



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA, GENETICA
UMANA E BIOINFORMATICA: BASI CELLULARI E
MOLECOLARI DEL FENOTIPO (XXVI CICLO)**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGICHE

Dott. Angelo Giuseppe Condorelli

**Basi molecolari della differente risposta delle
cellule α e β del pancreas di mammifero
all'apoptosi mediata da citochine: implicazioni
patogenetiche nel Diabete Mellito**

Tesi di Dottorato

Coordinatore e Tutor:

Chiar. mo Prof. Michele Purrello
ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

INDICE

SCOPO DEL LAVORO **1**

INTRODUZIONE **2**

IL PANCREAS: COMPONENTE ESOCRINA ED ENDOCRINA	2
LA CELLULA <i>ALPHA</i> PANCREATICA	4
ASSETTO MOLECOLARE DELLA CELLULA <i>ALPHA</i> PANCREATICA E RUOLO NEL TRANSDIFFERENZIAMENTO	6
RUOLO DELLE <i>ALPHA</i> CELLULE NEL DIABETE MELLITO	10
LA CELLULA <i>BETA</i> PANCREATICA	11
ESPRESSIONE GENICA NELLA <i>BETA</i> CELLULA PANCREATICA	12
IL PROTEOMA DELLA <i>BETA</i> CELLULA PANCREATICA	16
FENOTIPO DELLA <i>BETA</i> CELLULA PANCREATICA: PROLIFERAZIONE E SUSCETTIBILITÀ ALL' APOPTOSI	17
DIABETE MELLITO: CARATTERISTICHE, EPIDEMIOLOGIA E GENOMICA	20
RUOLO DEL SISTEMA IMMUNITARIO NEL DIABETE MELLITO DI TIPO 1	24
RUOLO DEL SISTEMA IMMUNITARIO NEL DIABETE MELLITO DI TIPO 2	28
RUOLO DELLE CITOCINE NELL' APOPTOSI DELLE <i>BETA</i> CELLULE	29
MECCANISMI MOLECOLARI DELLA DISTRUZIONE <i>BETA</i> CELLULARE MEDIATA DALLE CITOCINE	30
LA FAMIGLIA DI FATTORI DI TRASCRIZIONE C/EBP	34
RUOLO DEI MEMBRI DELLA FAMIGLIA C/EBP NELLA <i>BETA</i> CELLULA PANCREATICA	35
IL FATTORE DI TRASCRIZIONE C/EBPA	37
IL RUOLO DI C/EBPA NELLA PROLIFERAZIONE E L' APOPTOSI	38
I MICRORNA E LA <i>BETA</i> CELLULA	40
I MICRORNA CIRCOLANTI COME BIOMARCATORI DEL DIABETE MELLITO	42
MICRORNA NELLO SVILUPPO E DIFFERENZIAMENTO DEL PANCREAS ENDOCRINO	42
I FATTORI DI TRASCRIZIONE NEL <i>COMMITMENT</i> DELLA LINEA ENDOCRINA	43
DIFFERENZIAMENTO E DE-DIFFERENZIAMENTO	45
<i>DISALLOWED GENES</i> E RUOLO DEI MICRORNA	47
PROSPETTIVE TERAPEUTICHE	48

MATERIALI E METODI **52**

LINEE CELLULARI NELLO STUDIO DEL DIABETE MELLITO	52
ESTRAZIONE DELL' RNA TOTALE E <i>REAL-TIME</i> PCR	53
ANALISI DELL' ESPRESSIONE DEI MICRORNA	53
ANALISI DELL' ESPRESSIONE DEI GENI <i>CORE</i> DELL' APOPTOSI	54
ESPERIMENTI DI TRASFEZIONE	54
<i>ANALISI WESTERN</i>	55
VALUTAZIONE DELL' APOPTOSI	55
IDENTIFICAZIONE <i>IN SILICO</i> DEI <i>TARGETS</i> DEI MICRORNA	56
PREDIZIONE DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE PER I MICRORNA 296-3P E 298-5P	57
IDENTIFICAZIONE DELLE ISOLE CpG	57
ANALISI DEI <i>NETWORKS</i>	57
ANALISI STATISTICHE	58
NOMENCLATURA DI GENI E PROTEINE	58

RISULTATI	59
INDUZIONE DELL' APOPTOSI NELLE CELLULE ATC1-6 E BTC1	59
PROFILO D' ESPRESSIONE DEI MICRORNA NELLE CELLULE ATC1-6 E BTC1 A <i>STEADY STATE</i>	59
PROFILO D' ESPRESSIONE DEI MICRORNA NELLE CELLULE ATC1-6 DOPO TRATTAMENTO CON CITOCHINE	60
ESPRESSIONE DEI MICRORNA 296-3P E 298-5P IN ATC1-6 TRATTATE CON CITOCHINE	60
LE CELLULE ATC1-6, TRASFETTATE CON <i>MIMICS</i> DEI MICRORNA 296-3P E -298-5P E TRATTATE CON CITOCHINE, AUMENTANO IL TASSO DI APOPTOSI RISPETTO ALLE CORRISPONDENTI CELLULE CONTROLLO	63
L' ESPRESSIONE DI <i>IGF1R</i> E <i>TNFA</i> È MODULATA DAI MICRORNA 296-3P E 298-5P	64
GENOMICA DEI GENI CODIFICANTI I MICRORNA 296-3P E 298-5P	68
IDENTIFICAZIONE DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE DEI MICRORNA	68
<i>NETWORK</i> REGOLATORIA IN CELLULE ATC1-6 E BTC1 A <i>STEADY STATE</i>	69
PROFILO D' ESPRESSIONE DI 92 GENI <i>CORE</i> DELL' APOPTOSI NELLE CELLULE ATC1-6 E BTC1 TRATTATE CON CITOCHINE	70
IL-1B, IFNG E TNFA UP-REGOLANO L' ESPRESSIONE DI <i>CEBPA</i> SIA A LIVELLO DI mRNA CHE A LIVELLO DI PROTEINA NELLE BTC1	75
IL <i>KNOCKDOWN</i> DI CEBPA CON SPECIFICI <i>SMALL INTERFERING RNAs</i> DIMINUISCE I LIVELLI DI APOPTOSI IN CELLULE BTC1 TRATTATE CON CITOCHINE	76
<i>CEBPA</i> ESERCITA IL SUO RUOLO PROAPOPTOTICO MEDIANTE I SUOI <i>TARGETS</i> TRASCRIZIONALI: <i>ARL6IP5</i> E <i>TNFRSF10B</i>	77
IL <i>KNOCKDOWN</i> DI <i>ARL6IP5</i> E <i>TNFRSF10B</i> CON SPECIFICI <i>SMALL INTERFERING RNA</i> DIMINUISCE I LIVELLI DI APOPTOSI IN CELLULE BTC1 TRATTATE CON CITOCHINE	80
ESPRESSIONE DI <i>CEBPA</i> DOPO INDUZIONE DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE <i>BETA</i> CELLULARE <i>PDX-1</i>	81
RICOSTRUZIONE DEL <i>NETWORK</i> TRASCRIZIONALE A VALLE DI CEBPA	81
DISCUSSIONE	84
CONCLUSIONI	90
BIBLIOGRAFIA	91
MATERIALE SUPPLEMENTARE	102

SCOPO DEL LAVORO

L'apoptosi è considerata la forma principale di morte delle β cellule pancreatiche, produttrici di insulina, nel Diabete mellito di tipo 1 (T1DM) e di tipo 2 (T2DM). Nel T1DM (la forma autoimmune della patologia), l'apoptosi è il risultato di una complessa cascata di eventi che iniziano con l'esposizione delle β cellule pancreatiche a molecole citotossiche espresse o secrete dalle cellule del sistema immunitario, che sono penetrate nell'isola del Langerhans nel corso dell'insulite; tra le citochine proinfiammatorie l'IL-1 β , l'IFN γ ed il TNF α rappresentano i principali effettori di questi eventi. E' interessante notare come l'azione deleteria delle citochine sia rivolta in maggior grado alle cellule β pancreatiche, mentre le cellule α risultano più resistenti ai loro effetti citotossici. Sebbene le *pathways* proapoptotiche attivate dalle citochine nelle β cellule siano state descritte (anche se non in modo completamente esauriente), i meccanismi molecolari alla base della risposta differenziale dei due tipi cellulari sono rimasti fondamentalmente inesplorati.

Il nostro gruppo di ricerca è stato tra i primi ad utilizzare un approccio sperimentale di tipo sistemico per caratterizzare il profilo di espressione e la funzione biologica di microRNA e geni codificanti per proteine in cellule α TC1-6 e β TC1 trattate con citochine proinfiammatorie, un sistema modello che mima *in vitro* lo stato infiammatorio cronico del DM.

Scopo di questo lavoro è stato: (i) descrivere i meccanismi molecolari responsabili della resistenza delle cellule α pancreatiche e della suscettibilità delle cellule β all'apoptosi indotta da citochine proinfiammatorie (IL-1 β , IFN γ , TNF α); (ii) identificare nuovi marcatori β cellulari di disfunzione. L'analisi dell'espressione genica differenziale in due linee cellulari murine (α TC1-6 e β TC1) in condizioni fisiologiche (*steady state*) e dopo trattamento con citochine ci ha permesso di caratterizzare: (1) il ruolo dei microRNA 296-3p e 298-5p nella resistenza all'apoptosi citochino-mediata delle cellule α TC1-6 [1]; (2) il ruolo del fattore trascrizionale C/EBP α nell'apoptosi delle cellule β TC1 [2].

INTRODUZIONE

Il pancreas: componente esocrina ed endocrina

Il pancreas è una grossa ghiandola addominale che svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi dei nutrienti attraverso la secrezione di enzimi ed ormoni. Quest'organo è costituito da due *componenti* cellulari, diverse morfologicamente e funzionalmente: la componente cellulare esocrina e la componente cellulare endocrina. La porzione esocrina del pancreas rappresenta circa il 95-99% dell'organo *in toto* e comprende le cellule acinari e le cellule duttali. Le cellule acinari sono raggruppate in lobuli e producono enzimi digestivi (lipasi, proteasi e nucleasi), che vengono riversati all'interno di un complesso *network* di tubuli, chiamati dotti pancreatici, costituiti dalle cellule epiteliali duttali. Le cellule epiteliali duttali secernono liquidi (1-2 litri al giorno), elettroliti (*in primis*, Na^+ e K^+ , rispettivamente alla concentrazione di 140 mmol/L e 10-15 mmol/L) e ioni bicarbonato (HCO_3^-), che insieme agli enzimi esocrini vengono trasportati attraverso i dotti pancreatici al duodeno. La secrezione da parte della componente esocrina del pancreas avviene in risposta a stimoli fisiologici, principalmente la secretina e l'innervazione vagale (Fig. 1).

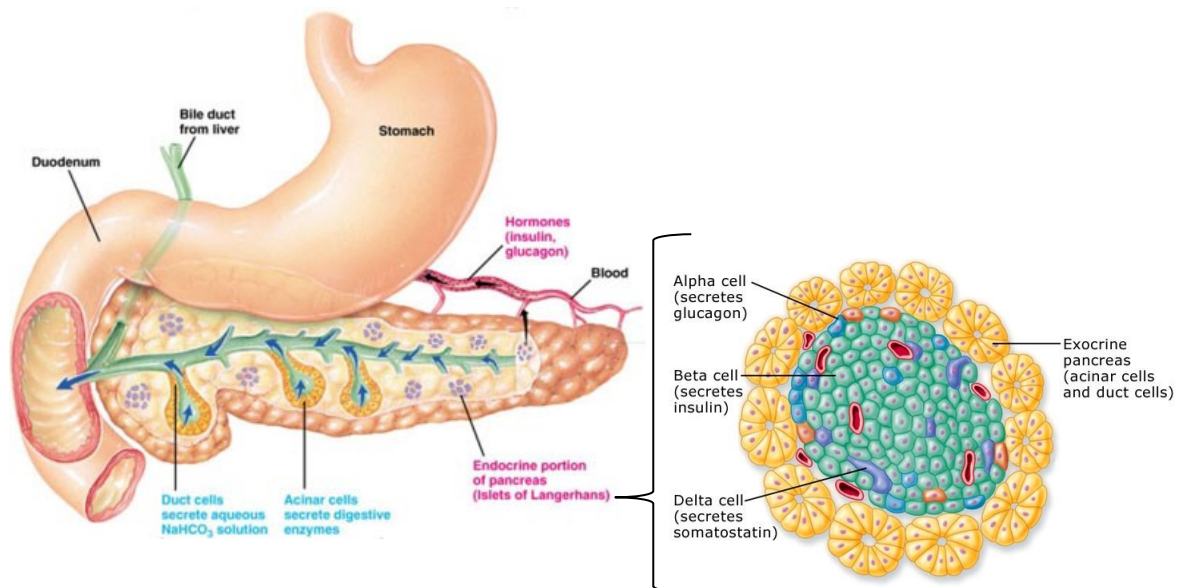


Figura 1. Struttura anatomica del pancreas e cito-architettura dell'isola del Langerhans nell'Uomo.

La porzione endocrina del pancreas rappresenta anatomicamente solo una piccola porzione dell'organo (1-2% della massa totale) e secerne ormoni che regolano il metabolismo e l'omeostasi energetica. Il pancreas endocrino è composto da cellule organizzate in piccoli *clusters* sferoidali dal diametro di circa 100-500 μm dispersi nel parenchima esocrino della ghiandola e detti isole del Langerhans. Le isole del Langerhans sono dei veri e propri microorgani, ognuno di essi comprende circa 1000 cellule appartenenti ad almeno cinque diversi tipi cellulari (α , β , δ , ϵ , cellule PP), caratterizzati dalla produzione e secrezione di uno specifico prodotto ormonale.

Le isole del Langerhans sono altamente vascolarizzate ed innervate dal sistema simpatico, parasimpatico e sensoriale.

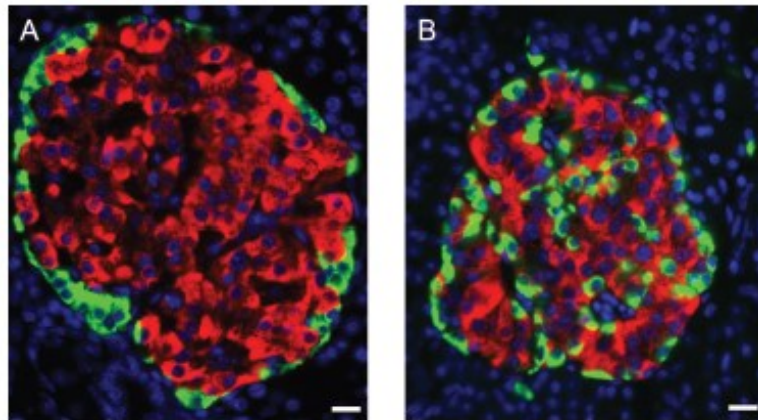


Figura 2. Organizzazione dell'isola del Langerhans murina (A) ed umana (B). Sezioni pancreatiche di pancreas di ratto adulto (A) e umane (B) sono state marcate con anticorpi anti-insulina (rosso) ed anti-glucagone (verde). I nuclei sono stati colorati con Hoechst 33342 (blu). *Scale bars* = 12.5 μm (Immagine tratta da [3]).

Le isole pancreatiche non presentano in tutti gli organismi una stessa struttura morfologica ed abbondanza relativa di ciascuna tipologia cellulare; ad esempio, nei roditori ogni isola è costituita per il 70-80% da β cellule, per il 5% da δ cellule e per il 15-20% da α cellule o cellule PP; le isole murine adulte hanno inoltre una citoarchitettura caratteristica, con le β cellule disposte nella porzione centrale dell'isola (*core*) e le cellule “non- β ” nelle aree periferiche, in una porzione detta mantello [4]. Al contrario, l'isola umana è costituita soltanto per il 55% da β cellule e per circa il 35% da cellule α ; inoltre, a differenza di quanto avviene nei roditori, la citoarchitettura insulare vede le cellule “non- β ” disperse tra le cellule β (Fig. 2). Queste particolari disposizioni spaziali delle cellule componenti l'isola del Langerhans sono alla base di meccanismi regolatori paracrini ed interazioni cellula-cellula, che contribuiscono al fine controllo dell'omeostasi energetica. Nell'uomo, il 70% delle interazioni delle β cellule con le altre cellule dell'isola pancreatica umana ha caratteristiche eterotipiche e la maggior parte di esse è diretta verso la cellula α pancreatica [5].

La cellula α pancreatica

Il controllo della glicemia da parte delle cellule dell'isola del Langerhans si realizza principalmente mediante l'azione degli ormoni glucagone ed insulina, secreti rispettivamente dalle cellule α e β pancreatiche. Il glucagone viene secreto in risposta alle basse concentrazioni di glucosio ematico (*e.g.*, lontano dai pasti) ed ha un effetto catabolico “iperglicemizzante”: attiva infatti la glicogenolisi e la gluconeogenesi nel fegato ed in altri tessuti bersaglio determinando un aumento delle concentrazioni di glucosio ematico. Al contrario, l'insulina ha un effetto “ipoglicemizzante” ed è rilasciata dalle β cellule quando i livelli di glucosio ematico aumentano; questo ormone agisce a livello di diversi tessuti (muscolo, fegato, tessuto adiposo), promuovendo l'accumulo del glucosio sotto forma di glicogeno e grasso. Un anomalo funzionamento di questi due tipi cellulari si traduce in un mancato controllo della glicemia e nello sviluppo del Diabete Mellito. Sebbene l'insulina rimanga in ambito diabetologico il principale *topic* clinico e terapeutico, recentemente è stato rivalutato il ruolo del glucagone nella patogenesi del Diabete mellito; è noto, infatti, che gli eccessivi livelli plasmatici di questo ormone (iperglucagonemia) contribuiscono a stabilizzare ed aggravare la condizione iperglicemica nel paziente diabetico [6]. Nonostante il ruolo delle cellule α e del loro principale prodotto ormonale, il glucagone, nella regolazione della glicemia e dell'omeostasi dei nutrienti, le informazioni sulla fisiologia di queste cellule sono state per molto tempo abbastanza limitate, soprattutto se paragonate alla grande quantità di dati relativi alle cellule β . Diversi fattori possono contribuire a spiegare questo *gap* nella conoscenza; *in primis* la scarsa abbondanza delle cellule α nelle isole pancreatiche degli organismi modello più diffusi (topi e ratti) e le limitazioni tecniche nelle metodiche convenzionali di analisi e purificazione [7,8]. Le cellule α pancreatiche sono equipaggiate con uno specifico set di canali ionici che generano potenziali d'azione di Na^+ e Ca^{2+} in assenza o a bassi livelli di glucosio, l'“attività elettrica” generata è responsabile della mobilitazione del Ca^{2+} e della secrezione del glucagone. Il modello che descrive in maniera molto semplice la secrezione del glucosio nelle cellule α murine è il seguente: bassi livelli di glucosio determinano un basso rapporto intracellulare ATP/ADP; la bassa concentrazione di ATP è responsabile di una moderata attività nei canali K^+ ATP-dipendenti (K_{ATP}) che in queste condizioni mantengono il potenziale di membrana a -60 mV. A questo voltaggio i canali Ca^{2+} di tipo T si aprono e depolarizzano la membrana a livelli che consentono l'apertura di canali Na^+ e Ca^{2+} di tipo N; l'ingresso di Ca^{2+} induce la secrezione del glucagone. La ripolarizzazione è mediata da canali K^+ di tipo A. L'aumento del glucosio extracellulare e la sua internalizzazione determina un innalzamento del rapporto ATP/ADP, un evento che blocca l'attività dei canali K^+ ATP-dipendenti (K_{ATP}) depolarizzando la cellula α a livelli che bloccano l'attività dei canali voltaggio dipendenti (Fig. 3).

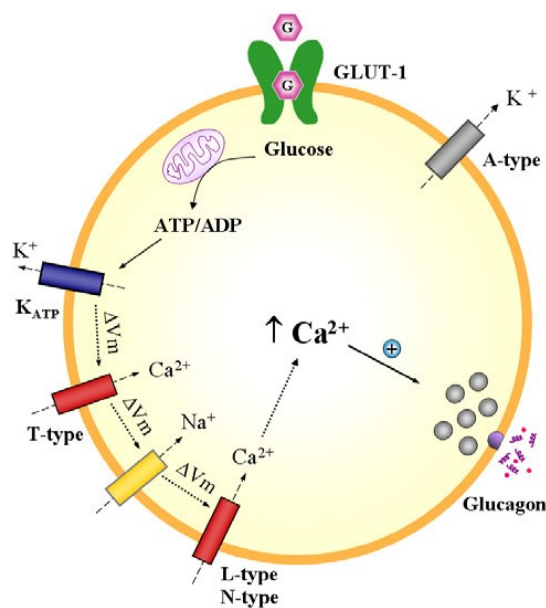


Figura 3. Modello per la secrezione del glucagone glucosio-dipendente nella cellula α pancreatica murina (Immagine tratta da [9]).

Insieme a questo meccanismo di regolazione glucosio-dipendente della secrezione di glucagone esiste un complesso *network* regolatorio glucosio-indipendente detto *HENAMI network* (*Hepato-Enteral, Neuronal, Adipo-Muscular, Islet*) che coinvolge diversi distretti dell'organismo (Fig. 4), compresa la stessa isola pancreatica. All'interno dell'isola pancreatica, le cellule β esercitano l'effetto paracrina inibitorio più importante attraverso la co-secrezione di insulina, amilina e zinco.

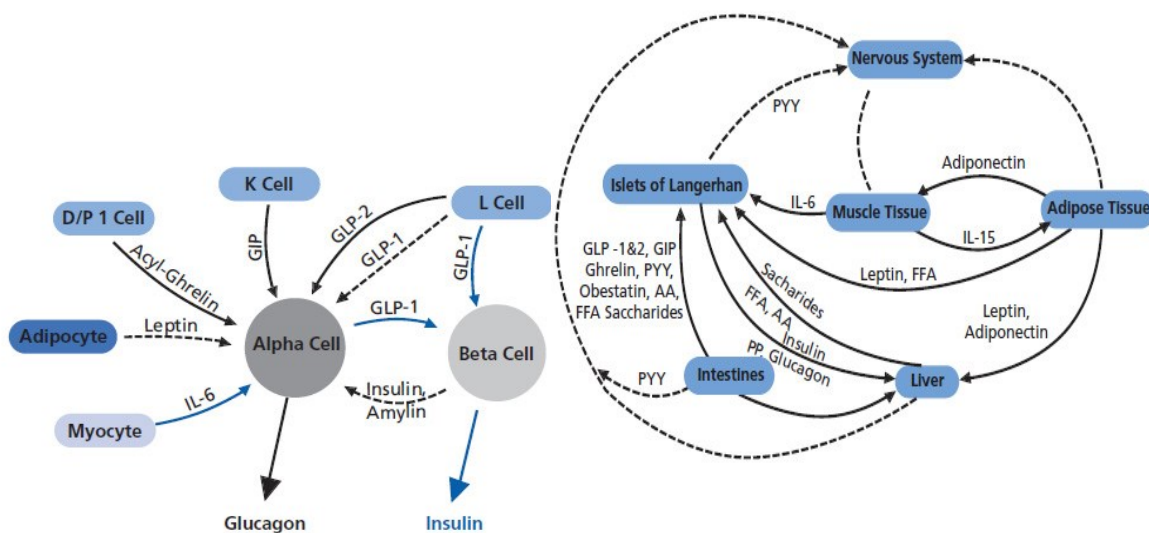


Figura 4. Il *network* HENAMI di regolazione della secrezione del glucagone (Immagine tratta da [10]).

