the cellular level.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2008, **9**(3):231-241.
130. Treszl A, Szereday L, Doria A, King GL, Orban T: **Elevated C-reactive protein levels do not correspond to autoimmunity in type 1 diabetes.** *Diabetes care* 2004, **27**(11):2769-2770.
131. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: **C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2001, **286**(3):327-334.
132. Thorand B, Lowel H, Schneider A, Kolb H, Meisinger C, Frohlich M, Koenig W: **C-reactive protein as a predictor for incident diabetes mellitus among middle-aged men: results from the MONICA Augsburg cohort study, 1984-1998.** *Archives of internal medicine* 2003, **163**(1):93-99.
133. Vozarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA: **High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes.** *Diabetes* 2002, **51**(2):455-461.
134. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P: **Caspases in cell survival, proliferation and differentiation.** *Cell death and differentiation* 2007, **14**(1):44-55.
135. 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.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, **85**(23):9037-9041.
136. 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.** *Journal of immunological methods* 1991, **139**(2):271-279.
137. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.

-
138. Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomashevsky M, Marshall KA *et al*: **NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data**. *Nucleic acids research* 2009, **37**(Database issue):D885-890.
 139. Kutlu B, Burdick D, Baxter D, Rasschaert J, Flamez D, Eizirik DL, Welsh N, Goodman N, Hood L: **Detailed transcriptome atlas of the pancreatic beta cell**. *BMC medical genomics* 2009, **2**:3.
 140. Cui X, Churchill GA: **Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments**. *Genome biology* 2003, **4**(4):210.
 141. Agrawal S, Dimitrova N, Nathan P, Udayakumar K, Lakshmi SS, Sriram S, Manjusha N, Sengupta U: **T2D-Db: an integrated platform to study the molecular basis of Type 2 diabetes**. *BMC genomics* 2008, **9**:320.
 142. Hulbert EM, Smink LJ, Adlem EC, Allen JE, Burdick DB, Burren OS, Cassen VM, Cavnor CC, Dolman GE, Flamez D *et al*: **T1DBase: integration and presentation of complex data for type 1 diabetes research**. *Nucleic acids research* 2007, **35**(Database issue):D742-746.
 143. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F: **The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes**. *Nature reviews Endocrinology* 2009, **5**(4):219-226.
 144. R. Scandurra LP, A. Beretta Anguissola, R. Lauro, R. De Piro.: **I recettori per gli ormoni**. 1981.
 145. Sachdev D, Yee D: **Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy**. *Molecular cancer therapeutics* 2007, **6**(1):1-12.
 146. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A: **Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)**. *Cell* 1993, **75**(1):59-72.
 147. Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercole AJ, Davenport ML, Efstratiadis A: **Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds**. *Developmental biology* 1996, **177**(2):517-535.
 148. Di Cola G, Cool MH, Accili D: **Hypoglycemic effect of insulin-like growth factor-1 in mice lacking insulin receptors**. *The Journal of clinical investigation* 1997, **99**(10):2538-2544.
 149. Takaki R, Ono J, Nakamura M, Yokogawa Y, Kumae S, Hiraoka T, Yamaguchi K, Hamaguchi K, Uchida S: **Isolation of glucagon-secreting cell lines by cloning insulinoma cells**. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 1986, **22**(3 Pt 1):120-126.
 150. Beale EG: **Insulin Signaling and Insulin Resistance**. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 2012.
 151. Filippi BM, Yang CS, Tang C, Lam TK: **Insulin activates Erk1/2 signaling in the dorsal vagal complex to inhibit glucose production**. *Cell metabolism* 2012, **16**(4):500-510.
 152. Ramalingam L, Oh E, Thurmond DC: **Novel roles for insulin receptor (IR) in adipocytes and skeletal muscle cells via new and unexpected substrates**. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2012.

153. Agardh E, Allebeck P, Hallqvist J, Moradi T, Sidorchuk A: **Type 2 diabetes incidence and socio-economic position: a systematic review and meta-analysis.** *International journal of epidemiology* 2011, **40**(3):804-818.
154. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM: **Glucose sensing in L cells: a primary cell study.** *Cell metabolism* 2008, **8**(6):532-539.
155. Xu G, Kaneto H, Laybutt DR, Duvivier-Kali VF, Trivedi N, Suzuma K, King GL, Weir GC, Bonner-Weir S: **Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes.** *Diabetes* 2007, **56**(6):1551-1558.
156. Holst JJ, Deacon CF: **Glucagon-like peptide-1 mediates the therapeutic actions of DPP-IV inhibitors.** *Diabetologia* 2005, **48**(4):612-615.
157. De Marinis YZ, Salehi A, Ward CE, Zhang Q, Abdulkader F, Bengtsson M, Braha O, Braun M, Ramracheya R, Amisten S *et al*: **GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca²⁺ channel-dependent exocytosis.** *Cell metabolism* 2010, **11**(6):543-553.
158. Sengupta R, Sun T, Warrington NM, Rubin JB: **Treating brain tumors with PDE4 inhibitors.** *Trends in pharmacological sciences* 2011, **32**(6):337-344.
159. Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M: **Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition.** *Islets* 2010, **2**(3):135-145.
160. Kisanuki K, Kishikawa H, Araki E, Shirotani T, Uehara M, Isami S, Ura S, Jinnouchi H, Miyamura N, Shichiri M: **Expression of insulin receptor on clonal pancreatic alpha cells and its possible role for insulin-stimulated negative regulation of glucagon secretion.** *Diabetologia* 1995, **38**(4):422-429.
161. McGirr R, Ejibick CE, Carter DE, Andrews JD, Nie Y, Friedman TC, Dhanvantari S: **Glucose dependence of the regulated secretory pathway in alphaTC1-6 cells.** *Endocrinology* 2005, **146**(10):4514-4523.
162. Mizusawa N, Hasegawa T, Ohigashi I, Tanaka-Kosugi C, Harada N, Itakura M, Yoshimoto K: **Differentiation phenotypes of pancreatic islet beta- and alpha-cells are closely related with homeotic genes and a group of differentially expressed genes.** *Gene* 2004, **331**:53-63.
163. Wang J, Webb G, Cao Y, Steiner DF: **Contrasting patterns of expression of transcription factors in pancreatic alpha and beta cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(22):12660-12665.
164. Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, Grieco FA, Del Guerra S, D'Aleo V, Piro S, Marselli L *et al*: **A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets.** *Diabetologia* 2012, **55**(12):3262-3272.
165. Masur K, Tibaduiza EC, Chen C, Ligon B, Beinborn M: **Basal receptor activation by locally produced glucagon-like peptide-1 contributes to maintaining beta-cell function.** *Molecular endocrinology* 2005, **19**(5):1373-1382.