Assetto molecolare della cellula α pancreatica e ruolo nel transdifferenziamento

Numerosi studi sottolineano l'importanza dell' α cellula e dei suoi prodotti ormonali, glucagone e GLP-1, nella regolazione della funzionalità e della proliferazione delle β cellule. E' stato dimostrato che in presenza di fattori "stressogeni" per le β cellule (es. gluco-lipotossicità, gravidanza, trattamento con streptozotocina, stati diabetici) la cellula α può "venire in soccorso" della cellula β proliferando (iperplasia α cellulare) e secernendo il GLP-1, un fattore di crescita e di sopravvivenza per le cellule β [11]. I meccanismi molecolari alla base dell'iperplasia α cellulare non sono stati pienamente caratterizzati; uno dei modelli proposti vede la produzione

GLP-1, struttura e funzione

Nel 1983, è stato isolato il gene codificante per il glucagone ed è stato scoperto che dal suo prodotto proteico, il proglucagone, si originano per diverso clivaggio enzimatico oltre che il glucagone anche due peptidi *glucagon-like*, GLP-1 e GLP-2. Nelle cellule α -pancreatiche PC2 (*Prohormone Convertase 2*) è responsabile della formazione del glucagone; mentre nelle cellule L intestinali PC1/3 (*Prohormone Convertase 1/3*) determina la formazione dei peptidi GLP. GLP-1 insieme a GIP (*Gastric Inhibitory Polypeptide*) è un potente ormone incretinico che aumenta la secrezione di insulina glucosio-dipendente. In aggiunta al ruolo insulino-tropico GLP-1 e GLP-2 sono importanti fattori di crescita e sopravvivenza per diversi tipi cellulari, tra cui le β cellule pancreatiche.

stress-mediata da parte delle β cellule di chemochine come CXCL12 [*chemokine (C-X-C motif) ligand 12*] o di citochine come l' IL-6 che agirebbero in maniera paracrina sulle cellule α determinandone la transizione dallo stato differenziato (α cellula) ad uno de-differenziato/multipotente (pro- α -cellula) [12]. Di recente scoperta è proprio la capacità delle cellule α di "riprogrammarsi" nel fenotipo β cellulare, un evento tecnicamente detto di transdifferenziamento. L'espressione ectopica del fattore di trascrizione *Pax4* in progenitori murini della linea α cellulare determina la loro riprogrammazione a β cellule; le β cellule neoformate esprimono marcatori α -specifici a testimonianza di una derivazione diretta da progenitori α cellulari. La popolazione di cellule β che si sviluppa dopo la sovra-espressione di *Pax4* è molto estesa e consente il ritorno alla condizione normoglicemica in modelli murini di diabete [13]. In un altro studio, la severa deplezione (> 99%) delle β cellule con la tossina difterica ha determinato in organismi modello la rigenerazione delle β cellule mediante

transdifferenziamento delle cellule α a cellule β senza l'intervento di cellule progenitrici [14]. Un nuovo approccio di riprogrammazione cellulare basato su piccole molecole chimiche (definito *chemical transdifferentiation*) è risultato più flessibile e promettente dal punto di vista terapeutico rispetto ai "classici" approcci di riprogrammazione, per l'assenza di vettori virali e la possibilità di controllo di dosi e tempi di somministrazione [15]. In ogni caso, l'identificazione di proteine e *pathways* da utilizzare quale bersaglio per il transdifferenziamento chimico richiede una attenta conoscenza delle somiglianze e delle

differenze nella fisiologica e nell' "assetto molecolare" dei tipi cellulari coinvolti (es., α e β cellule pancreatiche), sia nello stato basale che in quello finale transdifferenziato. A tal proposito, risultano sempre più importanti quegli studi che si propongono di caratterizzare il trascrittoma ed il proteoma di linee α e β cellulari in contesti differenti. Bramswig e coll. hanno dimostrato che le cellule α si trovano in uno stato "metastabile" di *default*, che facilita la loro riprogrammazione in un tipo cellulare diverso [16]. Le basi genetiche di questo processo sono state indagate sia in isole *in toto* che in popolazioni arricchite (per più del 90%) in α o β cellule pancreatiche a partire da isole di donatori umani. L'analisi del trascrittoma mediante RNA-seq e del profilo di metilazione in H3K4me3 e H3K27me3 (rispettivamente associato all'attivazione ed alla repressione genica) in geni implicati del differenziamento ha evidenziato per i tipi cellulari in esame (α , β , cellule esocrine) la presenza di caratteristici schemi di metilazione per diversi geni, alcuni dei quali precedentemente associati ad un maggiore rischio di sviluppare il Diabete mellito di tipo 2. È interessante notare che le α cellule hanno rispetto alle cellule β una maggiore presenza di entrambi i marcatori di metilazione (H3K4me3 e H3K27me3) in diverse centinaia di geni, alcuni dei quali specifici e determinanti per la funzionalità delle cellule β , tra questi i fattori di trascrizione *MAFA* e *PDX1* (Fig. 5). La presenza di entrambi i marcatori è caratteristica delle cellule staminali pluripotenti (hESC, *human Embryonic Stem Cells*) e suggerisce il fatto che lo stesso stato epigenetico delle α cellule favorisca la sua riprogrammazione in β cellula. Nel medesimo studio Bramswig e coll. hanno inoltre evidenziato la presenza di 12 e 5 lncRNA (*long non-coding RNAs*), la cui espressione è specifica rispettivamente delle cellule β ed α .

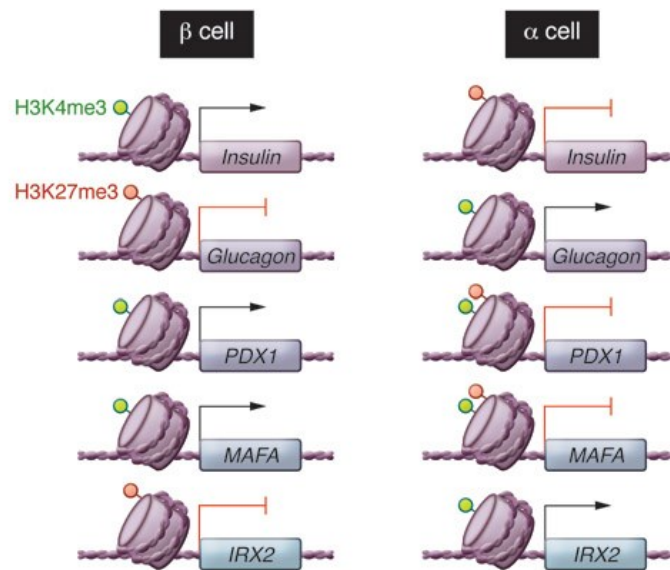


Figura 5. Asimmetria nella metilazione in H3K4me3 e H3K27me3 tra le cellule α e β pancreatiche. Nelle cellule β , geni β -specifici (es. insulina) sono marcati monovalentemente come “attivi” dall’istone H3K4me3 (verde), mentre geni α -specifici (es. glucagone) sono marcati come “repressi” dall’istone H3K27me3 (rosso). Nelle cellule α , diversi geni necessari al differenziamento delle β cellule (es. *PDX1* e *MAFA*) sono bivalentemente marcati, H3K4me3 + H3K27me3 (rosso + verde), indicando uno stato di “attivazione potenziale”. Questo fenomeno non è stato riscontrato nelle cellule β per geni α -specifici (Immagine tratta da [17]).

Choundary e coll. hanno recentemente caratterizzato il proteoma ed il fosfo-proteoma della linea α cellulare murina (α TC1) e della linea β cellulare murina (β -TC3), sia allo stato basale che dopo trattamento con due molecole, BRD7839 e GW8510, capaci di indurre l’espressione di insulina nelle cellule α [18, 19], caratterizzando quindi uno stato fenotipico intermedio tra le due tipologie cellulari (Fig. 6) [20].

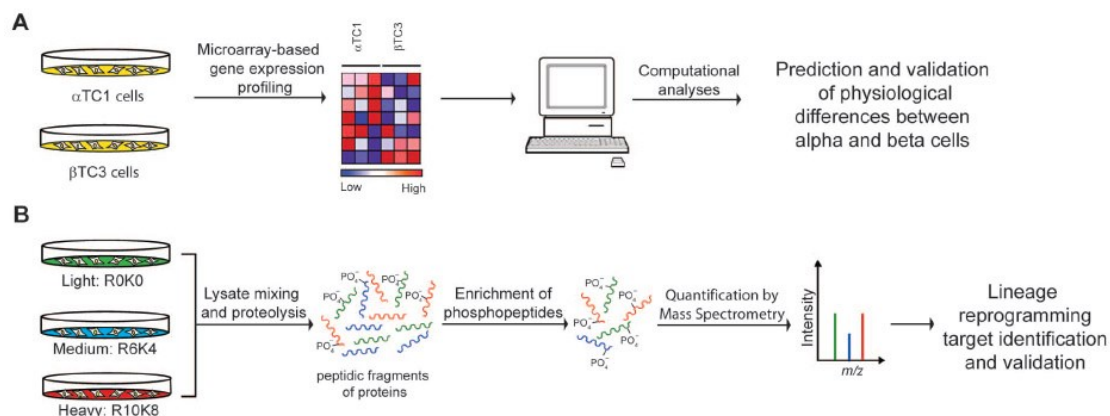
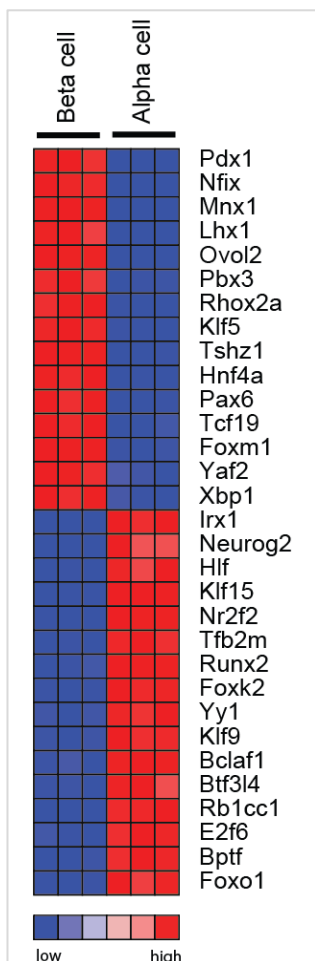


Figura 6. Disegno sperimentale per l'analisi comparativa delle cellule α (α TC1) e β pancreatiche (β -TC3). A) *Workflow* dell'analisi *in silico* dell'espressione genica dei dati *microarray* depositati; B) *Workflow* delle analisi di proteomica e fosfo-proteomica attraverso la metodologia SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture*) (Immagine tratta da [20]).

L'analisi computazionale dell'espressione genica a partire da dati di *profiling* depositati [21, 22] ha portato all'identificazione di un set di fattori di trascrizione differenzialmente espressi nelle



α TC1 e nelle β -TC3 (Nella figura a lato, **Figura 7, i trascrizione arricchiti nelle α/β cellule pancreatiche**. Ogni colonna rappresenta una replica biologica del tipo cellulare. Immagine tratta da [20]); alcuni dei quali già noti determinare il fenotipo α/β cellulare (tra questi: *Pdx1*, *Mnx1*, *Irx1*). L'analisi delle *pathways* (GSEA, *Gene-set Enrichment Analysis*) dei geni differenzialmente espressi ha mostrato interessanti differenze tra i due tipi cellulari; le α cellule si sono rivelate infatti metabolicamente più attive rispetto alla controparte β con un arricchimento dei geni coinvolti in: (i) ipossia; (ii) fosforilazione ossidativa; (iii) trasporto elettronico; (iv) glicolisi; (v) catabolismo degli amminoacidi ramificati. Al contrario, nelle β cellule è risultato un arricchimento dei geni coinvolti nei processi di *trafficking* di membrana e presentazione dell'antigene. La maggiore attività metabolica delle cellule α rispetto alle β è stata confermata nello stesso studio da specifici saggi funzionali e biochimici e potrebbe spiegare le differenze osservate relativamente al tasso di proliferazione dei due tipi cellulari (*doubling time* β -TC3: 2-3 giorni; *doubling time* α TC1: 1-2 giorni). Il trattamento delle α TC1 con BRD7839 e

GW8510, due molecole in grado di indurre transdifferenziamento chimico (*from α to β*), determina una diminuzione dell'attività glicolitica e della respirazione mitocondriale; ed avvicina il fenotipo delle α cellule ad uno simile a quello delle β . L'analisi del proteoma e del fosfo-proteoma dei due principali tipi cellulari del pancreas endocrino in condizioni basali e dopo transdifferenziamento chimico ha arricchito le conoscenze sull' "assetto molecolare" dei due tipi cellulari rivelando approssimativamente un 10% di proteine con una differenza di espressione superiore alle 3 volte tra le α TC1 e le β -TC3 e individuando nelle chinasi BRSK1 e CAMKK2 due proteine importanti nel mantenimento dello stato differenziato delle cellule α .

Ruolo delle α cellule nel Diabete Mellito

Nel Diabete mellito di tipo 1, le cellule β pancreatiche sono selettivamente esposte ad un severo attacco autoimmune che ne determina la distruzione; al contrario, le cellule α pancreatiche risultano resistenti all'azione citotossica e citostatica delle cellule e dei mediatori dell'infiammazione implicati nel processo ed alcuni *reports* descrivono addirittura una certa iperplasia α cellulare al momento della diagnosi di Diabete [23]. La resistenza all'apoptosi delle cellule α nel T1DM determina un aumento dell'abbondanza relativa della popolazione α cellulare a livello dell'isola del Langerhans: questo evento, unito alla mancanza di inibizioni paracrine alla sintesi del glucagone per il sostanziale deficit della popolazione β cellulare [24], sfocia in un'iper-secrezione di glucagone (iperglucagonemia) che aggrava la condizione iperglicemica. Diversi studi dimostrano che il blocco del *signalling* del glucagone (es. blocco farmacologico, topi *knockout* per il recettore del glucagone) determina protezione dal Diabete. Hamaguchi e Leiter [25] hanno trattato cellule β (linea β TC1) ed α pancreatiche (*uncloned* α TC, α TC1-6 e α TC1-9) con diverse concentrazioni e combinazioni di citochine proinfiammatorie (IL-1 β , IFN γ , IL-1 β + IFN γ) valutando i seguenti parametri: rilascio ormonale, vitalità cellulare, sintesi del DNA, induzione di molecole MHC. Per quanto riguarda la vitalità in risposta al trattamento con citochine, le cellule α TC-9 sono risultate più resistenti all'azione deleteria delle citochine, sia singolarmente che in combinazione, rispetto alle β TC1. Il trattamento con IL-1 β e l'IFN γ singolarmente riduce la sintesi del DNA nelle β TC1, ma non nelle α TC-9, tuttavia la loro combinazione (IL-1 β + IFN γ) deprime la sintesi del DNA in entrambe le linee cellulari. Anche Iwahashi e coll. [26] hanno indagato la risposta di cellule α (delle linee α TC1 e NIT1) e cellule β (della linea β TC1) all'apoptosi indotta dal trattamento con diverse combinazioni delle citochine IL-1 β , IFN γ e TNF α . Il metodo utilizzato per valutare la morte cellulare nel sistema in esame ha previsto l'analisi del DNA frammentato e la conta delle cellule ipodiploidi mediante marcatura degli acidi nucleici con ioduro di propidio (PI) e successiva analisi con citometria a flusso. Le cellule α si sono rivelate molto più resistenti delle cellule β all'apoptosi citochino-mediata; in particolare, dopo 48 ore di trattamento con una combinazione delle tre citochine, le cellule α TC1 hanno mostrato una percentuale di cellule apoptotiche pari al 4.76 % a fronte del 24.77 % riscontrato per le cellule β . Le basi molecolari di questo fenomeno potrebbero risiedere

nella maggiore espressione nelle cellule α rispetto alle cellule β della molecola antiapoptotica BCL-2; infatti, cellule β TC1 trattate con citochine e trasfettate con un vettore esprimente *Bcl-2* dimezzano la percentuale di cellule ipodiploidi rispetto a cellule β trattate con citochine e trasfettate con una molecola controllo. In base a quanto detto relativamente alla cellula α , non sorprende il fatto che la ricerca attuale veda in essa un importante *target* su cui intervenire farmacologicamente per ristabilire l'omeostasi glicemica. Il *pathway* incretinico si è rivelato particolarmente interessante da questo punto di vista ed è oggetto di numerosi *trials* clinici; l'utilizzo di agonisti del GLP-1 o inibitori del DPP-4 sembrerebbe contribuire significativamente alla riduzione del glucagone secreto, migliorando l'omeostasi del glucosio in pazienti affetti da Diabete mellito di tipo 2 [10].

La cellula β pancreatica

Gli studi di trascrittomica e proteomica ci hanno consentito di caratterizzare molto bene la cellula β pancreatica dal punto di vista del suo assetto molecolare. La mansione principale di questo tipo cellulare è quella di produrre, immagazzinare e secernere l'ormone ipoglicemizante insulina in risposta all'aumento della concentrazione ematica di glucosio; per questa sua caratteristica funzione possiamo considerare la β cellula una cellula altamente specializzata. Un'idea della specializzazione β pancreatica ci può venire dalle seguenti stime: il 20% degli RNA messaggeri totali della β cellula è rappresentato dall'RNA messaggero dell'insulina ed il contenuto di insulina nel pancreas è di 10 mg, una quantità capace di coprire il “fabbisogno insulinico” di una persona sana per 10 giorni. Nel caso della secrezione di insulina glucosio-dipendente, l'esocitosi dei granuli di insulina dipende dalle concentrazioni intracellulari di calcio (Ca^{2+}) e dall'azione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti della membrana cellulare. La loro apertura è controllata da canali K^+ ATP-dipendenti (K_{ATP}), che hanno il compito di collegare il metabolismo cellulare a variazioni nel potenziale di membrana. Se i livelli di glucosio plasmatico sono bassi, i canali K_{ATP} si aprono e l'efflusso di K^+ determina una iperpolarizzazione della membrana che mantiene chiusi i canali del Ca^{2+} , prevenendo la secrezione insulinica. Quando la concentrazione plasmatica di glucosio si alza, il suo metabolismo innesca l'innalzamento dei livelli intracellulari di ATP e una caduta in quelli di ADP; questi cambiamenti nel rapporto ATP/ADP determinano la chiusura dei canali K_{ATP} con conseguente depolarizzazione della membrana, afflusso di Ca^{2+} e secrezione insulinica (Fig. 8).

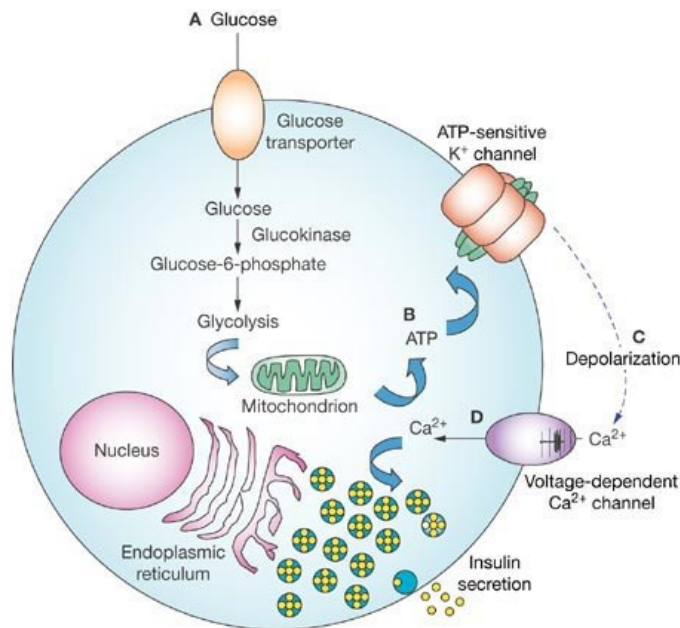


Figura 8. Accoppiamento stimolo-secrezione nella cellula β pancreatica umana.

Espressione genica nella β cellula pancreatica

Per il suo ruolo nel controllo dell'omeostasi energetica e la centralità delle disfunzioni a suo carico nei meccanismi patogenetici del Diabete mellito di tipo 1 (T1DM) e di tipo 2 (T2DM), la cellula β pancreatica è stata nel corso degli anni il *target* privilegiato di una notevole quantità di studi che hanno cercato di caratterizzarne l'espressione genica in condizioni fisiologiche e stati patologici [27]. Tuttavia, lo studio delle caratteristiche molecolari della β cellula pancreatica non ha potuto prescindere dalla capacità di isolare sub-popolazioni β cellulari da un ambiente eterogeneo e complesso come quello dell'isola del Langerhans; questo scopo è stato raggiunto principalmente attraverso il miglioramento nelle metodologie di purificazione e isolamento (*sorting*), basate sulla capacità di selezionare mediante citofluorimetria a flusso cellule β precedentemente "marcate" in maniera specifica, sfruttando caratteristiche fisiche di dimensione (*side scatter*) e granulosità, contenuto in zinco, contenuto ormonale o altri marcatori specifici (talvolta in organismi modello ingegnerizzati, es. topi MIP-GFP in cui l'espressione della proteina fluorescente GFP si trova sotto il controllo del promotore di *InsI*). Più di recente, lo sviluppo di tecniche più efficaci di separazione, l'avvento del *Next-Generation Sequencing* (NGS), l'evoluzione e l'automazione delle metodiche di spettrometria di massa hanno generato dettagliati profili del trascrittoma (mRNA, microRNA, lncRNA) e del proteoma delle β cellule pancreatiche.

I più recenti studi sul trascrittoma dell'isola pancreatica hanno permesso di:

- caratterizzare il profilo di espressione genica dei principali tipi cellulari dell'isola del Langerhans [28, 29];
- determinare il *pattern* di espressione genica delle β cellule in condizioni non fisiologiche [30, 31] ed identificare mediante GWAS (*Genome Wide Association Studies*) nuovi geni candidati nel T1DM e nel T2DM.

Come atteso, la β cellula pancreatica presenta rispetto all'isola pancreatica *in toto* e rispetto agli altri tipi cellulari “non- β ” dell'isola del Langerhans un set caratteristico di geni espressi [32, 29]. Nica AC e coll. hanno recentemente caratterizzato il profilo di espressione genica in isole pancreatiche umane *in toto*, cellule β pancreatiche e cellule “non- β ” dell'isola del Langerhans purificate tramite FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorting*). In questo studio sono stati identificati 5555 geni differenzialmente espressi (1987 sovra-espressi e 3568 sotto-espressi) tra le cellule β e l'isola pancreatica *in toto* e 4380 geni differenzialmente espressi (1583 sovra-espressi e 2797 sotto-espressi) tra cellule β e cellule “non- β ”; l'intersezione tra i geni sovra-espressi nelle cellule β in entrambi i casi ha permesso inoltre di definire un set di 526 geni “ β specifici” per i quali l'analisi delle annotazioni funzionali ha rivelato un arricchimento delle proprietà “*neuron-like*”, una caratteristica riscontrata precedentemente in altri studi [33]. Interessante è il fatto che una classe abbastanza significativa di geni sovra-espressi nelle cellule β pancreatiche umane è rappresentata da lincRNA (*Large Intergenic Non-Coding RNAs*). Per molti geni sovra-espressi nelle cellule β pancreatiche non è stata ancora caratterizzata la funzione in questo tipo cellulare, tra questi ricordiamo: *NPTX2* (*neuronal pentraxin II*), *TSPAN1* (*tetraspanin 1*), *GPM6A* (*glycoprotein M6A*), *BMP5* (*bone morphogenic protein 5*) e *P2RY1* (*purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 1*). Da questo studio è inoltre emerso che l'80% dei geni T1DM-associati ed oltre il 90% dei geni T2DM-associati è maggiormente espresso nelle β cellule; e 9 di questi: *INS*, *MEG3-DLKI*, *GLIS3*, *VEGFA*, *SLC10A8*, *ADRA2A*, *G6PC2*, *SLC2A2*. sono specifici delle β cellule. Altri due geni candidati, *SH2B3* (*T1D-linked*) ed *IRS1* (*T2D-linked*), sono significativamente sovra-espressi nella popolazione “non- β ”: è quindi plausibile che una loro disregolazione a livello delle cellule α , il tipo cellulare maggiormente rappresentato (59.8 ± 14.1 %) nella popolazione “non- β ” analizzata, possa essere collegata alla patogenesi del Diabete Mellito [29]. Eizirik e coll. [31] hanno analizzato mediante RNA-seq il trascrittoma di isole pancreatiche umane in condizioni di controllo e dopo trattamento con citochine (IL-1 β + IFN γ) per 48 ore. I risultati hanno evidenziato che il 61% dei 40 geni candidati nel T1DM precedentemente identificati mediante GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) [34, 35] sono espressi nelle isole umane (Fig. 9); alcuni di questi, come *IFIH1/MDA5* e *PTPN2*, erano già noti essere coinvolti nella disfunzione β cellulare mediata dalle citochine o da dsRNA (*double-strand RNA*), mentre *SH2B3* (*SH2B adaptor protein 3*) è stato caratterizzato per

la prima volta in questo studio come indotto dopo trattamento con citochine. Dopo 48 ore di esposizione alle citochine (IL-1 β + IFN γ), 1416 e 1652 geni (il 16% dei geni, cioè 3068 su 19,621 analizzati) sono risultati rispettivamente sovra- e sotto-espressi; l'analisi funzionale ha rivelato il loro coinvolgimento in processi chiave della fisiologia β cellulare: (i) *glucose metabolism/Kreb's cycle*; (ii) *lipid metabolism*; (iii) *protein synthesis and traslation*, o nella risposta alle citochine: (i) *chemokines and cytokines production*; (ii) *IFN γ signalling*; (iii) *inflammation*; (iv) *NF- κ B regulation*; (v) *proteasome/antigen presentation*; (vi) *innate immune response*; (vii) *apoptosis*.

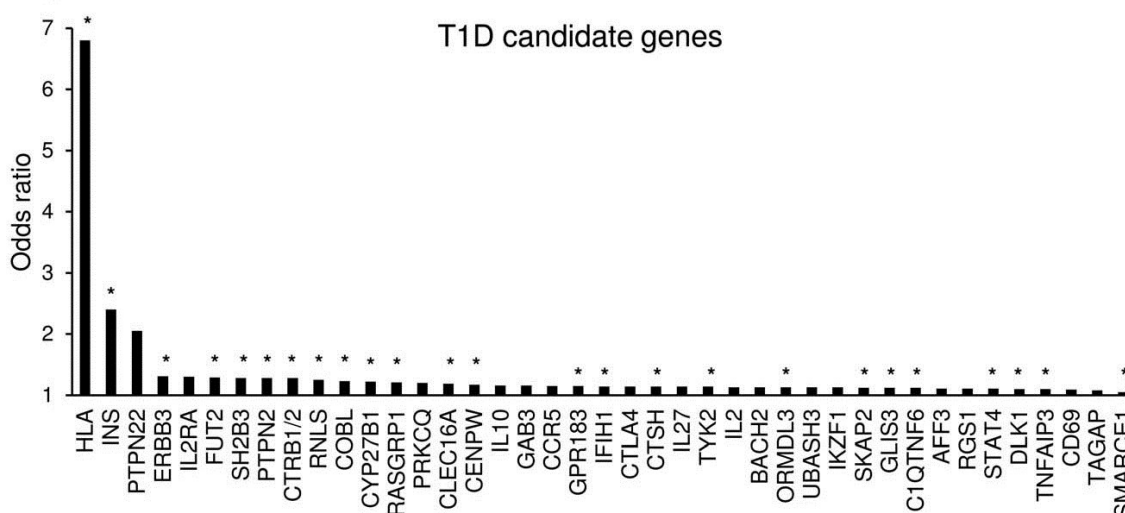


Figura 9. 2/3 dei geni candidati nel T1DM sono espressi a livello delle isole pancreatiche. *T1DM candidate genes* ordinati per *odds ratio* decrescente (<http://t1dbase.org>); i geni contrassegnati con l'asterisco (*) sono espressi in isole pancreatiche umane (Immagine tratta da [31]).

ncRNA nella β cellula pancreatica: i microRNA

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole regolatorie (22-26 nucleotidi in lunghezza) appartenenti alla classe degli RNA non codificanti (ncRNA). I microRNA regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale determinando il clivaggio o il blocco della traduzione di specifici RNA messaggeri bersaglio. I microRNA sono mediatori chiave di molti processi biologici ed alterazioni funzionali (es. mutazioni al sito di riconoscimento del messaggero *target*) o dei loro livelli di espressione sono alla base di diverse patologie. Numerosi studi descrivono il ruolo dei microRNA nello sviluppo del pancreas endocrino, nella fisiologia della β cellula pancreatica e nell'omeostasi del glucosio così come nella patogenesi del Diabete Mellito e delle sue complicazioni (vedi sez. "I microRNA e la β cellula", pag. 40). Klein e coll. [36] hanno di recente caratterizzato il trascrittoma microRNA di cellule α e β pancreatiche umane purificate mediante FACS; il protocollo di *sorting* adottato ha reso necessaria la fissazione e la permeabilizzazione delle cellule, procedimento che tuttavia

non ha alterato il profilo di espressione microRNA come dimostrato paragonando l'espressione di un set di 7 microRNA altamente espressi nell'isola del Langerhans tra isole "processate" e "non-processate" per il *sorting*. L'analisi SAM (*Significant Analysis of Microarray*) ha identificato 141 microRNA differenzialmente espressi tra le α e le β cellule, di cui 134 altamente sovra-espressi (da 1.9 a 112 volte) nelle cellule β rispetto alle α (dette β -miRNAs) e solo 7 microRNA moderatamente sovra-espressi (da 1.9 a 2.9 volte) nelle cellule α rispetto alle cellule β (α -miRNAs). Diversi β -miRNAs tra cui il miR-127-3p, il miR-128, il miR-184, il miR-204, il miR-29 sono stati già descritti regolare la secrezione insulinica, un riscontro che sottolinea come l'espressione di un caratteristico set di microRNA in un particolare tipo cellulare sia cruciale per l'acquisizione ed il mantenimento del fenotipo differenziato.

ncRNA nella β cellula pancreatica: i lncRNA

I *long-non coding RNA* (lncRNA) rappresentano una classe di RNA non codificanti lunghi più di 200 bp che regolano l'espressione genica agendo a diversi livelli: trascrizionale, post-trascrizionale e traduzionale. Seppur strutturalmente vicini agli RNA messaggeri (presenza di esoni, meccanismi "canonici" di *splicing*, esistenza di isoforme, *capping* e poliadenilazione), al contrario di questi esibiscono una localizzazione tipicamente nucleare, in accordo alla capacità di riorganizzare la cromatina. E' stato verificato che i *pattern* di espressione dei lncRNA sono altamente cellulo-specifici [37, 38] ed anche l'isola pancreatica ed i tipi cellulari costituenti presentano un caratteristico set di molecole espresse. Il catalogo più completo dei lncRNA presenti nell'isola pancreatica umana *in toto* ed in β cellule purificate mediante FACS è stato pubblicato da Moran e coll. nel 2012 [39]. La combinazione delle tecnologie CHIP-Seq ed RNA-Seq ha permesso di indentificare 1128 distinti trascritti con caratteristiche assimilabili a quelle dei lncRNA: (i) lunghezza > 200bp; (ii) presenza del *pattern* di metilazione "K4-K36"; (iii) scarso potenziale di traduzione; (iv) espressione tessuto-specifica superiore rispetto a quella dei geni codificanti per proteine. Il 55% dei *long non-coding RNA* intergenici e il 40% di quelli antisenso identificati da Moran e coll. sono risultati specifici dell'isola pancreatica. Uno studio indipendente di RNA-Seq condotto su β cellule umane purificate ha rivelato la sovra-espressione di 148 lincRNAs in cellule β rispetto a cellule "non- β " [29]; un'analisi più stringente ha invece rivelato l'espressione β -specific di 12 lncRNA e α -specific di 5 lncRNA [16]. Presi insieme questi dati evidenziano l'importanza dell'espressione cellulo/condizione-specifica dei lncRNA e del loro ruolo nella fisiologia dell'isola pancreatica umana. Per alcuni lncRNA è stata già descritta una modulazione dei livelli di espressione durante il programma di differenziamento del pancreas endocrino [40, 41], nella risposta al glucosio (es. *HI-LNC78* ed *HI-LNC80*) [39], e nel Diabete Mellito [39, 42]. Confrontando il profilo di espressione di un set di 14 lncRNA in isole pancreatiche da donatori affetti da T2DM (N = 16) e in isole da donatori controllo (N = 19) è emerso che due lncRNA, *KCNQ1OT1* e *HI-LNC45*, risultano rispettivamente sovra- e sotto-espressi nelle isole di individui affetti [39]; questa ed altre

evidenze sperimentali suggeriscono un importante ruolo dei lncRNA nella suscettibilità alla malattia e nella patogenesi del Diabete Mellito.

Il proteoma della β cellula pancreatica

Similmente a quanto l'RNA-Seq consente per l'analisi dell'RNA, la spettrometria di massa è strumento chiave per individuare pressoché tutte le proteine espresse in un particolare tipo cellulare in condizioni basali, in risposta a stimoli ambientali o in stati patologici. Lo studio del proteoma delle β cellule è stato rivolto ad isole intere, linee cellulari e sub-popolazioni arricchite in β cellule ed ha sfruttato fondamentalmente due approcci: (i) 2DGE (*Two-Dimensional Gel Electrophoresis*) combinato alla spettrometria di massa; (ii) cromatografia liquida associata a spettrometria di massa (LC-MS/MS). Ahmed e coll. sono stati i primi a generare una mappa proteomica di isole umane isolate [43]; lo stesso gruppo ha inoltre verificato mediante 2DGE/MS l'alterata espressione di 75 proteine mitocondriali in cellule della linea β cellulare di ratto INS-1E in condizioni di iperglicemia cronica [44].

Focalizzando l'attenzione sul T1DM, Coppola e coll. [45] dopo aver generato e caratterizzato una linea murina β cellulare “resistente” alle citochine (β -TC3R) hanno confrontato il suo proteoma con quello della linea “sensibile” (β -TC3) allo scopo di ampliare le conoscenze sui meccanismi della distruzione autoimmune delle β cellule nel T1DM. Un totale di 99 proteine sono risultate differenzialmente espresse (83 sovra-esprese e 16 sotto-esprese) nella linea β -TC3R. Rispetto alla linea resistente, le cellule β -TC3R esibiscono: (i) ridotta espressione di IL-1R1 e IFN γ R; (ii) più alti livelli delle proteine SOCS-3 e SUMO4; (iii) inattivazione dei pathway di NF- κ B e STAT-1 α . Molte delle proteine sovra-esprese sono risultate coinvolte in: (i) processi metabolici come glicolisi e ciclo di Krebs; (ii) ciclo cellulare; (iii) regolazione negativa dell'apoptosi e risposta allo stress (*chaperons*, *heat-shock proteins*, *oxidoreductases*). SUMO4 è l'unica proteina del *signalling* citochinico sovra-espressa in questa indagine proteomica nelle cellule “resistenti” rispetto alle “sensibili” e sembrerebbe contribuire al processo di resistenza all'apoptosi delle β -TC3R bloccando le vie JAK/STATs e NF- κ B. Indagini proteomiche hanno inoltre permesso l'identificazione di proteine β -specifiche per la valutazione diretta ed efficace della massa β cellulare nella diagnosi o alla progressione del Diabete Mellito [46] o hanno consentito l'identificazione di nuovi autoantigeni del T1DM [47]. Molto interessante per le potenziali applicazioni diagnostiche, prognostiche e terapeutiche nel T1DM è la caratterizzazione del proteoma superficiale delle β cellule pancreatiche, cioè di tutte quelle proteine incorporate o associate alla membrana plasmatica e secrete dalla cellula (il cosiddetto secretoma) [48].

Fenotipo della β cellula pancreatica: proliferazione e suscettibilità all'apoptosi

Per il ruolo determinante nella gestione del metabolismo energetico le cellule β pancreatiche sono soggette ad una fine regolazione della funzione e della massa da parte dell'organismo, questo effetto viene ottenuto attraverso il controllo delle dimensioni delle singole cellule, dell'apoptosi, della replicazione (la mitosi di cellule β pre-esistenti) e della neogenesi (la formazione di nuove cellule β da precursori) [49]. Dopo una rapida espansione negli stati embrionali e neonatali la duplicazione delle β cellule diventa estremamente lenta (<0.5% divisioni per giorno) sia nei roditori adulti [50] che nell'uomo [51]; in particolare nell'uomo, le cellule β pancreatiche risultano poco responsive agli effetti di numerosi mitogeni, fattori di crescita e nutrienti noti favorire la proliferazione e l'espansione della popolazione β cellulare in modelli murini. La quantificazione dei corpi di lipofusina (LBs, *Lipofuscin Bodies*), un prodotto di scarto dell'attività lisosomiale, è un utile strumento per la stima dell'invecchiamento di diversi tipi cellulari post-mitotici e scarsamente proliferanti, come le β cellule. Cnop e coll. hanno dimostrato l'esistenza di una relazione lineare tra invecchiamento ed abbondanza dei corpi di lipofusina nelle cellule β pancreatiche in diversi organismi modello [52]. I risultati hanno dimostrato che: (i) nell'uomo ed in altri primati un aumento del contenuto di LBs nelle β cellule correla positivamente con l'età; (ii) nell'uomo l'area citoplasmatica occupata dai LBs è meno estesa nelle cellule α e nelle cellule duttali rispetto alle β cellule da medesimi donatori; (iii) cellule di insulinoma umane hanno un contenuto in lipofusina basso e non correlato all'età rispetto a cellule β di donatori sani; iv) nei topi (anche maggiori ad 1 anno di età) l'estensione dell'area occupata dai LBs correla con l'invecchiamento ma è meno estesa che nell'uomo. Il fatto che la proporzione di β cellule non contenenti corpi di lipofusina (*lipofuscin bodies*), sinonimo di cellule β giovani o di neoformazione, è bassa nell'uomo (11% ad 1 anno, 5% a 5 anni e 2-3% nella vita adulta) suggerisce che la neogenesi o il transdifferenziamento da altri precursori è un fenomeno non comune sia in condizioni normali (donatori sani) che in stati patologici (donatori obesi, diabetici). Questi dati suggeriscono che nell'uomo la popolazione β cellulare si stabilisce precocemente e dopo i 20 anni di età diventa stabile e non-proliferante, anche in risposta ad una maggiore richiesta di insulina. Un complesso *network* molecolare finemente regolato controlla la replicazione della β cellula pancreatica in ogni fase della vita dell'individuo: ad esempio, p16^{INK4A} (un potente inibitore della chinasi Cdk4 ed effettore della senescenza) si accumula in diversi tessuti, compresa l'isola del Langerhans in funzione dell'invecchiamento determinando un blocco della proliferazione e della replicazione [53]. Tipicamente, le *pathways* molecolari attivate da fattori di crescita e nutrienti convergono nel controllo della progressione del ciclo cellulare al *checkpoint* G1/S (Fig. 10). Gli interpreti del complesso *network* del ciclo cellulare sono molteplici, ma per semplicità possiamo suddividere le molecole costituenti in: (i) attivatori del ciclo cellulare (Ciclina D e chinasi ciclina-dipendente

associate; Cicline A/E e chinasi ciclina-dipendente associate, *cdk1* e *cdk2*); (ii) inibitori del ciclo cellulare: le cosiddette “*pocket proteins*” (pRb, p107 e p130), la famiglia INK4 (p15, p16, p18 e p19), la famiglia CIP/KIP (p21, p27 e p57), la menina e p53. Tutte queste molecole hanno un'emivita breve e frequentemente la loro azione è controllata a livello di stabilità proteica. Variazioni nell'espressione di queste molecole possono spiegare la risposta delle β cellule pancreatiche alla proliferazione.

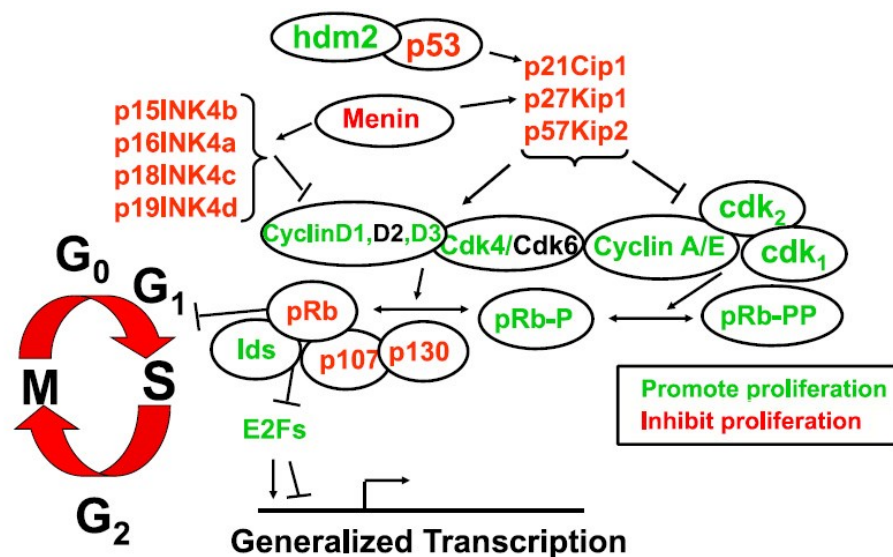


Figura 10. Proteine del ciclo cellulare in β cellule pancreatiche umane e murine. In verde sono indicate le molecole che attivano la progressione del ciclo cellulare, in rosso quelle che la reprimono; in nero sono indicate le molecole (CCND2, *cdk6*) la cui abbondanza relativa o funzione è diversa nei due sistemi umano e murino (Immagine tratta da [54]).

La caratterizzazione di circa 30 proteine responsabili della progressione del ciclo cellulare al *checkpoint* G1/S nelle β cellule umane e murine ha rivelato molte somiglianze tra i due modelli; le poche differenze risiedono nell'abbondanza di *cdk6* nell'uomo rispetto al topo e nel ruolo svolto dalla Ciclina D2. La Ciclina D2 è cruciale nel topo dal momento che la sua delezione è causa di ipoplasia β cellulare e Diabete negli organismi modello KO; il fatto che risulti poco espressa nell'uomo potrebbe essere spiegato paradossalmente in due modi: l'azione CCND2 potrebbe essere infatti irrilevante per la progressione nel ciclo cellulare; oppure, potrebbe essere fondamentale se la sua bassa quantità fosse causalmente associata alla difficoltà a proliferare delle β cellule pancreatiche umane [55]. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che la sovra-espressione di diverse cicline (Ciclina D, Ciclina E) e di altri elementi del ciclo cellulare (es. c-Myc, *cdks*) nelle β cellule pancreatiche umane determina un importante (>10%) incremento della proliferazione; possiamo quindi ipotizzare che il “macchinario” del ciclo cellulare non è difettivo o incompleto nelle β cellule pancreatiche umane, ma rimane in attesa di una

attivazione. Il “problema” risiederebbe quindi a monte del ciclo cellulare, in quella *pletora* di nutrienti e ligandi, recettori e *pathways* molecolari, che trasducono il segnale della proliferazione dai recettori di membrana alle molecole effettrici del ciclo cellulare, della quale ancora si conosce molto poco [54]. Una recente analisi delle molecole che intervengono al *checkpoint* G1/S nelle β cellule pancreatiche umane ha rivelato che le molecole critiche per la progressione nel ciclo cellulare sono ritenute nel citoplasma delle cellule β quiescenti. Le molecole a localizzazione nucleare sono rappresentate dagli inibitori pRb, p57 e p21. Questa osservazione potrebbe contribuire a spiegare la refrattarietà delle β cellule pancreatiche umane a proliferare [56, 57].

Il fenotipo delle cellule β , oltre che scarsamente proliferante, è particolarmente propenso ad azionare, in particolari condizioni, il macchinario apoptotico. Questa caratteristica è comune anche ad altri tipi cellulari come alcune cellule neuronali e le cellule della granulosa dell’ovario. Diverse caratteristiche molecolari che possono spiegare il fenotipo *apoptosis-prone* della β cellula pancreatica:

- nelle β cellule differenziate è caratteristica l’espressione ad alti livelli fattore di trascrizione *Pdx-1*, che non solo potenzia il *signalling* delle chinasi MAP e SAP ma determina anche una più forte risposta agli effetti proapoptotici dell’IL-1 β [58]. I meccanismi molecolari che sottostanno alla sensibilizzazione da parte di *Pdx-1* all’apoptosi indotta dalle citochine potrebbero risiedere in cambiamenti nell’espressione di *Slc2a2*, nella secrezione insulinica, nel *signalling* autocrino o nell’espressione di geni proapoptotici *Pdx-1* dipendenti;
- le β cellule pancreatiche, nonostante sfruttino l’ossidazione del glucosio e la successiva produzione di specie reattive dell’ossigeno per l’accoppiamento stimolo-secrezione insulinica presentano bassi livelli di enzimi antiossidanti e scarse capacità protettive nei confronti dei ROS [59];
- nelle β cellule pancreatiche non sono particolarmente espresse le proteine SOCS (*Suppressor Of Cytokines Signalling*), capaci di bloccare l’azione deleteria delle citochine proinfiammatorie; in particolare, SOCS3 modula negativamente il *signalling* dell’IL-1 β [60]. Similmente, la proteina IB-1 è sottoespressa nelle β cellule in risposta a vari segnali di stress, compresa la presenza di IL-1 β ; i bassi livelli di IB-1 determinano un più efficiente assemblaggio del complesso JNK e di conseguenza favoriscono l’avvio del programma apoptotico;
- le cellule β presentano rispetto agli altri tipi cellulari dell’isola pancreatica, in particolare rispetto alle cellule α , bassi livelli della molecola antiapoptotica Bcl-2 [26].

Diabete Mellito: caratteristiche, epidemiologia e genomica

Concentrazioni di insulina plasmatica insufficienti alla domanda metabolica o deficit nella sua azione innescano iperglicemia cronica e lo sviluppo nel tempo del Diabete. Il Diabete Mellito (DM) è una sindrome dismetabolica ad eziologia complessa determinata dalla combinazione di fattori genetici ed ambientali. Piuttosto che un'unica malattia il DM si articola in tre principali forme cliniche che differiscono nell'eziologia: 1) il Diabete mellito di tipo 1 (T1DM, *Type 1 Diabetes Mellitus*), caratterizzato dalla distruzione pressoché totale delle cellule β pancreatiche per fenomeni di autoimmunità; 2) il Diabete mellito di tipo 2 (T2DM, *Type 2 Diabetes Mellitus*), caratterizzato da una residua secrezione insulinica ma inadeguata al fabbisogno dell'organismo e da una resistenza dei tessuti bersaglio all'azione ormonale e 3) il Diabete mellito gestazionale (GDM) si manifesta nel corso della gravidanza (Fig. 11). A queste tre forme si aggiunge una forma di Diabete Mellito non assimilabile alle categorie cliniche precedentemente descritte e detto "secondario", perché associato ad altre cause come difetti genetici nella funzionalità delle β cellule o nell'azione dell'insulina (MODY, *Maturity onset diabetes of the young*), terapie, trapianti o deficit funzionali al pancreas esocrino (es. fibrosi cistica). Tutte le forme di DM sono in ogni caso caratterizzate da una marcata iperglicemia che rappresenta anche il principale fattore diagnostico della patologia: FPG (*Fasting Plasma Glucose*) ≥ 126.5 mg/dl (7.0 mmol/L), 2-h PG (*Plasma Glucose*) dopo assunzione orale di 75g di glucosio anidro disciolto in acqua (OGTT, *Oral Glucose Tolerance Test*) ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L).

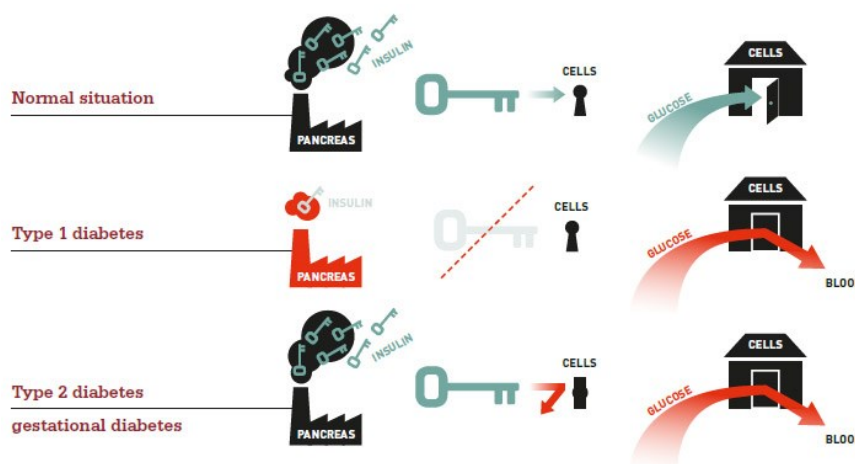


Figura 11. Eziologia delle tre principali forme di Diabete Mellito (Immagine tratta da [61]).

Per le sue proporzioni e la diffusione epidemica, il Diabete Mellito è oggi un pressante problema sanitario; le complicazioni cliniche della patologia sono responsabili di ben 5.1 milioni di morti nel 2013 e le spese della sanità mondiale per la gestione della patologia ammontano nello stesso anno a 548 bilioni di dollari, una cifra pari all'11% della spesa sanitaria mondiale. Nel mondo il numero di individui affetti da Diabete è stimato essere di 382 milioni,

l'8.3% degli adulti; senza appropriate misure di prevenzione e controllo, questo numero è destinato a crescere vertiginosamente raggiungendo secondo le previsioni quota 592 milioni nel 2035 (Fig. 12). Il maggior apporto a questa esplosione patologica secondo le proiezioni sarà fornito dai paesi in rapido sviluppo, principalmente Cina e India.

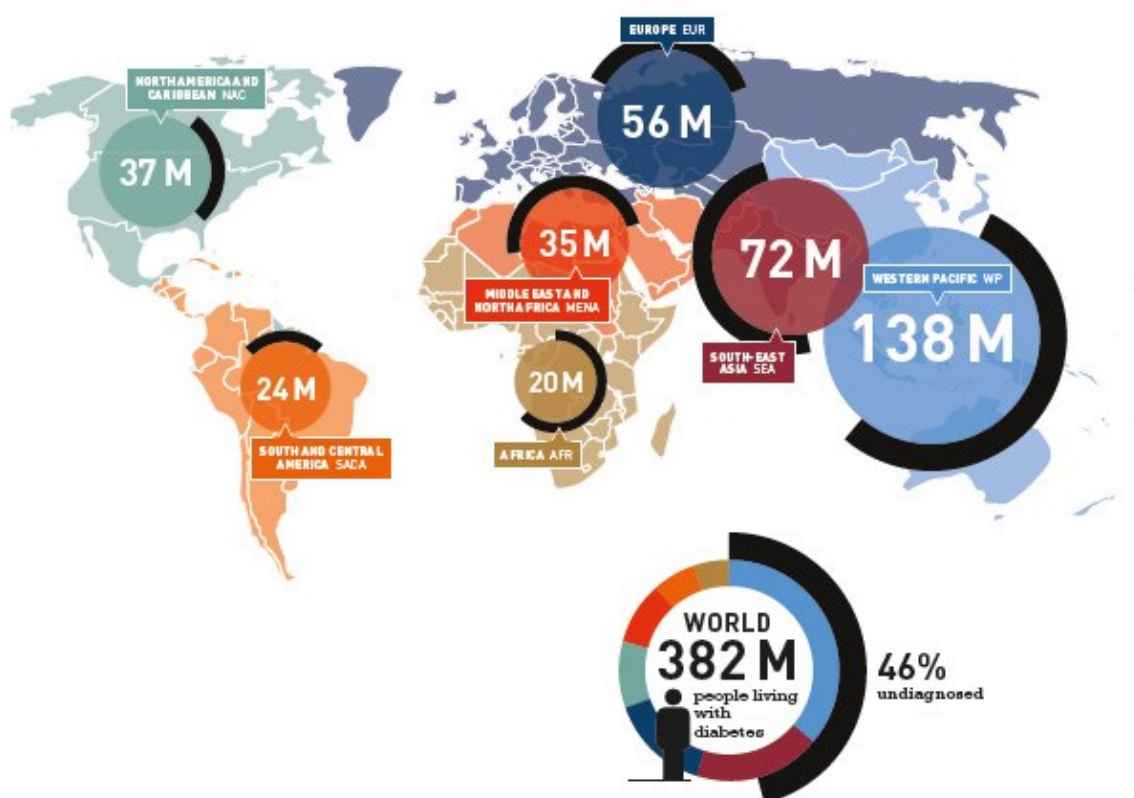


Figura 12. Diffusione mondiale del Diabete Mellito all'anno 2013. Stima *International Diabetes Federation* (Immagine tratta da [61]).

Il T2DM è la forma più comune della malattia, rappresenta l'85-95% dei casi di Diabete Mellito nei paesi ad alto reddito e potrebbe avere una prevalenza ancora più alta nei paesi a basso e medio reddito. La grande prevalenza di questa forma della patologia è associata ai rapidi cambiamenti nell'urbanizzazione, nell'industrializzazione e nella globalizzazione del mercato, che hanno aumentato il benessere socio-economico della popolazione e favorito errati stili di vita (inattività fisica/dieta ipercalorica). Il T1DM pur essendo meno comune del T2DM è sempre più diffuso, sia nei paesi ricchi che in quelli poveri; secondo i maggiori consorzi scientifici che monitorano e studiano i casi di diabete (*DIAMOND*, *EURODIA*, *SEARCH for Diabetes in Youth study*), l'incidenza del T1DM aumenta in media del 3% ogni anno. Il rischio di sviluppare il T1DM è multifattoriale ed attribuibile ad un complesso *cross-talk* tra fattori genetici ed ambientali.

Genomica del T1DM

Diverse sono le evidenze sperimentali che descrivono l'influenza della componente genetica sul rischio di sviluppare il T1DM: (i) il tasso di co-occorrenza della malattia in gemelli identici è del 65%; (ii) bambini appartenenti a famiglie in cui almeno uno dei membri è malato hanno il 5% di rischio di sviluppare il T1DM entro i 20 anni di età contro lo 0.3% di bambini di famiglie "non affette". Sebbene questi ed altri dati sembrino a favore di un importante contributo della genetica all'insorgenza della malattia, il relativamente basso tasso di concordanza tra gemelli identici è tuttavia indice di una bassa penetranza dei geni della suscettibilità o del forte contributo dei determinanti ambientali; di conseguenza non tutti gli individui geneticamente a rischio svilupperanno la malattia [62]. Già negli anni '70 diversi studi hanno dimostrato che nel T1DM, come in altre malattie autoimmuni organo-specifiche, esiste una stretta relazione della patologia (40-50% dei casi familiari) con le varianti alleliche dei geni del complesso MHC (*Major Histocompatibility Complex*) [63]. Nell'uomo la regione MHC mappa in posizione 6p21.3 e comprende oltre 200 geni altamente polimorfici distribuiti in circa 4 Mbp di DNA. I prodotti genici di questa regione sono stati inizialmente identificati sulla superficie dei linfociti (da ciò il nome alternativo di complesso HLA, *Human Leukocyte Antigen*), e svolgono un ruolo determinante nell'immunità innata ed adattativa; in particolare, permettono l'interazione tra le cellule del sistema immunitario e determinanti antigenici endogeni o esogeni. I geni più importanti nella risposta immunitaria sono quelli codificanti per gli antigeni di classe I (A, B e C) e di classe II (DR, DQ e DP) (Fig. 13). Sebbene gli alleli di suscettibilità al T1DM sono molto comuni nella popolazione, soltanto particolari associazioni alleliche ereditate dai genitori favoriscono oppure contrastano l'insorgere della patologia. La più forte associazione tra T1DM e regione HLA è quella osservata con aplotipi e genotipi dei loci *DRB1-DQA1-DQB1*, in particolare con la presenza del genotipo eterozigote *DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02* su un cromosoma e *DRB1*04:01/02/04/05/08-DQA1*03:01-DQB1*03:02/04* (o *DQB1*02*) sull'altro. L'abbreviazione più nota per questo genotipo ad alto rischio (*odds ratio-OR* = 16.95%) è "DR3/DR4". Al contrario, alcuni aplotipi contribuiscono alla protezione dal T1DM; il più noto è *DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02* che è anche il più comune aplotipo DR-DQ negli individui Caucasici [62].

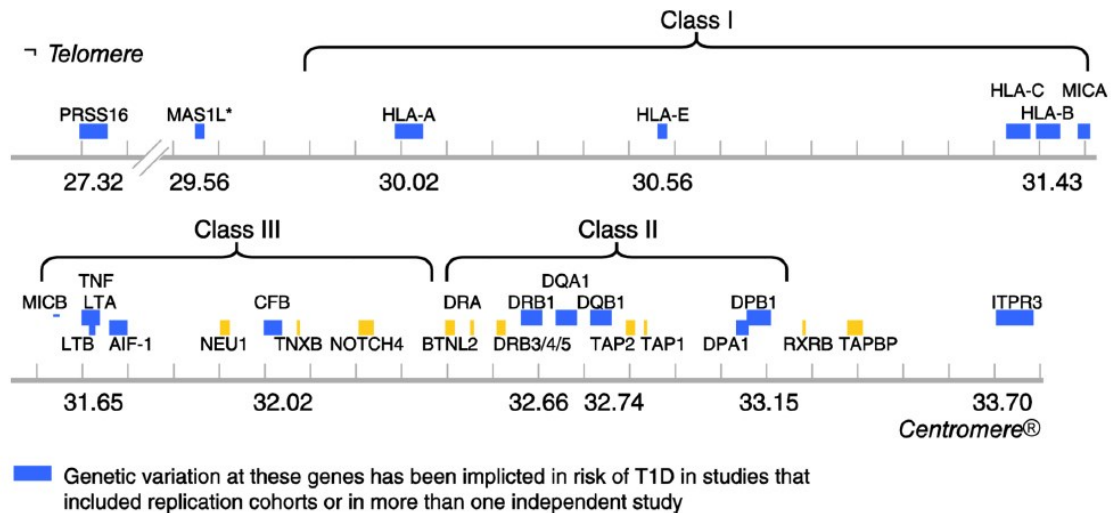


Figura 13. Mappa schematica della regione HLA e geni associati al T1DM (Immagine tratta da [62]).

Recentemente, l'aumento nella conoscenza del genoma accoppiato al miglioramento nelle tecniche di genotipizzazione ha consentito esperimenti GWAS (*Genome Wide Association Studies*) [35] che hanno portato alla scoperta di altri *loci* “non-HLA” associati al rischio di sviluppare il T1DM; ad oggi sono stati individuati oltre 50 *loci*-malattia, molti dei quali contengono geni multipli (www.t1dbase.org) [64]. Sulla base di queste scoperte è stato possibile trarre le seguenti conclusioni: (i) ad eccezione del complesso MHC, che ha una *odds ratio* > 6.5, tutti gli altri *loci* genetici sono solo moderatamente associati ad un maggiore rischio di sviluppare la patologia (*odds ratio* < 2); (ii) molti dei polimorfismi sono condivisi con altre malattie autoimmuni; (iii) la maggior parte dei geni candidati identificati sono espressi sia nelle cellule del sistema immunitario che nelle β cellule pancreatiche; (iv) la caratterizzazione delle *pathways* molecolari dei geni candidati è un utile strumento per lo studio delle basi molecolari della patologia e per l'intervento terapeutico. Ad esempio, è stato dimostrato che polimorfismi a carico di geni della *pathway* a valle dei recettori *RIG-like* (*IFIH1/MDA5*) e dell'interferone (*PTPN2*, *USP18*) (così come i polimorfismi a carico di geni responsabili del fenotipo β cellulare o della suscettibilità a stimoli proapoptotici, es. *GLIS3*) hanno un ruolo importante nelle fasi iniziali del T1DM [65]. E' interessante notare che molte regioni di suscettibilità al T1DM corrispondono a regioni del genoma non codificanti per proteine [34]; questo dato sottolinea il fatto che queste regioni “*non-coding*” (es. microRNA, lncRNA) possano spiegare le basi genetiche della patologia allo stesso modo della frazione “*coding*”. Non a caso, l'espressione dei microRNA 29a/b/c, regolatori della funzionalità e della proliferazione β cellulare, è risultata alterata nelle isole di topi NOD pre-diabetici; linfociti da pazienti affetti da T1DM positivi agli autoanticorpi mostrano un'aumentata espressione del miR-326; polimorfismi a livello del 3'-UTR dei geni candidati *CTLA4* e *IL-10* possono influenzare la patogenesi del T1DM alterando il legame di microRNA regolatori.

Epigenomica del T1DM

L'epigenetica è lo studio delle modificazioni dell'espressione genica, che non dipendono da alterazioni della struttura primaria del genoma; esse possono realizzarsi attraverso la metilazione a livello delle isole CpG, l'azione di RNA non codificanti, e la modificazione chimica degli istoni. I progressi nella comprensione della suscettibilità genetica al DM hanno evidenziato che anche i meccanismi epigenetici possono influire sullo sviluppo e la progressione della patologia [66]. Rakyan e coll. [67] hanno effettuato un'analisi *High-Troughput* del metiloma (EWAS, *Epigenomic Wide Association Study*) di monociti CD14+ da 15 coppie di gemelli monozigoti discordanti per il T1DM. Lo *screening* di 27458 isole CpG in 14475 promotori diversi ha portato all'identificazione di 132 siti CpG significativamente connessi al rischio di sviluppare il Diabete mellito di tipo 1 (*T1D associated-methylation variable position*), di cui 74 ipometilati (*hypoT1D-MVPs*) e 58 ipermetilati (*hyperT1D-MVPs*). Ognuno dei 132 T1D-MVP è associato ad un gene e tra questi diversi sono risultati già candidati al rischio di sviluppare la patologia (es. *GAD2* e *HLA-DQB1*). Questo stesso studio dimostra inoltre che i tratti epigenetici *T1DM-linked* sono presenti già prima della comparsa degli autoanticorpi e precedono l'esordio clinico del Diabete Mellito. Similmente a quanto visto per il profilo di metilazione, anche le modificazioni post-traduzionali (PTM, *Post-Translational Modification*) degli istoni rivestirebbero un ruolo importante nel T1DM. Ad esempio è stato dimostrato che monociti e linfociti da pazienti affetti e controlli sani esibiscono un differente assetto nelle modificazioni istoniche (es. H3K9Ac, H3K9me2, H3K9me3 e H3K9me1) al promotore o a monte di diversi geni connessi alla patogenesi del Diabete Mellito come *CTLA4*, *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1* [68].

Ruolo del sistema immunitario nel Diabete mellito di tipo 1

Le malattie autoimmuni sono patologie caratterizzate da una risposta immunitaria contro antigeni *self* dell'organismo; più precisamente, una patologia ha un'eziologia autoimmune quando abbraccia la maggior parte dei seguenti criteri: (i) la patologia è associata alla perdita di tolleranza verso specifici antigeni *self*; (ii) il trasferimento di cellule del sistema immunitario e/o anticorpi di individui affetti ad individui non affetti determina il trasferimento della patologia; (iii) l'immuno-soppressione o l'immuno-modulazione modificano la storia naturale della patologia; (iv) studi su organismi modello ne confermano l'eziologia autoimmune; (v) la patologia è associata a geni che regolano il sistema immunitario come quelli del complesso HLA. Il Diabete mellito di tipo 1 (T1DM) è una tipica malattia multifattoriale immuno-mediata, caratterizzata dalla distruzione delle cellule β produttrici di insulina ad opera di cellule T attivate (CD4+ e CD8+) in individui geneticamente predisposti e costretti all'insulino-dipendenza per tutta la vita [69, 70]. La manifestazione clinica o esordio della patologia (T1DM *onset*) avviene tipicamente entro i 30 anni di età e si raggiunge quando più dell' 80% delle cellule β dell'organismo sono state distrutte; questo evento è tuttavia preceduto da una fase

infiammatoria più o meno lunga a carico dell'isola del Langerhans, che prende il nome di insulite, essa è caratterizzata dall'infiltrazione insulare di cellule dell'immunità innata (principalmente linfociti T CD4+ e CD8+), che determinano la morte delle β cellule mediante meccanismi diretti o mediante la produzione di molecole citotossiche solubili (le citochine infiammatorie). Non sono ancora pienamente noti i fattori che determinano l'instaurarsi della reazione infiammatoria e la perdita di tolleranza verso gli antigeni β cellulari, ma è evidente che le β cellule sono allo stesso tempo vittime dell'attacco autoimmune ed artefici della propria distruzione [71]. L'infiammazione è per definizione una risposta biologica transitoria innescata da un'infezione, da uno stress o da malfunzionamento di un particolare tessuto; l'adeguato controllo di questo processo da parte dell'organismo è essenziale per il mantenimento dell'integrità e della funzionalità tissutale. Nel T1DM come anche per altre patologie autoimmuni e malattie croniche di tipo infiammatorio, i mediatori dell'infiammazione sono incapaci di determinare la “risoluzione” del processo o agiscono in maniera incontrollata. Nel T1DM i processi infiammatori inducono e amplificano la reazione immunitaria contro le β cellule nella prima fase della patologia e contribuiscono alla stabilizzazione ed al mantenimento (transizione verso l'immunità adattativa) dell'insulite nei suoi stadi finali (Fig. 14). Il processo infiammatorio nel T1DM determina: (i) distruzione delle β cellule; (ii) soppressione della funzione β cellulare; (iii) inibizione o stimolazione della rigenerazione β cellulare; (iv) insulino-resistenza.

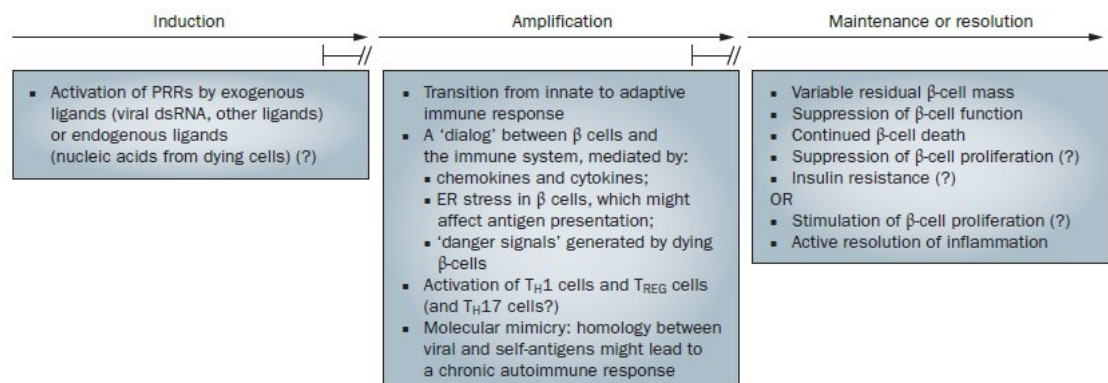


Figura 14. Processi infiammatori nel Diabete mellito di tipo 1 (T1DM). Le varie “fasi” nella progressione della patologia possono progredire (freccia) allo *step* successivo o essere arrestati dall'organismo da meccanismi di controllo endogeni non ancora pienamente caratterizzati (Immagine tratta da [71]).

Il *background* genetico del paziente e vari fattori ambientali influenzano tempi e modalità del processo infiammatorio nella progressione del T1DM; essi sono importanti nel determinare la grande eterogeneità caratterizzante la patologia. L'immunità naturale o innata di un organismo è costituita da quei meccanismi di difesa (presenti prima dell'esposizione all'antigene, fin dalla nascita dell'individuo), che riconoscono *patterns* molecolari conservati tra i patogeni grazie a

recettori aspecifici denominati *pattern-recognition receptors* (PRRs): a questa categoria appartengono i recettori TLRs (*Toll-like receptors*), i recettori RIG-I/MDA-5 (*RIG-I like receptors*) ed i recettori NLRs (*Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) [72]. L'attivazione dei PRR induce diversi eventi, tra cui l'espressione di chemochine e citochine proinfiammatorie, la sovra-espressione di molecole MHC di classe II e molecole co-stimolatorie sulla superficie di cellule dendritiche e macrofagi, fondamentali per il passaggio dalla risposta immunitaria innata a quella adattativa. Le isole del Langerhans umane e murine esprimono diversi membri della famiglia TLR, tra cui TLR3 e TLR4 ad alti livelli. Il TLR3 si attiva in presenza di RNA a doppio filamento (dsRNA), presente sia a livello intracellulare (cioè derivante da un'infezione virale), sia a livello del comparto extra-cellulare e proveniente da cellule danneggiate. Gli effetti dell'interazione ligando-PRR sono mediati principalmente dalle seguenti vie di trasduzione del segnale: la *pathway* MAPK e le *pathways* dei fattori di trascrizione NF- κ B, IRF e STAT, che innescano la produzione e la secrezione di citochine e chemochine; queste determinano: (i) la sovra-espressione di molecole MHC di classe I nelle β cellule; (ii) stress del reticolo endoplasmatico (ER stress); (iii) l'attivazione di segnali proapoptotici e (iv) attrazione nel luogo dell'infezione di cellule del sistema immunitario, che amplificano gli eventi precedentemente descritti, ad esempio mediante la produzione di citochine proinfiammatorie (es. IL-1 β , IFN- $\alpha/\beta/\gamma$, TNF). Questa infiammazione locale, se attentamente controllata, contrasta lo stimolo stressogeno iniziale (es. infezione virale); tuttavia in individui geneticamente predisposti un'esagerata risposta infiammatoria, insieme ad un mancato innesco di meccanismi antinfiammatori o antiapoptotici ha come risultato ultimo apoptosi massiva delle β cellule pancreatiche e insulino-deficienza (Fig. 15).

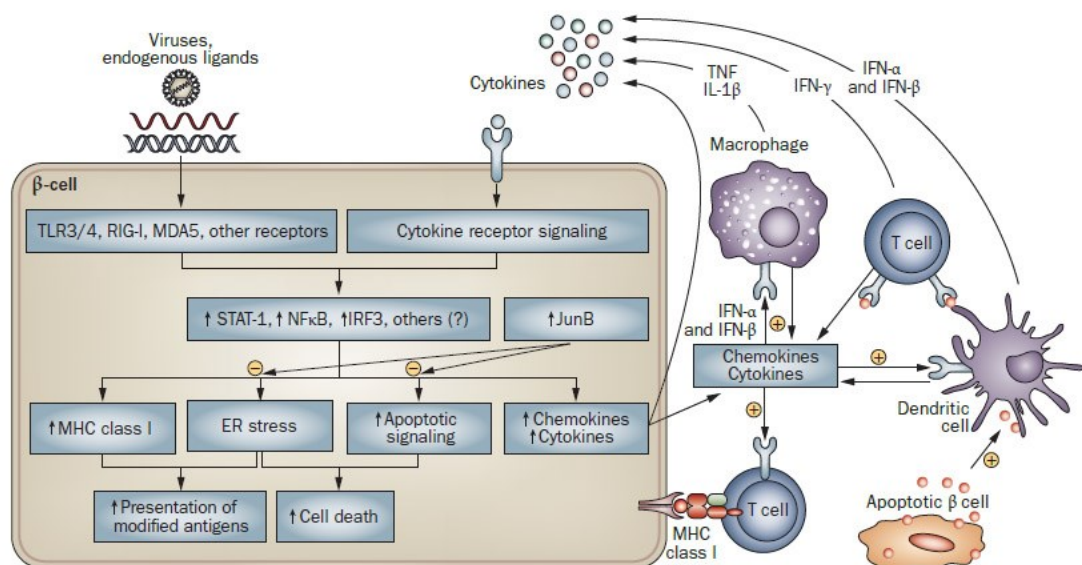


Figura 15. Il complesso *cross-talk* tra β cellule pancreatiche e cellule del sistema immunitario (Immagine tratta da [71]).

Questo modello è supportato da numerosi studi epidemiologici e clinici che dimostrano che lo “stimolo ambientale” rappresentato dalle infezioni virali (specialmente da parte di *Enterovirus* del gruppo dei *Coxsackie virus*) ha un ruolo importante nella eziopatogenesi del T1DM; in particolare, alcuni ceppi di *Coxsackie virus* hanno uno spiccato tropismo per le cellule β pancreatiche: infatti, sia l’RNA virale che la proteina capsidica VP1 sono stati rispettivamente individuati nel sangue e in isole pancreatiche *post-mortem* da pazienti affetti da T1DM [73]. Tra le diverse ipotesi che collegano le infezioni virali al fenomeno dell’insulite nel T1DM sono stati proposti: (i) eventi di mimetismo molecolare (*molecular mimicry*) tra epitopi di antigeni virali ed epitopi di antigeni “*self*” delle β cellule pancreatiche, che impediscono ai recettori delle cellule T di discriminare i due tipi di molecole, innescando o più verosimilmente amplificando la reazione autoimmune; (ii) stimolazione della secrezione di citochine (che insieme al dsRNA di origine virale modulano l’espressione di numerosi geni coinvolti a vario titolo nella funzione β cellulare, es. *SLC2A2*, *INS*, *PCSK1*, *GIP*, *CCK*). La relazione tra infezione da *Coxsackie virus* e citochine è stata ben messa in evidenza da Ylipaasto e coll. [74] che mediante tecnologia *microarray* hanno analizzato l’espressione genica in isole umane infettate da *Coxsackie virus B5* o trattate con citochine proinfiammatorie (IL1- β + TNF α), dimostrando che entrambi i sistemi attivano i medesimi meccanismi molecolari (l’espressione di 484 geni risulta essere comunemente alterata): tra questi, è stata riportata l’induzione di diverse chemochine come CXCL1, CXCL2, CXCL10 e della citochina IL-15.

Il ruolo cruciale del sistema immunitario nell’eziologia del T1DM è sottolineato anche dai molti geni della suscettibilità al T1DM con una funzione nella modulazione della risposta immune (es. presentazione dell’antigene, espansione delle cellule *self*-reattive), tra i quali: *ERBB3* (*v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3*), *IFIH1/MDA5* (*interferon induced with helicase C domain, 1*), *PTPN2* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2*), *TNFAIP3* (*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*) e molti altri (Tab. 1) [65].

ERBB3 (*v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3*)

- ERBB3 regola la funzione di *antigen presentig cells* di monociti e cellule dendritiche (DCs).

IFIH1 o MDA-5 (*interferon induced with helicase C domain 1*)

- Recettore citoplasmatico del dsRNA virale;
- Espresso in isole pancreatiche umane e sovra-espresso dopo infezione da *Enterovirus* o esposizione a PIC, *polyinosinic:polycytidylic acid* (un dsRNA virale di sintesi);
- L'inibizione di MDA-5 in β cellule pancreatiche riduce la produzione ed il rilascio di chemochine indotto dal trattamento con PIC; deprime l'*homing* delle cellule del sistema immunitario verso l'isola pancreatica nel corso dell'insulite;
- **Polimorfismi responsabili di una ridotta espressione di MDA-5 sono protettivi del T1DM.**

PTPN2 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2*)

- Altamente espresso in isole pancreatiche in ratto ed uomo;
- Importante ruolo nella modulazione del *signaling pathway* dell'interferone (IFN) nelle β cellule pancreatiche;
- L'inibizione dell'espressione di PTPN2 nelle β cellule determina l'attivazione di STAT e l'amplificazione dell'apoptosi mediata dall'azione di IFN $\alpha/\beta/\gamma$;
- **Polimorfismi responsabili di una ridotta espressione rendono le β cellule pancreatiche maggiormente suscettibili all'apoptosi.**

TNFAIP3 (*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*)

- Il gene candidato *TNFAIP3* codifica per una proteina citoplasmatica che è indotta da NF- κ B e riduce la durata e l'intensità del signalling di NF- κ B, in un processo di *negative feedback loop*;
- il fattore di trascrizione NF- κ B è attivato nelle β cellule dal *signaling* dei PRR e svolge un ruolo critico nell'infiammazione e nell'apoptosi;
- **Polimorfismi responsabili di una ridotta espressione di *TNFAIP3* sono associati ad un maggior rischio di sviluppare diverse patologie autoimmuni tra cui il T1DM.**

Tabella 1. Tabella rappresentativa del legame tra alcuni geni candidati al rischio di sviluppare T1DM e la funzione immunitaria.

Ruolo del sistema immunitario nel Diabete mellito di tipo 2

Il ruolo dell'autoimmunità nel Diabete mellito di tipo 2 rimane abbastanza controverso, sebbene diverse evidenze sperimentali suggeriscano la presenza di una connessione tra l'obesità (il principale fattore ambientale di rischio per l'insorgenza della patologia) e lo stato infiammatorio cronico e subclinico innescato dalle diete ipercaloriche in diverse tipologie tissutali coinvolte nella regolazione del metabolismo energetico: tessuto adiposo, muscolo scheletrico, fegato ed ipotalamo. A livello di questi tessuti bersaglio, gli alti livelli di lipidi introdotti con l'alimentazione attivano TLRs (*Toll-like receptors*) e stress del reticolo endoplasmatico, che determina: (i) insulino-resistenza per l'attivazione di specifiche serin-treonin chinasi; (ii) l'induzione di geni dell'infiammazione responsabili dell'iperproduzione di citochine (TNF α ed IL-1 β), che attraverso un *feed-forward loop* alimentano il *signaling* infiammatorio e l'insulino-resistenza. Questo processo infiammatorio a carico del tessuto adiposo sembra però essere non specifico della patologia, in quanto è comune a tutti gli individui obesi insulino-resistenti; il coinvolgimento dell'autoimmunità adattativa ed innata nel danno β cellulare in pazienti affetti da Diabete mellito di tipo 2 rimane da caratterizzare [75].

Ruolo delle citochine nell'apoptosi delle β cellule

Le citochine sono piccole molecole dal peso molecolare compreso tra 8 e 40000 Da; sono glicoproteine e proteine solubili e di membrana, che agiscono tipicamente nei processi di segnalazione del sistema immunitario. Ad oggi sono state identificate più di 200 citochine diverse, tradizionalmente suddivise in citochine proinfiammatorie (e.g. IL-1, IL-6, TNF α , TGF- β) ed antinfiammatorie (e.g. IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13); l'azione delle citochine proinfiammatorie è inibita dalla controparte antinfiammatoria o da specifici recettori solubili che funzionano da antagonisti; uno sbilanciamento nell'abbondanza relativa di citochine pro- ed antinfiammatorie, così come una loro azione aberrante, è caratteristica di diverse patologie di natura infiammatoria. Numerosi studi dimostrano che l'azione delle citochine non è limitata esclusivamente ad un meccanismo "difensivo": virtualmente tutte le cellule nucleate, comprese quelle costituenti la porzione endocrina del pancreas, sono produttrici e bersaglio di citochine infiammatorie e non-infiammatorie che ne regolano funzione, ciclo cellulare e vitalità. Ad esempio, un'attivazione transiente di IL-1R (*interleukin 1 receptor, type I*) determina nelle β cellule un aumento della proliferazione e della secrezione di insulina: questa risposta consente all'organismo di adattarsi alla maggiore richiesta insulinica nel corso di un'infezione sistemica o di stress metabolico. Anche la cellula α pancreatica non è esente dall'azione regolatoria delle citochine: ad esempio, le α cellule esprimono livelli più alti del recettore per l'IL-6 rispetto a molti altri tessuti e rispetto agli altri tipi cellulari dell'isola del Langerhans; è logico, quindi, che l'IL-6 incrementi proliferazione, massa ed attività secretoria delle α cellule [76]. Tuttavia, se l'azione delle citochine eccede il potenziale regolatorio operato dalle stesse isole, la risposta "positiva e coordinata" può diventare deleteria, specificatamente per le β cellule (Fig. 16).

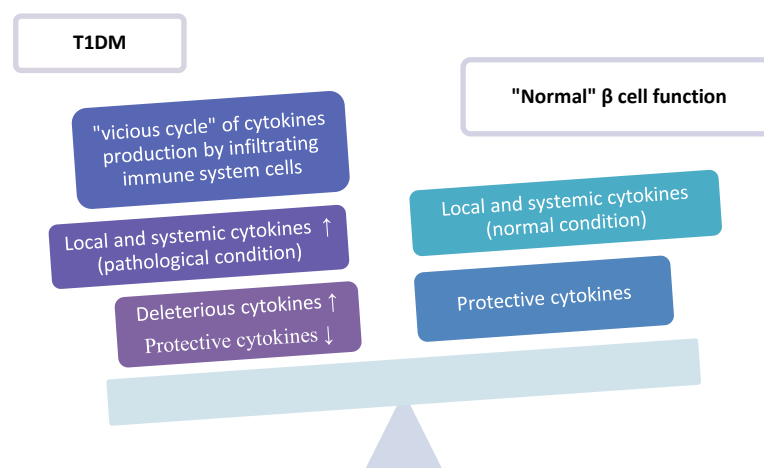


Figura 16. Rappresentazione schematica del ruolo delle citochine nella fisiologia delle β cellule pancreatiche e nell'insorgenza del T1DM.

I primi pionieristici studi sul ruolo delle citochine nella disfunzione delle β cellule sono stati effettuati da Mandrup-Poulsen e coll. a metà degli anni '80; essi dimostrarono che l'incubazione prolungata di isole pancreatiche isolate con un *medium* condizionato, derivato da monociti periferici attivati, determinava inibizione della sintesi insulinica e degenerazione. L'interleuchina-1 è stata identificata quale primo componente di questo *medium* condizionato a causare il danno alle isole [77, 78]. Queste osservazioni portarono all'ipotesi che le citochine presenti nell'ambiente periinsulare nel corso dell'insulite potessero interferire con la funzione β cellulare ed essere causa della loro distruzione. A partire dagli anni '90 gli effetti delle citochine (principalmente di IL-1 β , IFN γ e TNF α) sulla secrezione insulinica e sulla vitalità delle β cellule sono stati ampiamente studiati. I fenomeni individuati a valle della stimolazione con citochine sono molteplici e comprendono: (i) l'inibizione dell'esocitosi dei granuli contenenti insulina; (ii) il blocco della sintesi proteica per *deficit* nel metabolismo dei substrati energetici; (iii) stress del reticolo endoplasmatico; (iv) morte cellulare per necrosi e/o apoptosi [79]. Gli effetti citotossici riportati sono *in primis* il risultato di uno scompenso tra l'azione antiapoptotica e quella proapoptotica di geni, la cui espressione ed attività è regolata dalle stesse citochine [79-81]. Tuttavia, la natura delle citochine coinvolte, la loro concentrazione ed i tempi di esposizione sono fondamentali nel determinare attraverso quale *pathway* molecolare si esplica la loro azione citotossica.

Meccanismi molecolari della distruzione β cellulare mediata dalle citochine

La famiglia di recettori e ligandi IL-1 è associata ai processi infiammatori più di qualsiasi altra famiglia di citochine. Degli 11 membri che la compongono, l'azione dell'interleuchina 1- β (IL-1 β) è risultata cruciale per la patogenesi di un numero sempre crescente di patologie a base infiammatoria, come il Diabete Mellito. L'apoptosi delle β cellule indotta dall'IL-1 β è il risultato di una complessa cascata di eventi che inizia con il legame dell'interleuchina secreta da macrofagi e linfociti T attivati al suo specifico recettore (IL-1R1) sulla superficie delle cellule "bersaglio". Quando l'IL-1 β contatta il recettore, vengono reclutati sul versante citoplasmatico dello stesso diverse proteine adattatrici e chinasi, includenti nell'ordine IL-1RAcP, MyD88, IRAK1-2/TOLLIP e TRAF6. La cascata di eventi converge nell'attivazione di due principali *pathways* molecolari: MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*) e NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*) [82, 83]. Anche il TNF α determina l'attivazione della *pathway* di NF- κ B nelle β cellule pancreatiche [84]. Il legame del TNF α al recettore TNFR1 (presente anche sulla superficie delle cellule β pancreatiche) determina la sua trimerizzazione ed attivazione; il *death domain* citosolico del TNFR1 attivato recluta diverse proteine adattatrici come TRADD (*TNF receptor-associated death domain*), TRAF2 e RIPK1 (*receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1*). In una complessa serie coordinata di eventi TRAF2 contatta IKK (*I κ B kinase*) e ne induce

l'attivazione (fosforilazione) in maniera RIP-dipendente: il risultato finale è la liberazione del fattore NF- κ B. Il *signaling* del TNF α può portare anche all'attivazione delle MAP chinasi, RIP-dipendenti, precedentemente descritte (ERK, p38 e JNK) [85]. L'IFN γ è una citochina omodimerica. Il recettore dell' IFN γ (IFNGR) nella sua forma attivata consiste di due catene α (IFN γ R α) capaci di legare l'interferone gamma, di due catene β (IFN γ R β) e del macchinario proteico responsabile della trasduzione del segnale. Essendo entrambe le catene mancanti di attività chinastica/fosfatase diventa cruciale il loro legame alle proteine di trasduzione del segnale JAK1 (*janus tyrosine kinase 1*) e JAK2 (*janus tyrosine kinase 2*), associate rispettivamente a IFN γ R α e IFN γ R β . L'oligomerizzazione del recettore assicura l'avvicinamento e l'attivazione di JAK1 e JAK2, che sono responsabili della fosforilazione di IFNGR e del conseguente reclutamento di due molecole del fattore di trascrizione STAT1 (*signal transducer and activator of transcription-1*). Dopo la fosforilazione da parte di JAK2, STAT1 omodimerizza e trasloca a livello nucleare dove innesca l'espressione dei geni bersaglio. Moore e coll. [86] hanno indagato mediante tecnologia *microarray* il *network* a valle del fattore di trascrizione STAT1 in β cellule pancreatiche di ratto (linea INS1E), esposte a citochine (IL-1 β + IFN γ) e trasfettate con un siRNA diretto contro STAT1; i loro dati dimostrano che oltre 2000 geni sono controllati da STAT1 nel sistema in esame. STAT1 è stato dimostrato indurre: (i) la sotto-espressione di geni specifici della funzione β cellulare (es. *Ins*, *Slc2a2*) e di fattori di trascrizione, responsabili del mantenimento dello stato differenziato (es. *MafA*, *NKx2.2*, *Pdx1*); (ii) la sovra-espressione di importanti regolatori dell'apoptosi (es. *Bax*, *Bbc3*, *Bid*, *Casp3*, *Casp5*, *Casp7*, *Ddit3*, *Hrk*), dello stress del reticolo endoplasmatico (es. *Xbp1*, *Atf4*), di chemochine (*Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11* e *Cxcl20*).

Nuclear factor-kappa B signaling

Il fattore di trascrizione NF- κ B può regolare la trascrizione di numerosi geni *target* che comprendono citochine (e.g. IL-1 β , TNF α , IFN γ), chemochine, immunorecettori, proteine coinvolte nella presentazione dell'antigene, molecole di adesione cellulare, geni della risposta allo stress e regolatori dell'apoptosi (sia anti- che proapoptotici), fattori di crescita ed altri fattori di trascrizione [87]. Gli effetti esercitati da NF- κ B sono molteplici ed altamente cellulo-specifici: nella maggior parte dei tipi cellulari l'attivazione di NF- κ B promuove la sopravvivenza cellulare e la proliferazione ma nelle β cellule pancreatiche esibisce un ruolo tipicamente proapoptotico. Il ruolo chiave del fattore di trascrizione NF- κ B nella morte β cellulare innescata dalle citochine è stato dimostrato attraverso l'utilizzo di una forma mutante e non degradabile dell'inibitore di NF- κ B (I κ B), chiamato in questo caso "*I κ B super-repressor*". L'infezione di β cellule primarie di ratto con un *adenovirus* codificante per il super-repressore I κ B (AdI κ B^(SA)₂) ha determinato il blocco nell'espressione genica citochino-mediata di *iNos*, *Fas* e *Sod2* ed una sostanziale riduzione nell'apoptosi indotta dall'esposizione ad una

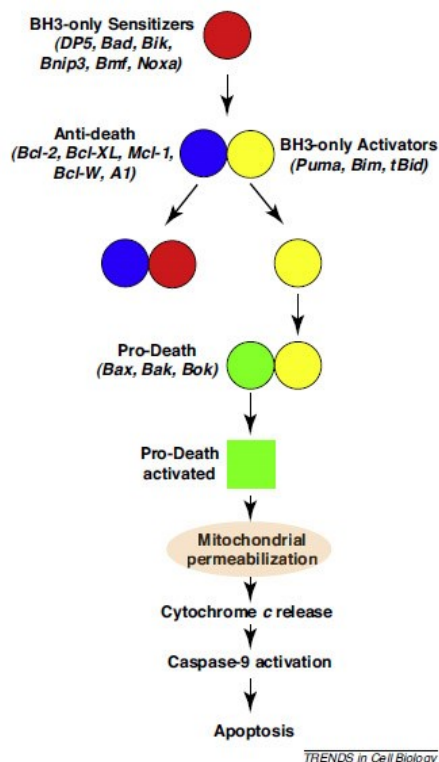
combinazione delle citochine IL-1 β e IFN γ [88]. Similmente, esperimenti condotti su isole pancreatiche umane hanno dimostrato che l'inibizione di NF- κ B ha una funzione protettiva dagli effetti deleteri dell'IL-1 β e dall'apoptosi FAS-dipendente [89]. Come detto in precedenza, sono stati identificati diversi geni la cui espressione è controllata dal fattore di trascrizione NF- κ B in β cellule primarie di ratto trattate con citochine: NF- κ B è responsabile della sovra-espressione di geni della risposta allo stress (es. *Ddit3*, *Cebpb*, *Hsp27* ed *Sod2*) e della risposta immunitaria (es. MHC-II *associated invariant chain* γ e MHC-I) e della sotto-espressione di geni coinvolti nella funzione β cellulare (*Slc2a2*), nella produzione di insulina (*Isl1*), nel processamento dell'insulina (*Pcsk1*), nel rilascio dell'insulina (*Pld1*, *Cckar*) e nell'omeostasi del Ca²⁺ (*Atp2a2*, *Itpka*) [87]. *iNos* (*Inducible Nitric Oxide Synthase*) è uno dei geni più fortemente indotti da NF- κ B in β cellule di ratto ed isole pancreatiche umane [90] trattate con citochine; l'induzione di *iNos* aumenta la produzione di ossido nitrico (NO) nelle β cellule. Nelle β cellule pancreatiche, così come in altri tipi cellulari, l'esposizione prolungata e ad alte concentrazioni di NO determina la nitrosilazione di specifici residui di cisteina (S-nitrosilazione) e la formazione di S-nitrosotoli che influenzano attività, stabilità e localizzazione proteica; questi eventi sono responsabili di un severo danno mitocondriale che innesca la morte cellulare per apoptosi o necrosi. Diverse evidenze sperimentali dimostrano tuttavia che le isole pancreatiche umane sono più resistenti della controparte murina al danno inflitto dall'ossido nitrico, probabilmente a causa dei più alti livelli della *heat shock protein 70* (*HSP70*), che protegge le cellule dallo stress ossidativo [91].

MAPK signaling

Il *signaling* dell'interleuchina-1 β nelle β cellule pancreatiche è responsabile dell'attivazione dei principali membri della famiglia MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*): ERK (*extracellular-signal regulated kinase*), p38 e JNK (*c-jun N-terminal kinase*), che mediante diversi meccanismi innescano la via intrinseca dell'apoptosi. In particolare, diverse evidenze sperimentali sottolineano l'importante ruolo di JNK nell'induzione dell'apoptosi in risposta alle citochine e allo stress ossidativo in β cellule pancreatiche umane e murine [92, 58]. JNK esplica la sua azione proapoptotica modulando l'attività di diversi membri della famiglia Bcl-2 come *DP5/Hrk* [93], *Mcl-1* [94], *Bcl-2* [95]. L'iperattivazione della *pathway* delle MAP chinasi, caratteristica del Diabete Mellito, è riconducibile ad almeno due differenti meccanismi: (i) la produzione di ossido nitrico (NO) che determinerebbe una sostenuta attività di JNK [96]; (ii) la severa disfunzione osservata nelle β cellule pancreatiche di GADD45 β , l'inibitore naturale di JNK [83].

Le citochine modulano l'espressione e/o l'attività di diversi membri della famiglia Bcl-2 [81]. I membri della famiglia Bcl-2 sono caratterizzati dalla presenza da uno a quattro domini BH (*BCL-2 homology domain*); a seconda delle loro caratteristiche morfologiche e funzionali, le proteine della famiglia Bcl-2 possono essere classificate in tre grandi gruppi: proteine

antiapoptotiche multidominio (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, A1), proteine proapoptotiche multidominio (Bax, Bak, Bok) e “BH3-only” (Hrk, Bad, Bik, Bnip3, Bmf, Noxa); quest’ultimo gruppo è a sua volta costituito da membri *BH3-only* sensibilizzatori (*sensitizers*) e membri attivatori (*activators*). Le diverse interazioni tra i membri anti- o proapoptotici della famiglia



sono alla base dell’attivazione della via intrinseca dell’apoptosi. Nel modello gerarchico di interazione tra i diversi membri della famiglia Bcl-2 (**Vedi figura a lato, figura 17**, Immagine tratta da [81]) le proteine multidominio con funzione pro- ed antiapoptotica si comportano da effettori finali del processo di morte/sopravvivenza cellulare, mentre le proteine *BH3-only* svolgono funzione regolatoria. I membri *BH3-only sensitizer*, legandosi a membri antiapoptotici, determinano il rilascio dei membri *BH3-only activators* precedentemente repressi dal legame con i membri antiapoptotici della famiglia; una volta “libere”, le proteine *BH3-only activators* possono contattare ed attivare nel citoplasma gli effettori proapoptotici. Il rapporto tra membri anti- o proapoptotici della famiglia Bcl-2 funziona

solitamente come un “reostato”, che determina l’*outcome* fenotipico finale. Questo modello gerarchico di interazione è applicabile anche alle β cellule pancreatiche. Studi *in vitro* condotti su diversi modelli umani e murini di isole pancreatiche o β cellule dimostrano che il trattamento con diverse combinazioni/concentrazioni di citochine determina l’attivazione di *pathways* apoptotiche diverse a seconda delle citochine e delle modalità di trattamento condotte [81]. Evento comune a tutti i processi di morte cellulare indotta dalle citochine nelle β cellule pancreatiche è tuttavia la traslocazione di BAX al mitocondrio, il rilascio del citocromo c, l’attivazione della caspasi iniziatrice 9 e delle caspasi effettrici 3 e 7 [97, 98]. Il *background* genetico dell’individuo, l’innesco iniziale (es. infezioni virali, ligandi endogeni dei TLR, ecc), il grado e lo stato di avanzamento dell’insulite, così come la composizione cellulare dell’infiltrato immunitario, risultano quindi fattori importanti nella determinazione qualitativa (tipologia) e quantitativa (concentrazione) delle citochine coinvolte nella disfunzione β cellulare [71] e di conseguenza nella *pathway* molecolare di morte attivata.

La famiglia di fattori di trascrizione C/EBP

Insieme a quelli precedentemente descritti, numerosi altri fattori di trascrizione sono considerati responsabili dei cambiamenti nell'espressione genica β cellulare in risposta alle citochine, tra i quali diversi membri della famiglia C/EBP (*CAAT Enhancer Binding Proteins*). La famiglia di fattori di trascrizione C/EBP è costituita da sei membri strutturalmente ed evolutivamente correlati coinvolti in molteplici funzioni nell'organismo: regolazione del metabolismo energetico, immunità innata ed adattativa, infiammazione, ematopoiesi, adipogenesi, differenziamento, regolazione della proliferazione e del ciclo cellulare (Tab. 2). Le similarità tra i diversi membri della famiglia C/EBP suggeriscono una storia evolutiva di duplicazioni geniche e successiva pressione selettiva. L'espressione dei diversi membri della famiglia è specifica per tessuto e momento dello sviluppo; ad esempio, C/EBP α è fortemente espresso nei progenitori della linea mieloide, ma la sua massa diminuisce durante il differenziamento.

Protein	Locus	Human	Mouse	Common Features
C/EBP α	CEBPA	19q13.11	7qB1	CpG, No IVS, 55 kb upstream of CEBPG
C/EBP β	CEBPB	20q13.13	2qH3	CpG, No IVS
C/EBP γ	CEBPG	19q13.11	7qB1	CpG, IVS within Large 5' UTR
C/EBP δ	CEBPD	8q11.21	16qA2	CpG, No IVS
C/EBP ϵ	CEBPE	14q11.2	14qC3	IVS within CDS
C/EBP ζ	DDIT3	12q13.3	10qD3	2 IVS within 5' UTR, 1 IVS within CDS

Tabella 2. Membri della famiglia C/EBP e caratteristiche strutturali (Immagine tratta da [99]).

Il prototipico C/EBP, così come la maggior parte dei fattori di trascrizione, consiste di una struttura modulare costituita da: (i) un dominio di attivazione (*Transcription Activation Domain*, TAD) all'N-terminale, importante per le interazioni proteina-proteina che determinano direttamente o indirettamente l'inizio della trascrizione; (ii) un dominio basico di circa 20 nucleotidi (denominato bZIP: *basic leucine zipper*) per il legame al DNA (*DNA Binding Domain*, DBD), che svolge anche la funzione di *tag* nucleare (*Nuclear Localization Signal*, NLS); (iii) un dominio di multimerizzazione ricco in leucine (*leucine-rich dimerization domain*), che consente la formazione di omodimeri ed eterodimeri, ad esempio con fattori di trascrizione delle famiglie NF- κ B e Fos/Jun (Fig. 18). Il modulo bZIP è altamente conservato all'interno del supergruppo bZIP e si mantiene quasi identico in tutte le isoforme della famiglia C/EBP: esistono quindi minime differenze nelle selettività dei siti *target* sul DNA, soprattutto quando la multimerizzazione avviene tra isoforme dello stesso tipo (omodimeri).

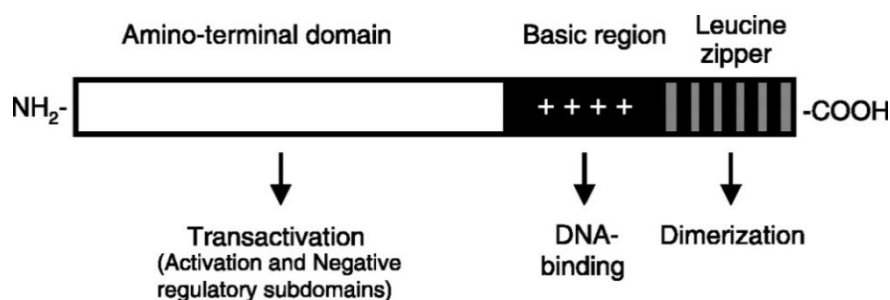


Figura 18. Rappresentazione schematica dei domini funzionali di un fattore di trascrizione della famiglia C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) (Immagine tratta da [100]).

La dimerizzazione dei membri della famiglia C/EBP è essenziale per il legame al DNA e, come detto, si realizza attraverso un dominio di dimerizzazione detto *leucine zipper* (LZ). Ogni dominio LZ è costituito da ripetizioni di sette aminoacidi (denominate eptadi), lungo una α -elica di 30-40 aa. Dei sette aminoacidi della ripetizione (*a,b,c,d,e,f,g*), almeno quattro sono aminoacidi idrofobici ed apolari, tipicamente leucine. L' α -elica ha un passo che espone tutte le leucine dallo stesso lato, creando una superficie per le interazioni di tipo Van der Waals: tale struttura è la base per l'unione di due α -eliche a formare una struttura a spirale (*coiled-coil*), nella quale le leucine di un'elica sono addossate in orientamento parallelo alle leucine dell'altra elica, come in una "cerniera". Analisi comparative dimostrano tuttavia che anche quattro ripetizioni sono sufficienti per la dimerizzazione delle α -eliche nella struttura *coiled-coil*. La regione basica del dominio α -elica *coiled-coil* è il dominio per il legame del dimero al solco maggiore del DNA su lati opposti della doppia elica. Il sito di legame ottimale per C/EBP consiste di sequenze palindromo o molto simili ad esse (*palindrome-like sequence*), con ogni emisito costituito dal pentanucleotide 5'-ATTGC-3'. La sequenza consenso per le proteine della famiglia C/EBP è classicamente rappresentata come RTTGC•GYAAY (dove R = A o G e Y = C o T). Numerosi siti di legame per membri della famiglia C/EBP identificati per geni cellulari e virali possono deviare rispetto alla sequenza palindromica consenso; questo evento è dovuto (i) alla maggiore specificità che alcuni fattori bZIP hanno per un singolo emisito; (ii) alla eterodimerizzazione dei fattori C/EBP con altri membri della superfamiglia bZIP [99].

Ruolo dei membri della famiglia C/EBP nella β cellula pancreatica

A livello della β cellula pancreatica il fattore di trascrizione C/EBP β (*CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta*) agisce regolando negativamente la produzione di insulina e favorendo lo stress del reticolo endoplasmatico; C/EBP β è sovraespresso in isole pancreatiche di animali pre-diabetici e diabetici ed in linee β cellulari, esposte ad alte concentrazioni di glucosio [101]. I topi Akita sono un efficace modello per lo studio del DM, poichè manifestano una severa deplezione della massa β cellulare come conseguenza di ER stress; topi Akita C/EBP $\beta^{-/-}$ mostrano: (i) aumento delle concentrazioni di insulina plasmatica e pancreatica con conseguente miglioramento della

condizione iperglicemica; (ii) incremento della massa β cellulare. C/EBP β promuove l'apoptosi della β cellula incentivando lo stress del reticolo endoplasmatico a seguito del blocco della trascrizione ATF6-mediata dello chaperon molecolare Grp78 [102]. La sovraespressione di C/EBP β (sia a livello di mRNA che di proteina), riscontrata in cellule della linea MIN6 ed isole pancreatiche isolate trattate con tunicamicina (un potente induttore dello stress del reticolo endoplasmatico), sottolinea il ruolo proapoptotico di C/EBP β per meccanismi legati allo stress del reticolo endoplasmatico [102].

Anche C/EBP ξ , conosciuto come CHOP (*C/EBP Homologous Protein*) o DDIT3 è un altro membro della famiglia C/EBP, che ricopre un ruolo importante nell'apoptosi citochino-mediata e nell'infiammazione β cellulare. L'espressione di CHOP è indotta dalle citochine in cellule INS-1E ed isole cellulari umane trattate con diverse combinazioni di citochine; in questi sistemi CHOP ha una duplice azione sulla morte cellulare: (i) agisce degradando le molecole antiapoptotiche Bcl-2 ed Mcl-1; (ii) promuove l'attività di NF- κ B, un fattore di trascrizione che controlla l'espressione di diverse citochine e chemochine ed altri geni, che rivestono un ruolo importante nell'apoptosi delle β cellule (quali iNOS e FAS) [103] (Fig. 19).

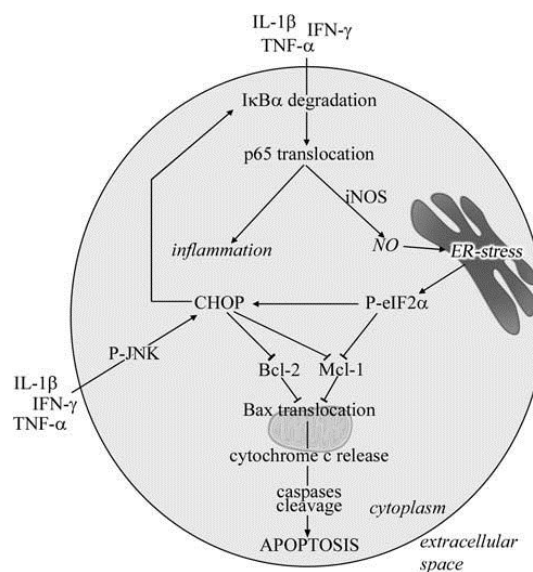


Figura 19. Modello rappresentante il ruolo di C/EBP ξ (CHOP) nella apoptosi delle β cellule indotta dalle citochine (Immagine tratta da [103]).

La relazione tra membri della famiglia C/EBP ed il fattore di trascrizione NF- κ B nell'induzione dell'apoptosi nelle β cellule è stata evidenziata anche da Darville e coll., che hanno dimostrato la cooperazione tra C/EBP β ed NF- κ B nell'espressione di *Fas* in β cellule esposte all'IL-1 β [104]. Il fattore di trascrizione C/EBP δ (*CCAAT/Enhancer Binding Protein Delta*) è espresso nella linea β cellulare INS-1E, in β cellule primarie di ratto ed in isole pancreatiche umane; la sua espressione è indotta precocemente dopo l'esposizione dei modelli precedentemente citati alla combinazione delle citochine IL-1 β e IFN γ attraverso un meccanismo NF- κ B e STAT1-

dipendente; come rivelato dai trattamenti di cellule INS-1E con singole citochine, l'IL-1 β è l'induttore chiave dell'espressione di C/EBP δ . Il ruolo di C/EBP δ in questi sistemi è stato indagato mediante l'utilizzo di siRNA specifici; lo "spegnimento" di C/EBP δ in cellule INS-1E, β cellule primarie di ratto ed in isole pancreatiche umane determina un incremento dell'apoptosi indotta dalle citochine (IL-1 β + IFN γ); questo evento ha le seguenti caratteristiche: (i) non è dovuto all'amplificazione dello stress ossidativo/nitrosativo; (ii) non correla con una ridotta funzionalità β cellulare, ed in particolare con la capacità delle β cellule di ossidare il glucosio; (iii) determina un aumento funzionale dell'espressione di CHOP (C/EBP ξ) e STAT1, sia a livello di mRNA che a livello proteico; questi due fattori di trascrizione sono responsabili di diversi eventi negativi a livello della β cellula, tra i quali l'induzione della molecola proapoptotica BIM (Fig. 20). Questi dati rivelano che l'attivazione di C/EBP δ in β cellule esposte a citochine rappresenta un meccanismo difensivo che la cellula mette in atto per sfuggire al danno [105]. Per il fattore di trascrizione C/EBP α non sono note invece evidenze sperimentali a supporto di un suo coinvolgimento nella fisiologia β cellulare, né nella risposta allo stimolo proapoptotico mediato dalle citochine proinfiammatorie.

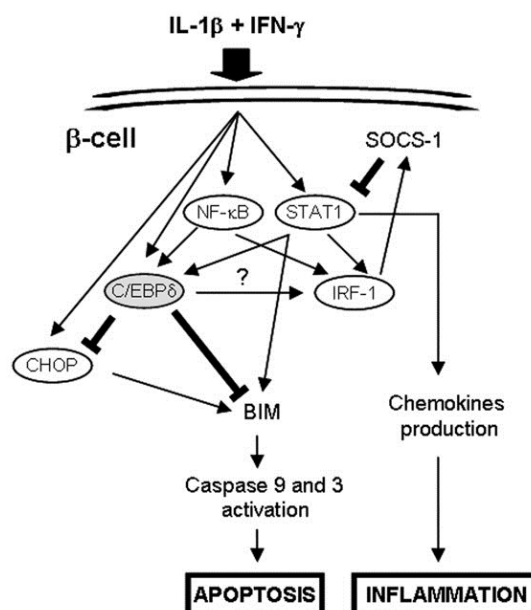


Figura 20. Modello rappresentante il ruolo di C/EBP δ nell'apoptosi delle β cellule mediata dalle citochine (Immagine tratta da [105]).

Il fattore di trascrizione C/EBP α

C/EBP α è il primo membro della famiglia C/EBP ad essere stato scoperto e caratterizzato. L'espressione di C/EBP α è tipicamente connessa al differenziamento dell'adipocita, dell'epatocita e dei neutrofili ed è principalmente espresso in cellule post-mitotiche. C/EBP α presenta due isoforme proteiche (p42 e p30), generate mediante *ribosomal scanning* a partire da un unico mRNA. L'isoforma *full-length* di 42kDa si origina quando la traduzione inizia dal

secondo codone AUG e contiene tre domini TAD (TEI-TEIII); TEI e TEII mediano il legame cooperativo di C/EBP α a TBP (*TATA box-binding protein*) e TFIIB, due *General Transcription Factors* (GTFs) dell'apparato trascrizionale dell'RNA polimerasi II; TEIII contiene invece un subdominio di regolazione negativa. L'isoforma più corta di 30kDa è generata a partire dal terzo codone AUG, 351 nucleotidi a valle del primo AUG, e mantiene i domini di dimerizzazione e DNA-binding ma possiede un alterato dominio di TAD se paragonato all'isoforma da 42kDa [106].

Il ruolo di C/EBP α nella proliferazione e l'apoptosi

La prima evidenza del ruolo anti-proliferativo di C/EBP α si è avuta dimostrando che l'induzione estrogeno-mediata di C/EBP α in un sistema chimerico C/EBP α -*Estrogen Receptor* (ER) in pre-adipociti della linea 3T3-L1 determinava l'arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1 [107]; altri studi hanno rivelato che l'azione anti-proliferativa di C/EBP α è caratteristica anche di epatociti (es. Hep3B2), cellule di osteosarcoma (es. Saos2) e cellule mieloidi; soprattutto in quest'ultimo tipo cellulare il potente ruolo anti-proliferativo esercitato da C/EBP α è stato ampiamente indagato. Il sequenziamento di C/EBP α in pazienti con leucemia mieloide acuta (AML) ha rivelato che il 7.3% mostra a livello delle cellule tumorali mutazioni eterozigoti negli alleli di C/EBP α ; queste mutazioni appartengono principalmente a due classi: i) mutazioni nella regione bZIP che alterano il legame al DNA; 2) mutazioni che determinano la sintesi di una forma troncata di C/EBP α e la sovraespressione dell'isoforma proteica più piccola, detta p30, la quale si comporta come un inibitore dominante della trascrizione C/EBP α -dipendente poiché è priva del dominio N-terminale di transattivazione. Oltre alle mutazioni descritte, altri meccanismi determinano una “depressione” nell'azione di C/EBP α , tra i quali il blocco della trascrizione o della traduzione per opera di proteine di fusione tipicamente connesse alla patologia (AMLETO, BCL-ABL e AML1-MDS1-EVI1). Bassi livelli del fattore di trascrizione C/EBP α o una sua azione aberrante faciliterebbero lo sviluppo dell'AML bloccando il differenziamento della linea mieloide ed una iper-proliferazione cellulare; quest'ultimo evento è associato ad un maggiore rischio di acquisire altre mutazioni per la trasformazione e l'oncogenesi. Riportando C/EBP α a livelli fisiologici viene soppressa la proliferazione *in vitro* e la tumorigenesi *in vivo* [108]. Diversi sono i meccanismi molecolari attraverso cui C/EBP α agisce bloccando la proliferazione, tra i quali: (i) l'attivazione dell'inibitore della chinasi ciclina-dipendente p21; (ii) l'inibizione delle cicline CDK2 e CDK4; (iii) la regolazione del complesso RB-E2F; (iv) l'inibizione della trascrizione mediata da E2F (Fig. 21) [109].

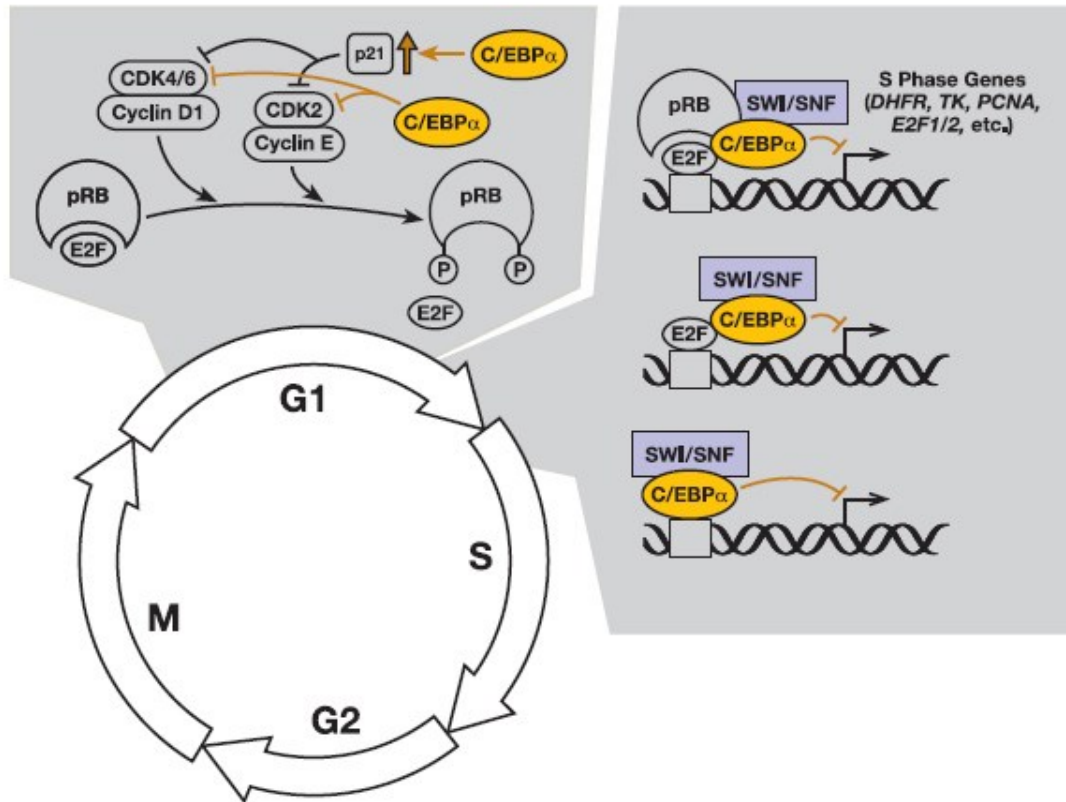


Figura 21. Modelli molecolari nell'arresto del ciclo cellulare mediati da C/EBP α (Immagine tratta da [109]).

C/EBP α risulta sotto-espresso in diversi tipi tumorali, come il carcinoma polmonare, tumori squamosi dei distretti della testa e del collo e cancro al seno [110]. In alcuni tipi cellulari C/EBP α accoppia alla funzione anti-proliferativa la capacità di indurre apoptosi; l'attività proapoptotica esercitata da questo fattore di trascrizione è cellulo-specifica e si realizza mediante diversi meccanismi: ad esempio, l'espressione ectopica di C/EBP α determina apoptosi in cellule NIH3T3, ma non nelle linee Hep3B2, HEK293, 3T3-L1. Nei fibroblasti della linea NIH3T3 l'azione proapoptotica di C/EBP α richiede il legame a siti specifici del DNA e l'alterazione nell'espressione di *targets* trascrizionali coinvolti nell'apoptosi (ARL6IP5, Calpain, Ras, Fas) e nel ciclo cellulare (HDAC1, HDAC4, HDAC5, p14INK4, p15INK4, p16INK4 e p19ARF) [111]. In linee cellulari di carcinoma del seno (MCF7 e MDA-MB23) [112] ed in cellule epatiche stellate di ratto (HSC, *Hepatic Stellate Cells*), C/EBP α svolge un ruolo proapoptotico; in quest'ultimo sistema, l'azione proapoptotica di C/EBP α si esercita mediante l'attivazione di PPAR γ e p53 e l'induzione di Fas, FasL, DR5 e TRAIL [113].

I microRNA e la β cellula

La prima indicazione di un coinvolgimento dei microRNA nella regolazione della funzionalità β cellulare è stata fornita dal lavoro di Poy e coll., che hanno identificato il miR-375 come specificatamente espresso nelle isole del Langerhans e coinvolto nel controllo della secrezione di insulina glucosio-dipendente (GSIS) mediante la regolazione dei livelli del gene *Mtpn* (*myotrophin*), codificante per una proteina coinvolta nell'esocitosi dei granuli di insulina [114]. Topi *knockout* (KO) per il miR-375 sono iperglicemici, manifestano una diminuzione significativa nella massa β pancreatica, e presentano ridotti livelli di insulina plasmatica; in questi animali si riscontra, inoltre, una maggiore quantità di α cellule, più alti livelli di glucagone, aumentata gluconeogenesi ed un maggiore *output* di glucosio epatico rispetto a topi WT (*wild type*) [115]. Similmente al miR-375, molti altri microRNA come miR-124a2, miR-9, miR-96 influenzano la secrezione insulinica (Fig. 22). Il miR-124a esiste in 3 isoforme (miR-124a1, a2 e a3), che sono abbondanti nelle β cellule pancreatiche; di queste, il miR-124a2 è coinvolto: (i) nel differenziamento della β cellula pancreatica e nello sviluppo del pancreas, poichè regola negativamente l'espressione dei fattori di trascrizione *Creb* (*cAMP-responsive element binding protein*) e *Foxa2* (*forkhead box protein A2*); (ii) nella secrezione insulinica poichè agisce sulla espressione dei canali di membrana *Kir6.2/Kcnj11* (*potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11*) e *Sur.1/Abcc8* (*ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8*) [116]. Appropriati livelli del miR-9 sono richiesti per un ottimale rilascio di insulina in risposta al glucosio (GSIS) ed ad altri segretagoghi. Questo microRNA è espresso principalmente nei tessuti neuronali ed in quantità minore a livello delle isole pancreatiche; la sovraespressione del miR-9 nelle β cellule determina una riduzione dei livelli di *Onecut2* e l'aumento di *granuphilin/Spl4* (*synaptotagmin-like 4*), un regolatore negativo della secrezione insulinica [117]. Il miR-96 regola l'espressione del gene *Rph3al/Noc2* (*rabphilin 3A-like without C2 domains*) ed agisce allo stesso modo su *granuphilin/Spl4* e l'esocitosi dell'insulina. Altri microRNA contribuiscono invece alla citotossicità mediata dalle citochine proinfiammatorie; l'esposizione cronica ad IL-1 β + TNF α di cellule β della linea MIN6 e di isole pancreatiche umane altera la funzione della β cellula e determina una riduzione della secrezione insulinica ed una sensibilizzazione all'apoptosi indotta dalle citochine; in questo sistema sperimentale è stato riscontrato un aumento nell'espressione dei microRNA 21, 34a e 146a. Una sovraespressione dei microRNA miR-34a e miR-146a è stata osservata anche in organismi modello, come i topi NOD nella fase di insulite pre-diabetica ed i topi *db/db*. [118, 119].

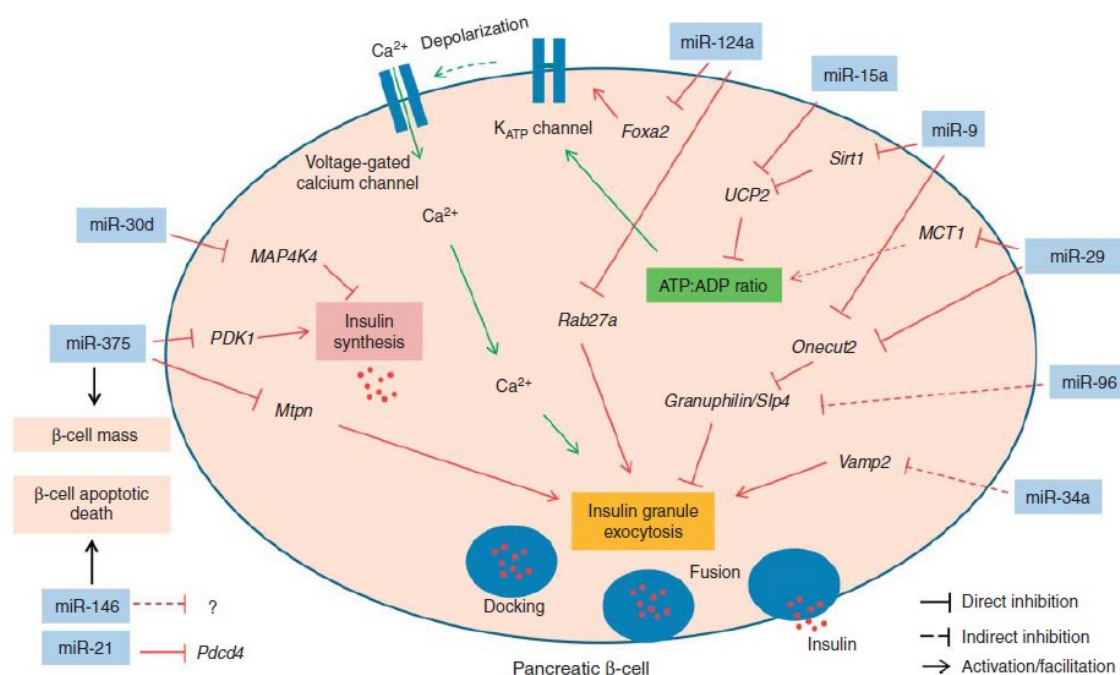


Figura 22. Schema rappresentativo del ruolo dei microRNA nella β cellula (Immagine tratta da [120]).

La possibilità che agendo sui livelli dei microRNA disregolati nella patologia si possa ristabilire la secrezione insulinica o la sensibilità all'azione ormonale a livello dei tessuti bersaglio rende i microRNA promettenti target terapeutici nel Diabete Mellito così come in molte altre patologie [120]. Diversi approcci sono stati sviluppati allo scopo di riportare i microRNA ai livelli fisiologici: l'utilizzo di oligonucleotidi Anti-miRNA (AMOs, *Anti-miRNA oligonucleotides*), che inibiscono in maniera diretta e specifica l'azione dei microRNA è una delle più comuni strategie nella terapia basata sui microRNA; l'altra tecnica si basa invece sull'azione di molecole che mimano l'azione dei microRNA (*miRNA mimics*). Gli AMOs sono analoghi degli oligonucleotidi modificati chimicamente allo scopo di migliorarne il *delivery* (trasporto alla cellula *target*) e funzionalità. Sebbene gli AMOs non sono ad oggi usati nella terapia del Diabete Mellito, diverse evidenze sperimentali dimostrano l'azione efficace di diversi oligonucleotidi antisense nel ripristino della funzionalità β cellulare. Ad esempio, l'utilizzo dell'antisense *2'-O-methyl-miR-375* aumenta l'espressione del target *Pdk1* e riporta la secrezione dell'insulina alla normalità in cellule della linea INS-1E [121]; gli antisense *2'-O-methyl-miR-103* e *2'-O-methyl-miR-107* migliorano l'omeostasi del glucosio e la sensibilità all'insulina in topi *ob/ob* [122]; molecole antisense contro il miR-21, il miR-34a ed il miR-146a prevengono la riduzione della secrezione di insulina glucosio-indotta in cellule della linea MIN6 trattate con IL-1 β [118].

I microRNA circolanti come biomarcatori del Diabete Mellito

Oltre alla capacità di regolare l'espressione genica all'interno della cellula che li produce, numerosi microRNA sono stati trovati nel sangue ed in altri fluidi biologici (urina, saliva, fluido amniotico, latte materno) in associazione a proteine, complessi lipoproteici, esosomi e microvescicole. La funzione dei microRNA circolanti non è stata ancora pienamente caratterizzata, ma studi *in vitro* indicano che i microRNA circolanti possono essere ceduti da "cellule donatrici" a "cellule riceventi" nella loro forma biologicamente attiva. Per il loro ruolo e la stabilità riscontrata in diverse condizioni sperimentali i microRNA presenti nei fluidi biologici possono essere sfruttati come biomarcatori prognostici e diagnostici. L'idea di utilizzare i microRNA circolanti come biomarcatori è abbastanza nuova ed è stata inizialmente proposta per lo studio di diversi tipi di cancro e malattie autoimmuni; solo di recente numerosi studi hanno proposto approcci fondati sui microRNA di siero, plasma e cellule del sangue per predire lo sviluppo e la progressione del Diabete Mellito [123, 124]. Zampetaki e coll. [125] sono stati i primi a correlare i livelli di espressione dei microRNA plasmatici allo sviluppo ed alla progressione del Diabete mellito di tipo 2. In questo studio è stato individuato un *pool* di microRNA plasmatici (miR-15a, miR-28-3p, miR-126, miR-223 e miR-320), i cui livelli di espressione forniscono una vera e propria "*firma molecolare*" capace di distinguere individui affetti e controlli sani, anche 5-10 anni prima dell'esordio clinico della patologia. In particolare, la sottoespressione dei livelli plasmatici del miR-126 (un microRNA particolarmente arricchito nelle cellule endoteliali e nei corpi apoptotici endoteliali) è risultata correlata allo sviluppo delle complicazioni del micro- e del macro-circolo del T2DM.

microRNA nello sviluppo e differenziamento del pancreas endocrino

Il pancreas deriva dall'evaginazione dorsale e ventrale (abbozzo pancreatico dorsale e ventrale) della regione anteriore dell'intestino medio dell'embrione; l'azione coordinata di specifici fattori di trascrizione e di microRNA indirizza il suo sviluppo e quello di altri tessuti come fegato, cistifellea e duodeno. Diversi studi hanno sottolineato il ruolo cruciale dei microRNA nello sviluppo del pancreas endocrino; Lynn e coll. [126] hanno osservato che il blocco nella maturazione dei microRNA a seguito della delezione condizionale del dominio RNase III di *Dicer1* (uno degli enzimi coinvolti nella maturazione dei microRNA) nel pancreas di embrioni murini e9.5 interferisce con il corretto sviluppo morfologico del pancreas e determina un'importante riduzione della componente cellulare endocrina. Nello stesso studio sono stati identificati e caratterizzati 107 microRNA espressi nel pancreas murino in via di sviluppo (e14.5); tra questi uno dei più studiati è sicuramente il miR-375 [114, 127].

Numerosi fattori di trascrizione, coinvolti nello sviluppo e nella funzione dell'isola pancreatica, si associano al promotore o ad elementi regolatori (es. *enhancer boxes*) del miR-375 che, a sua

volta, controlla geni del differenziamento come *Sox17*, *Sox9*, *Gata6*, *Hnf1 β* e *Pax6* (Fig. 23) [128].

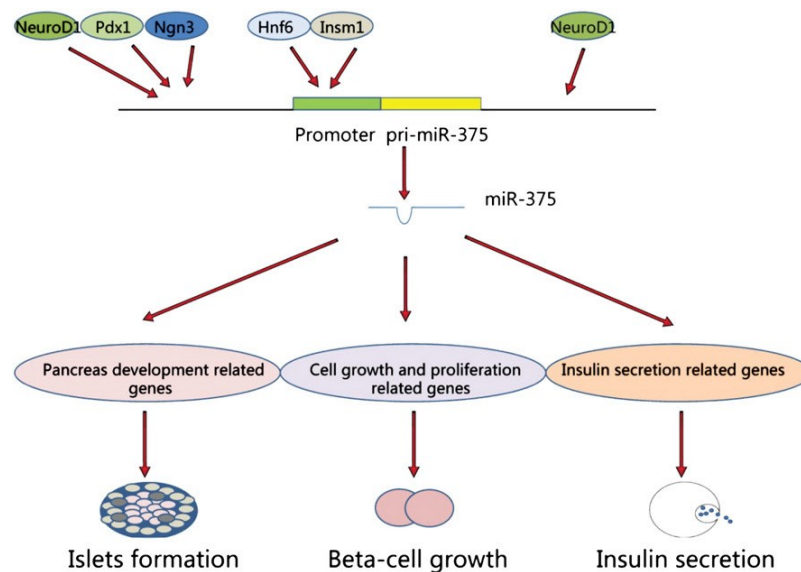


Figura 23. L'espressione del miR-375 nell' isola del Langerhans è regolata, almeno in parte, a livello trascrizionale. Numerosi fattori di trascrizione associati allo sviluppo e alla funzione dell'isola pancreatica regolano l'espressione del microRNA. Il miR-375 controlla geni appartenenti a tre diversi gruppi funzionali: (i) differenziamento e sviluppo, (ii) proliferazione e (iii) secrezione insulinica (Immagine tratta da [128]).

I fattori di trascrizione nel *commitment* della linea endocrina

Lo sviluppo del pancreas endocrino è un evento complesso, che implica l'espressione regolata nello spazio e nel tempo di almeno 26 fattori di trascrizione [129]. Nel topo, un modello estremamente semplificato del *lineage commitment* pancreatico vede nell'espressione iniziale del fattore *pancreatic duodenal homeobox-1* (*Pdx-1* nel topo, *IPF1* nell'uomo) il primo importante determinante nella transizione di cellule dell'epitelio indifferenziato dell'endoderma a FPC (*Facultative Pancreatic Progenitor Cells*) (al giorno embrionale e8.5); a partire da questo momento la linea endocrina si sviluppa a seguito dell'espressione (e8.5-e15.5) del fattore di trascrizione *Ngn3* (*neurogenin-3*). L'attivazione di *Ngn3* determina l'espressione di ulteriori fattori di trascrizione come *Arx*, *Pax4*, *NeuroD1*, *Nkx2.2* e *Nkx6.1* che consentono ai precursori delle cellule endocrine (EPCs, *Endocrine Progenitor Cells*) di differenziarsi in un tipo cellulare mono-ormonale. Le prime cellule ad attività endocrina sono i precursori delle cellule α (PACs, *Pro-Alpha Cells*), che tuttavia producono sia glucagone (e GLP-1) che insulina; sarà compito dei fattori *Arx* (*aristaless-related homeobox*) e *Pax4* (*paired homeobox-4*) dirigere il destino delle PAC verso il tipo α o β cellulare (Fig. 24)

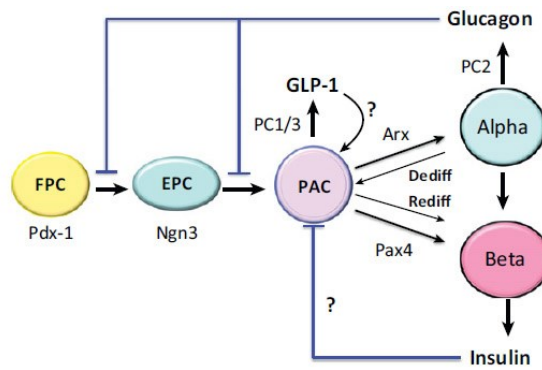


Figura 24. Schema del differenziamento delle cellule α e β pancreatiche (Immagine tratta da [130]).

L'espressione regolata nel tempo dei diversi fattori di trascrizione è un evento complesso che si realizza principalmente attraverso meccanismi “*chromatin-based*”, che comprendono: (i) l'azione di membri del gruppo delle proteine Polycomb (PcG, *Polycomb Group*); (ii) la metilazione del DNA; (iii) la formazione di eterocromatina. In particolare, il silenziamento di fattori di trascrizione linea-specifici PcG-mediato è associato alla trimetilazione della lisina 27 sull'istone H3 (H3K27me3). Cebpa e Pdx-1 sono tra i fattori di trascrizione più noti ad essere repressi in maniera PcG-mediata, rispettivamente in cellule β pancreatiche ed epatociti. L'espressione di Cebpa converte infatti le β cellule pancreatiche in epatociti [131] e viceversa, quella di Pdx-1 determina la conversione dell'epatocita a β cellula pancreatica [132] (Fig. 25).

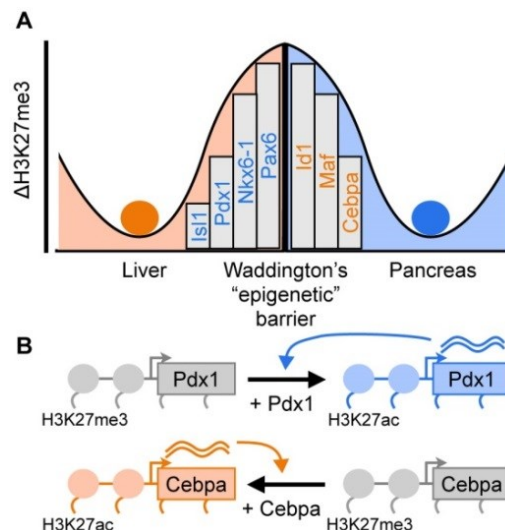


Figura 25. La repressione, mediata dalle proteine PcG, di specifici fattori trascrizionali è uno dei processi alla base delle “barriere epigenetiche” esistenti fra i tipi cellulari adulti. CEBPA (TF epato-specifico) è espresso a livello epatico e silenziato dalle proteine PcG nelle cellule β . PDX-1, al contrario, è tipicamente espresso nelle cellule β e represso dal silenziamento PcG negli epatociti: esso è, infatti, uno dei fattori cruciali nel mantenimento dello stato differenziato da parte delle cellule β (Immagine tratta da [133]).

Kutlu e coll. [28] hanno indagato mediante tecnologia *microarray* l'espressione genica di isole pancreatiche di ratto e cellule β e "non- β " (queste ultime arricchite per più del 70 % in α cellule), purificate mediante FACS. 960 geni sono risultati maggiormente espressi nelle β cellule rispetto alle α (*fold enrichment* ≥ 2 , FDR 2 %), 699 geni più espressi nelle cellule α rispetto alle β (*fold enrichment* ≥ 2 , FDR 2 %), 4293 condivisi tra i due tipi cellulari (*fold change* < 2 and FDR > 10 %). Il dato riguardante l'espressione dei fattori di trascrizione (i principali determinanti delle caratteristiche cellulari) rivela differenze qualitative (espressione specifica in uno dei due tipi cellulari) e quantitative (espressione a differenti livelli nei due tipi cellulari) tra le cellule β e le cellule α pancreatiche. Dei 346 e 312 fattori di trascrizione, espressi rispettivamente nelle cellule β ed α di ratto, i fattori di trascrizione con domini HLH (*Helix-loop-helix DNA-binding domain*), HD (*Homeobox Domain*), bZIP (*Basic Leucine Zipper*), NR, LIM rappresentano il 70 % dei fattori di espressione differenzialmente espressi nei due tipi cellulari. In particolare, *Atf3* ed i partner *Fos* e *Jun* sono arricchiti nelle cellule α ; *Atf6* e *Xbp1* sono invece arricchiti nelle cellule β . *Atf6* e *Xbp1* sono implicati nelle fasi iniziali della risposta delle proteine *unfolded* (UPR), che è più attiva proprio nelle cellule β [134].

Differenziamento e de-differenziamento

Le caratteristiche molecolari che determinano lo stato differenziato di un qualsiasi tipo cellulare devono essere stabilmente mantenute nel corso dell'intera esistenza della cellula, al fine di garantirne sopravvivenza e funzionalità. La condizione "terminalmente" differenziata non è immutabile e stabile per *default*, ma la cellula mantiene il fenotipo maturo e funzionale attraverso meccanismi epigenetici, espressione differenziale di specifici fattori di trascrizione, ed azione regolatoria di RNA non-codificanti [135] (Fig. 26)

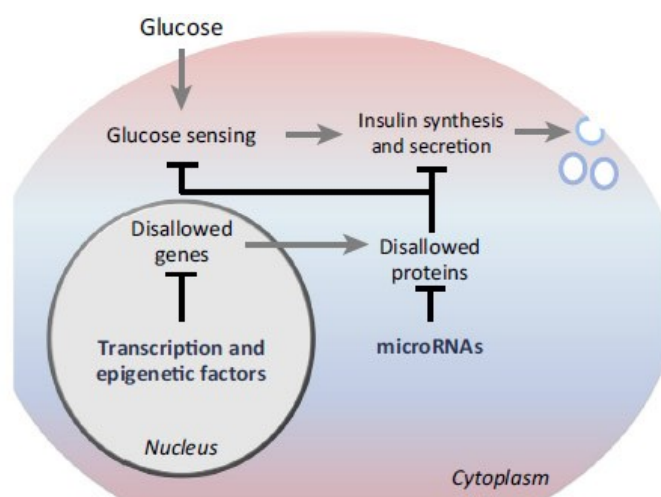


Figura 26. Meccanismi per il mantenimento dello stato differenziato delle β cellule pancreatiche (Immagine tratta da [135]).

Gli studi in ambito diabetologico rappresentano la testimonianza di quanto un fenotipo cellulare differenziato sia in realtà incredibilmente fragile; studi su modelli murini di Diabete Mellito [136] hanno evidenziato la perdita dello stato maturo e differenziato della β cellula pancreatica: questo evento influisce negativamente su sintesi e secrezione di insulina ed alcuni dati preliminari suggeriscono che questo processo possa verificarsi anche nell'uomo [137]. Con il termine di de-differenziamento β cellulare si descrivono eventi che determinano nella cellula un'alterazione del fenotipo differenziato e la "regressione" a precursori del pancreas endocrino multipotenti indifferenziati (Fig. 27). Nelle cellule β pancreatiche, segni caratteristici del de-differenziamento sono: (i) la sotto-espressione di fattori cruciali per la β cellula, tra questi Nkx6.1 (*NK6 homeobox 1*), Pdx-1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*), membri della famiglia MAFs (*v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*); (ii) una aberrante sintesi e secrezione dell'insulina.

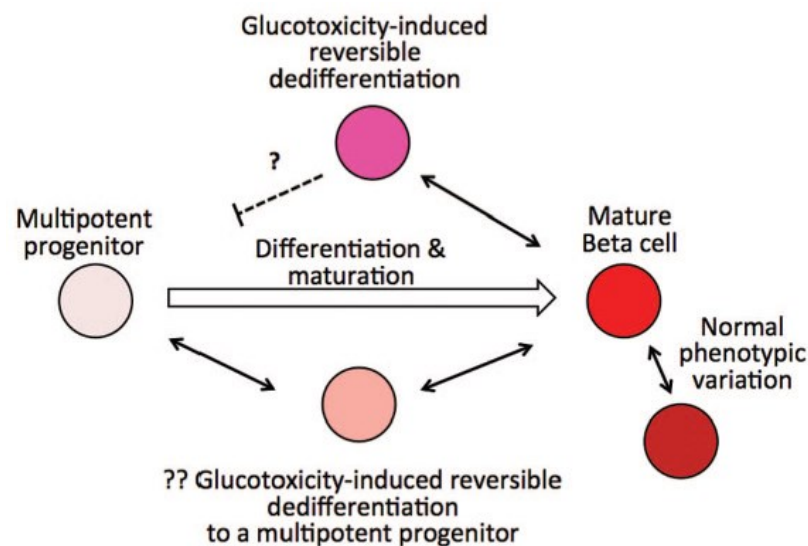


Figura 27. De-differenziamento nelle β cellule. I cambiamenti nello stato differenziato di una β cellula matura si verificano naturalmente in risposta ad eventi naturali e durante il processo di invecchiamento. L'iperglicemia caratteristica del diabete è uno dei principali fattori responsabili della perdita dello stato differenziato (Immagine tratta da [138]).

In base a quanto detto, insieme alle dimensioni della popolazione β cellulare i concetti di differenziamento e de-differenziamento risultano cruciali per descrivere e valutare la funzionalità della massa β cellulare, in quanto strettamente legati alla capacità di secrezione insulinica [138]. Il ruolo dei microRNA quali *master regulators* nel mantenimento delle β cellule nello stato fenotipico differenziato è emerso di recente e si pone come importante *topic* per lo studio dei fenomeni di riprogrammazione cellulare. Klein e coll. [36] hanno dimostrando che i microRNA 125b, 182 e 200c sono abbondantemente espressi in cellule β umane purificate

al FACS rispetto alla controparte α cellulare (β -miRNAs) ed hanno come bersaglio numerosi geni α specifici tra cui diversi fattori di trascrizione esclusivi delle cellule α (α TF); questi dati sottolineano l'importante azione regolatoria dei microRNA sui fattori di trascrizione (TFs) per il mantenimento dell'identità cellulare. La sovraespressione del β -miRNA miR-200c in cellule α della linea α TC6 attenua la trascrizione del glucagone e induce cambiamenti nello stato differenziato delle α cellule regolando negativamente *Zfp2* (*Zinc finger protein, multitype 2*, detto anche *Fog2*) e *c-Maf* (*avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (v-maf) oncogene homolog*), due fattori di trascrizione esclusivi delle cellule α (α TF, α -Transcription Factors). Al contrario, l'inibizione del miR-200c in cellule β della linea MIN6 aumenta la quantità di c-Maf (uno di quei geni definiti *disallowed* poichè normalmente la cellula β li mantiene repressi [139]).

Disallowed genes e ruolo dei microRNA

Numerosi studi hanno identificato diversi geni significativamente sottoespressi nelle cellule β pancreatiche, rispetto ad altri tessuti di riferimento; questi geni sono detti *disallowed* (letteralmente *rifiutati*), cioè geni dei quali la cellula “sopprime” l'espressione perché dannosi e deleteri per il normale funzionamento cellulare [140]. Dall'altro lato, ci sono geni assolutamente necessari per la cellula β pancreatica, quali quelli per i fattori di trascrizione Pdx-1, MafA, NeuroD1 ed i geni coinvolti nel *glucose sensing*, come il trasportatore del glucosio Glut2 (SLC2A), la glucochinasi GCK, le subunità KCNJ11 e ABCC8 dei canali potassio ATP-dipendenti di membrana (K_{ATP}). L'importanza di questi geni è sottolineata da mutazioni a loro carico responsabili delle forme monogeniche di Diabete (MODY). I primi prodotti genici *disallowed*, identificati per le cellule β sono stati MCT-1 (*monocarboxylate/lactate transporter*), codificato da *Slc16a1*, ed LDHA (*lactate dehydrogenase A*), codificato da *Ldha*; la loro sovraespressione in diversi modelli β cellulari è risultata fortemente ed inversamente correlata con la capacità di secernere insulina in risposta al glucosio [141]. A partire da questi studi sono stati identificati molti altri geni *disallowed*. Pullen e coll. [142] e Thorrez e coll. [143] mediante studi di *microarray* hanno rispettivamente generato una lista di 39 e 33 geni, la cui espressione risulta significativamente più bassa nelle isole pancreatiche rispetto ad altri tessuti di riferimento; 7 geni sono risultati comuni ai due studi (*Slc16a1*, *Ldha*, *Pdgfra*, *Igfbp4*, *Cxcl12*, *Oat*, *Cd302*); molti dei geni identificati come *disallowed* risultano sovraespressi in β cellule di soggetti T2DM rispetto ai controlli [144]. I gruppi funzionali cui i geni *disallowed* sono assimilabili risultano essere: (i) *oxidative stress enzymes*; (ii) *proliferation*; (ii) *stimulus-secretion coupling and exocytosis* [145] (Fig. 28).

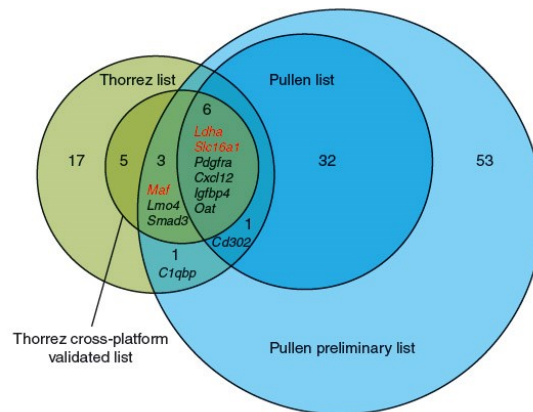


Figura 28. Diagramma di Venn dei geni *disallowed* nelle β cellule identificati da Pullen e Rutter (Immagine tratta da [145]).

Lo spegnimento selettivo dei geni *disallowed* può essere spiegato con l'intervento di meccanismi epigenetici, quali la modificazione covalente delle basi del DNA e degli istoni associati e l'azione di *non-coding* RNA (lncRNA, miRNA, siRNA). E' stato infatti dimostrato che due microRNA abbondanti nella cellula β pancreatica, miR-29a e miR-29b, regolano l'espressione del gene *disallowed* *Slc16a1* [146]; più in generale, da analisi bioinformatiche è emerso che i geni *disallowed* presentano numerosi siti di legame per microRNA dall'espressione cellulo-specifica [143].

Prospettive terapeutiche

Nonostante gli importanti progressi nella comprensione delle basi molecolari del T1DM non esistono ad oggi strategie terapeutiche mirate ed efficaci; infatti, il principale trattamento si avvale della somministrazione esogena di analoghi dell'insulina o dell'amilina (es. Pramlintide) e mira unicamente al controllo dell'omeostasi del glucosio negli individui affetti. Le strategie terapeutiche, che puntano ad espandere la popolazione β cellulare o a preservarne la funzione possono essere considerate estremamente promettenti per il trattamento del T1DM, ma rappresentano una vera e propria sfida sperimentale considerando il fatto che la cellula β pancreatica è un tipo cellulare "difficile", suscettibile all'apoptosi e scarsamente proliferante. Proliferazione cellulare, protezione dall'apoptosi, riprogrammazione e ripristino della secrezione insulinica sono le macro-aree su cui si sta orientando la ricerca dei nuovi *target* terapeutici nel T1DM. Recenti studi hanno dimostrato che diversi fattori circolanti, principalmente di origine epatica, hanno un profondo impatto sulla proliferazione β cellulare; tra questi la betatrofina si è rivelata capace di incrementare di 10-20 volte il tasso proliferativo della β cellula pancreatica [147]. Lo studio dei processi di *ageing* della β cellula ha portato all'identificazione del *network* PTEN-EZH2-p16 quale promettente *target* per interventi atti a favorire la proliferazione. *EZH2* (*enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*) è una proteina del gruppo "*Polycomb*", la cui espressione diminuisce durante l'*ageing* β cellulare.

Questo evento coincide con una riduzione della trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me3) al *locus INK4A-ARF* ed il conseguente aumento dei livelli degli inibitori del ciclo cellulare p16^{INK4A} e p19^{ARF} [148] (Fig. 29).

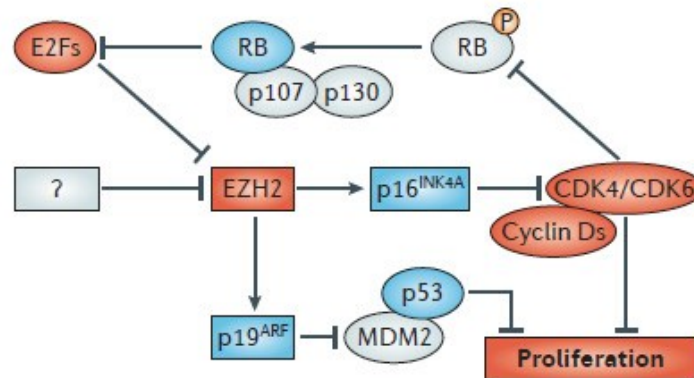


Figura 29. Regolazione della proliferazione β cellulare nell'ageing. In rosso sono indicati i componenti inibiti, in blu quelli attivati (Immagine tratta da [149]).

Altri approcci puntano invece a sfruttare l'effetto a favore della proliferazione, esercitato da piccole molecole come WS6, 5-IT e NECA e da microRNA come il miR-338-3p ed il miR-7a [149]. Altrettanto importanti sono gli interventi genetici o *small molecules-based* (Tab. 3) volti a proteggere le β cellule dall'apoptosi; tuttavia il complesso *cross-talk* molecolare e la sinergia osservata nel *signaling* citochino fanno propendere per lo sviluppo di terapie combinate capaci di modificare più *pathways* [149].

Strategies	Target	Agent (companies)	Current development phase
Proliferation	CCND1 (PMID:20668294)	N/A	Potential therapeutic target
	CDK6 (PMID: 20668294)	N/A	Potential therapeutic target
Proliferation, protection from apoptosis	GSK3 β (PMID: 12111750)	N/A	Potential therapeutic target
Protection from apoptosis	HDAC1	Nonselective inhibitors such as vorinostat (Merck)	Approved for other indications
	HDAC3	Nonselective inhibitors such as vorinostat (Merck)	Approved for other indications
	IL-1 β	IL-1 receptor antagonist anakinra (Amgen)	Approved for other indications
	JNK (PMID: 21984578)	Tool compounds	Potential therapeutic target
	NF- κ B (PMID: 16551748)	HDAC inhibitors may act through this pathway	Approved for other indications
Incretin effects, proliferation	GLP1	GLP1 Analogues (Amylin Pharmaceuticals, Novo Nordisk)	Approved
	GPR119	MBX-2982 (CymaBay Therapeutics)	Phase II

Tabella 3. Target terapeutici potenziali ed in via di sviluppo agenti sulla β cellula pancreatica (Adattata da [149]).

Gli approcci terapeutici *cell-based* hanno l'obiettivo di convertire cellule staminali, *iPSCs* (*Induced Pluripotent Stem Cells*), o tipi cellulari differenziati (α cellule pancreatiche, cellule duttali ed acinari) in cellule β produttrici di insulina funzionali [150, 151] (Fig. 30)

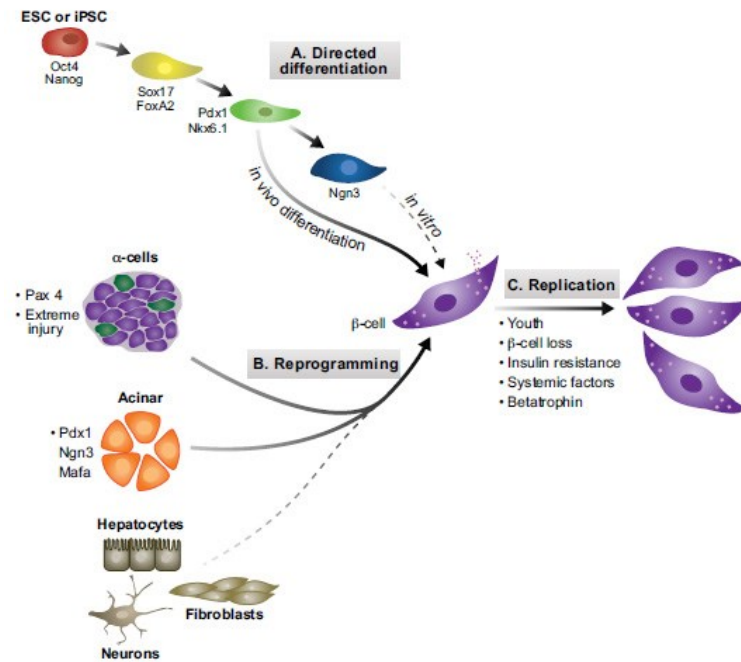


Figura 30. Approcci *cell-based* per la formazione di β cellule pancreatiche (Immagine tratta da [152]).

In conclusione, possiamo affermare che solo approcci innovativi, multidisciplinari e sistemici allo studio delle complesse *pathways* molecolari, che regolano la sopravvivenza, la proliferazione e la fisiologia della β cellula pancreatica, consentiranno efficaci interventi terapeutici. Le strategie descritte rappresentano tuttavia una sfida complessa perché caratterizzate: (a) dai possibili effetti collaterali (es. interventi sulla proliferazione β cellulare, che possono determinare lo sviluppo di iperplasia e patologie neoplastiche o interventi sulla secrezione insulinica, che possono sfociare in una ipoglicemia letale); (b) dai costi e dalle difficoltà di trasferire le conoscenze acquisite dai modelli di studio al paziente. I recenti progressi nel campo dell'ingegneria genetica (es. tecnologie TALENs e CRISPR/Cas9) forniranno potenti strumenti per vincere questa sfida. Dall'altro canto, rimangono questioni aperte su cui la ricerca biomedica deve intervenire per colpire il Diabete Mellito, problema sanitario di proporzioni ormai globali: (a) la scarsa disponibilità di linee cellulari umane da utilizzare come validi modelli per lo studio *in vitro* della malattia; (b) la mancanza di efficaci tecniche per un non invasivo *tracing in vivo* delle dimensioni della popolazione β cellulare alla diagnosi o durante le fasi avanzate della patologia; (c) la caratterizzazione del genoma dei pazienti affetti e la conseguente riclassificazione della patologia su base genetica; (d) la corsa a due velocità tra la scoperta di un numero sempre maggiore di geni candidati e la loro incompleta caratterizzazione funzionale nel sistema β cellulare.

MATERIALI E METODI

Linee cellulari nello studio del Diabete Mellito

L'uso di β cellule primarie nella ricerca biochimica e biomolecolare è limitato dalla scarsa abbondanza della porzione endocrina del pancreas e dalle difficoltà nell'isolamento, nella purificazione e nelle condizioni di coltura. La ricerca in quest'ambito è inoltre complicata dall'eterogeneità cellulare ed ormonale riscontrata tra i differenti individui "donatori". Per queste difficoltà sperimentali i principali sistemi modello sono stati fino ad ora linee cellulari immortalizzate di origine murina [3,153]. Le linee cellulari β TC (*beta-tumor cells*) [154] rappresentano un modello sperimentale β cellulare altamente differenziato, che manifesta capacità di produrre e secernere insulina in risposta alla stimolazione con glucosio; l'immortalizzazione della linea deriva dall'espressione dell'antigene T (*T antigen, Tag*) dell'oncoproteina virale SV40 sotto il controllo del promotore dell'insulina in topi e ratti transgenici; l'antigene T conferisce tumorigenicità e capacità di crescita continua in coltura. Le cellule β TC1 sono state coltivate in terreno DMEM (Sigma-Aldrich®, #D5796) addizionato di HI-HS (*Heat-Inactivated Horse Serum*) al 15%; 2,5% di FBS HI; 4 mM di L-Glutammina ed 1% di penicillina/streptomica (Pen/Strep) 10.000 U. La linea cellulare murina di glucagonoma α TC1-6 [155] è stata ottenuta dall'ATCC (*American Type Culture Collection*) e coltivata in DMEM (Sigma-Aldrich®, #D5546), addizionato di glucosio alla concentrazione finale di 3000 mg/L; 0,02 % di BSA (*Bovine Serum Albumine*); 4 mM di L-Glutammina; FBS HI al 10% (*Heat Inactivated Fetal Bovine Serum*); 15 mM di Hepes; 0,1 mM di NEAA (*Non-Essential Amino Acid*) ed 1% di Pen/Strep 10.000U. Entrambe le linee sono state fatte crescere in incubatore, a 37° C, in aria umidificata al 95% e CO₂ al 5%. Le cellule sono state *passate* una volta a settimana dopo tripsinizzazione ed il loro terreno è stato sostituito due volte a settimana. Il trattamento con le citochine proinfiammatorie (IL-1 β ricombinante murino, attività specifica 5 $\times$ 10⁸ U/mg, Preprotech, London, UK, UE; IFN γ ricombinante murino, attività specifica 1 $\times$ 10⁷ U/mg, Preprotech; TNF α ricombinante murino, attività specifica 1 $\times$ 10⁷ U/mg, Preprotech) è stato eseguito lasciando crescere le cellule per 24 ore nel loro usuale terreno di crescita e sostituendo al *time point* di interesse questo terreno con uno addizionato della miscela di citochine (IL-1 β 50 U/ml, IFN γ 1000 U/ml, TNF α 1000 U/ml). La linea INS-1 α β [156] è stata coltivata e trattata come descritto da Hansen e coll. [157]. Recentemente è stata descritta la possibilità di stabilire una co-coltura di cellule delle linee α TC1-6 e β TC1; la possibilità sperimentale di analizzare piuttosto che singole popolazioni cellulari sistemi più simili a quelli naturali potrebbe permettere di rivelare l'influenza delle interazioni paracrine e dei contatti diretti sulla fisiologia dei due principali tipi cellulari dell'isola del Langerhans in condizioni basali e patologiche; es. risposta alle citochine [158].

Estrazione dell'RNA totale e *Real-Time* PCR

L'RNA totale è stato estratto mediante il kit commerciale TriZol (Lifetechnologies TM, Foster-City CA, USA) e quantificato con il fluorimetro Qubit TM (Lifetechnologies TM), seguendo i relativi protocolli. L'analisi HT dell'espressione dei microRNA è stata condotta sfruttando il sistema *TaqMan Low Density Array* (TLDA) (Lifetechnologies TM): questa tecnologia permette di ottenere in un unico esperimento di *Real-Time* PCR il profilo di espressione di un numero notevole di microRNA (per questi esperimenti, è stato determinato il profilo di espressione di 519 microRNA di topo e 68 microRNA di ratto). L'intero *pool* dei microRNA presenti nell'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA attraverso *MegaplexTM RT Rodent Primer Pool sets* (Lifetechnologies TM) e preamplificato attraverso *MegaplexTM PreAmp Rodent Primer Pool sets* (Lifetechnologies TM). I saggi singoli in tecnologia TaqMan sui microRNA di interesse (STAs, *Single TaqMan miRNA Assays*) sono stati realizzati attraverso *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Lifetechnologies TM) e *TaqMan Universal Master Mix* (Lifetechnologies TM). Lo studio dell'espressione degli RNA messaggeri è stata condotta dopo retrotrascrizione dell'RNA totale in cDNA mediante *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Lifetechnologies TM); la reazione di *Real-Time* PCR è stata condotta mediante *Fast SYBR Green Master Mix* (Lifetechnologies TM), utilizzando coppie di *primers* specifiche per i geni di interesse. Eventuali contaminazioni di DNA nell'RNA estratto sono state eliminate mediante trattamento con *DNase I Amplification Grade* (Lifetechnologies TM). Tutte le reazioni di *Real-Time* PCR sono state condotte su *ABI PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR system* (Lifetechnologies TM).

Analisi dell'espressione dei microRNA

I dati di *profiling* del trascrittoma microRNA sono stati analizzati mediante il *software Real-Time Statminer* [®] (Integromics [®], Granada, Spain). Il miglior controllo endogeno per la normalizzazione dei dati è stato ricercato utilizzando il *software geNorm* (integrato in *Real-Time Statminer* [®]) e *DataAssist* TM (Lifetechnologies TM). Il miR-26a è stato utilizzato come normalizzatore. Il Limma test (vedi sezione analisi statistiche), integrato nel *software Real-Time Statminer* [®] (Integromics [®]), ha permesso di individuare i geni significativamente differenzialmente espressi (DE). Le variazioni nell'espressione dei microRNA tra (i) α TC1-6 e β TC1 a *steady state* e tra (ii) α TC1-6 controllo e trattate con citochine sono state determinate attraverso quantificazione relativa (RQ) usando il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [159]. I valori sono riportati come *fold change* medio di tre repliche biologiche indipendenti; i valori di RQ compresi tra 0 ed 1 sono stati convertiti in *fold change* negativi utilizzando la formula $-1/RQ$. I microRNA risultati significativamente DE sono stati classificati in base ai valori di *p-value* ed *adjusted p-value* (Benjamini-Hochberg correction, 5% False Discovery Rate, FDR). I dati ottenuti sono pubblici su *Gene Expression Omnibus* (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), GSE42970.

Analisi dell'espressione dei geni *core* dell'apoptosi

Lo studio dell'espressione dei geni *core* del macchinario apoptotico è stata condotta sfruttando un sistema TLDA *custom* designato per analizzare 92 geni coinvolti nell'apoptosi (geni MA) e 4 geni candidati quali *house-keeping* (*Actb*, *Hprt*, *Tuba1a* e *18S* RNA) (Tabella Supplementare 1). In particolare i 92 geni MA sono stati selezionati sulla base di: (i) parametri di centralità all'interno del *network* del macchinario apoptotico [160]; (ii) nota implicazione funzionale nei meccanismi apoptotici delle cellule β pancreatiche sottoposte all'azione di diversi *input* stressogeni (eg, elevate concentrazioni di citochine o di plamitato). *Actb* ed *Hprt* sono stati selezionati come geni *housekeeping* dopo analisi con il *software* *geNorm* [161]. Anche in questo caso le variazioni nell'espressione degli RNA messaggeri candidati sono state determinate attraverso quantificazione relativa usando il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [159]. I valori sono riportati come *fold change* medio di tre repliche biologiche indipendenti; i valori di RQ compresi tra 0 ed 1 sono stati convertiti in *fold change* negativi utilizzando la formula $-1/RQ$. Il Limma test (vedi sezione analisi statistiche) integrato nel *software* *Real-Time Statminer*® (Integromics®) ha permesso di individuare i geni significativamente differenzialmente espressi (DE).

Esperimenti di trasfezione

Trasfezione transiente delle cellule α TC1-6 con mimic dei microRNA 296-3p e 298-5p

Nell'ambito degli esperimenti funzionali di trasfezione le cellule α TC1-6 sono state seminate alla densità di 4×10^4 cellule in piastre da 24 pozzetti (SPL Life Sciences, Pocheon, South Korea) per l'estrazione dell'RNA e alla densità di 1.15×10^6 cellule in piastre da 100 mm di diametro (SPL Life Sciences) per l'estrazione delle proteine. Gli esperimenti di trasfezione sono stati condotti utilizzando l'agente trasfettante *siPORT*™ *NeoFX*™ (Lifetechnologies™) con 30 nM di ogni molecola *mimic* (Pre-miR-296-3p o Pre-miR-298-5p) e 30 nM della molecola *scrambled* di controllo (Pre-miR™ miRNA Precursor Molecules-Negative Control #1, Lifetechnologies™). Per ogni esperimento, l'efficienza di trasfezione è stata saggiata mediante *Real-Time* PCR ed è risultata superiore al 90%.

Trasfezione transiente delle cellule β TC1 con siRNA

Le cellule β TC1 sono state trasfettate con una miscela di due differenti siRNA contro l'mRNA di *Cebpa* (FlexiTube siRNAs #1 e #2, Qiagen, Venlo, Netherlands), tre differenti siRNA contro l'mRNA di *Arl6ip5* (FlexiTube siRNAs #2, #5 e #6, Qiagen), tre differenti siRNA contro l'mRNA di *Tnfrsf10b* (FlexiTube siRNAs #2, #3 e #4, Qiagen), o con molecola *scrambled* di controllo (AllStars Negative Control siRNA, Qiagen) alla concentrazione di 100nM (si*Cebpa* e si*Tnfrsf10b*) o 50nM (si*Arl6ip5*) mediante *HiPerfect Transfection Reagent* (Qiagen) seguendo il protocollo. Sono state seminate 1.2×10^5 cellule per pozzetto in piastre da 12 pozzetti (SPL Life Sciences). A seguito della trasfezione è stata effettuata l'estrazione dell'RNA ed il saggio

dell'Annessina V/PI per valutare: (i) espressione dei *target* trascrizionali di CEBPA ed (ii) i livelli di apoptosi delle cellule.

Analisi western

I lisati proteici sono stati ottenuti e quantificati come descritto [162]. 50 µg di lisato proteico sono stati caricati su 10% SDS polyacrylamide gel (Hoefer miniVE, GE Healthcare ©, Amersham Place, Buckinghamshire, UK) e trasferiti su membrana di nitrocellulosa con sistema *iBlot Dry Blotting System* (Lifetechnologies™). Le membrane sono state incubate con i seguenti anticorpi primari: IGF1Rβ (Santa Cruz Biotechnology®, Inc., Dallas, TX, USA); p-IRS-1 (Santa Cruz Biotechnology®, Inc.); IRS-1 (EMD Millipore Corporation ©, Billerica, MA, USA); p-p44/p42 MAPK (Cell Signalling Technology®, Inc., Danvers, MA, USA); TNFα (Cell Signalling Technology®, Inc.); CEBPA (Abcam®, Cambridge, UK); TNFRSF10B (Santa Cruz Biotechnology®, Inc.); ARL6IP5 (Abcam®). β-actina (Sigma-Aldrich®) è stato utilizzato in tutti gli esperimenti come controllo di caricamento. Le proteine sono state rilevate mediante *ECL™ Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare ©); l'analisi densitometrica è stata eseguita con il Software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Valutazione dell'apoptosi

La percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche è stata valutata mediante citofluorimetria a flusso con il metodo dell'annessina V/PI (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA). L'analisi è stata effettuata mediante il citofluorimetro *Beckman Coulter Epics XL-MCL* (Beckman Coulter ©, Inc., Hialeah, FL, USA), esaminando il campione di cellule da analizzare secondo il protocollo specificato dal produttore. Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il *software EXPO 32 ADC™* (Beckman Coulter ©, Inc). L'annessina V appartiene alla superfamiglia di proteine denominate annesine, così chiamate per la proprietà di legarsi a specifici fosfolipidi della membrana cellulare in maniera Ca^{2+} -dipendente. In particolare, l'annessina V ha elevata affinità per la fosfatidilserina (PS), un fosfolipide esposto dalle cellule nelle fasi iniziali dell'apoptosi; per questa sua peculiarità l'annessina V coniugata ad un fluorocromo (es. FITC) è ampiamente utilizzata nelle metodiche sperimentali di valutazione della morte cellulare mediante citofluorimetria a flusso. Tuttavia, soltanto accoppiando alla marcatura della PS con annessina V la colorazione degli acidi nucleici con PI (3,8-diammino-5dietilmetilamminopropil-6fenilfenantridin diioduro) ad alte concentrazioni (colorazione sopravvitalità) è possibile distinguere in citofluorimetria cellule vitali, apoptotiche (precoci e tardive) e necrotiche. La citofluorimetria a flusso è una tecnica che consente di misurare ed analizzare caratteristiche fisiche (grandezza e granulosità relative, complessità interna) e qualitative (es. marcatori superficiali come la PS) a livello di singola cellula. Un sistema di flusso separa le cellule in soluzione convogliandole separatamente fino al punto di misura, dove incontrano un fascio di luce focalizzata proveniente dal laser (sistema ottico). L'incontro tra il fascio di luce e la singola

cellula genera segnali diversi a seconda delle caratteristiche fisiche della cellula e alla presenza di molecole fluorescenti con la quale sono stati marcate particolari molecole. I segnali luminosi prodotti sono infine convertiti in segnali elettrici e digitalizzati (Fig. 31).

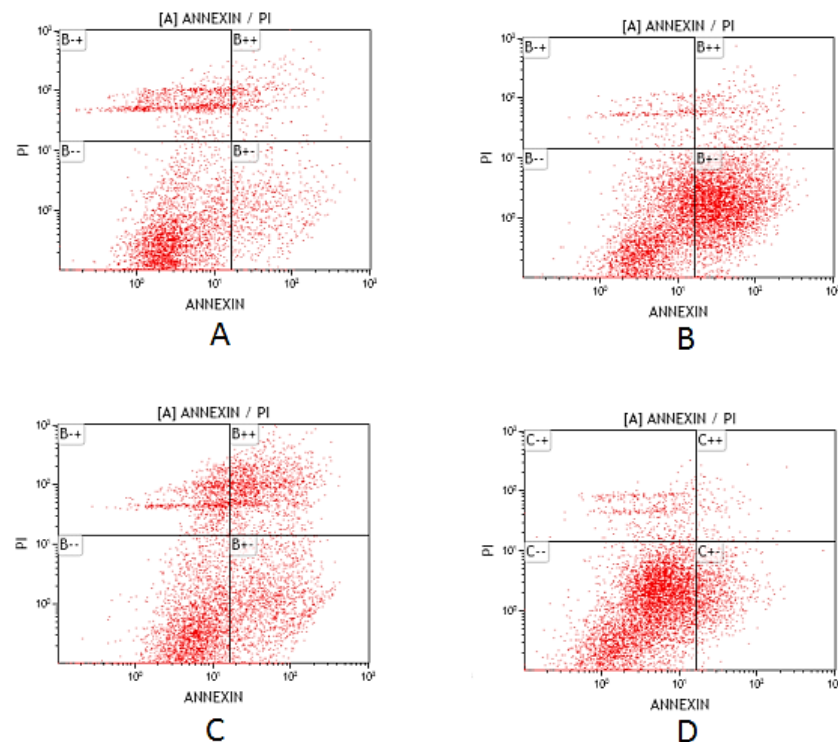


Figura 31. Dot plot del saggio dell'annexina V-FITC/PI per cellule β TC1 a diverse condizioni di trattamento. (A) Cellule β TC1 Ctrl 24H. (B) Cellule β TC1 Cyt 24H. (C) Cellule β TC1 CN Cyt 24H. (D) Cellule β TC1 siCebpa Cyt 24H. Nel dot plot, ogni punto rappresenta uno o più eventi rispetto a due parametri presi in considerazione, in questo caso la fluorescenza emessa dall'annexina V-FITC (asse x) e la fluorescenza emessa dallo ioduro di propidio (asse y). Il grafico è suddiviso in quattro quadranti sulla base della fluorescenza emessa: in basso a sx si trovano le cellule vitali (A-/PI-); in basso a dx le cellule in apoptosi iniziale (A+/PI-); in alto a dx le cellule in apoptosi avanzata (A+/PI+) ed in alto a sx le cellule necrotiche (A-/PI+).

Identificazione *in silico* dei targets dei microRNA

I targets validati dei microRNA sono stati ottenuti dalla letteratura e dal database online MirTarbase v2.5 (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) [163]; i targets predetti sono stati ottenuti interrogando il tool di predizione starBase v2.1 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) [164]. Tra i targets predetti e validati abbiamo selezionato solo quelli espressi a livello delle isole pancreatiche (<http://www.tltdbase.org/page/AtlasHome>) e coinvolti nel processo di morte cellulare.

Predizione dei fattori di trascrizione per i microRNA 296-3p e 298-5p

Il *tool* MatInspector di Genomatix (<https://www.genomatix.de/>) è stato utilizzato per identificare i TFBS (*Transcription Factor Binding Sites*) ed i corrispondenti fattori di trascrizione (TF) [165] all'interno della regione promotore predetta dei microRNA 296-3p e 298-5p. Attraverso il *tool online Multi Experiment Matrix* (MEM) [166] (raggiungibile all'indirizzo web <http://biit.cs.ut.ee/mem/>) abbiamo valutato a partire dalla collezione *Affimetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 [Mouse_430_2] platform* (1546 dataset) la co-espressione tra TF predetti regolare i microRNA DE e relativi mRNA target.

Identificazione delle isole CpG

Le isole CpG a monte dei geni codificanti *Nespas*, miR-296-3p e miR-298-5p sono state identificate mediante UCSC browser (<http://genome.ucsc.edu/>).

Analisi dei *networks*

Network dei targets validati dei microRNA 296-3p e 298-5p

Il *network* di interazione dei microRNA 296-3p e 298-5p, dei loro fattori di trascrizione predetti, dei *targets* validati e loro primi interattori è stata generata ottenendo i dati di interazione dal *plugin* MiMI [167] di Cytoscape v.2.8.1 [168]. L'analisi delle *Gene Ontologies* (GO) e delle *pathways* sovra-rappresentate nel *network* di interazione è stata condotta attraverso il *plugin* BiNGO di Cytoscape v.2.8.1 [169] ed il *tool online* DAVID [170].

Network dei targets trascrizionali di CEBPA

I *targets* trascrizionali del fattore di trascrizione CEBPA sono stati ottenuti interrogando il *database online AnimalTFDB* [171] e la letteratura scientifica. Attraverso il *tool* LASAGNA [172] abbiamo individuato i siti di legame per CEBPA in una regione di 5 kb a monte del TSS (*Transcription Start Site*) dei *targets* trascrizionali identificati. Il *tool rVista 2.0* (<http://rvista.dcode.org/>) integrato in *ECR Browser* [173] è stato utilizzato per cercare TFBS conservati all'interno delle ECR dei promotori predetti; abbiamo considerato come presunta regione promotore quella che si estende da 5 kb a monte a 111 bp a valle del TSS di ogni gene. I parametri usati per definire una ECR sono stati: (i) lunghezza minima di 100 bp e (ii) 70% di identità di sequenza. Il *database TELiS* [174] è stato interrogato per confrontare il numero medio di TFBS tra due liste di geni, utilizzando i seguenti parametri: (i) *promoter window*: 1200 bp; (ii) *stringency*: 90 (*High*). Il *network* è stato costruito a partire dai dati di interazione depositati in Biogrid v. 3.2.107 attraverso il software Cytoscape v.3.0.1 [168]. Le interazioni all'interno delle *pathways* MAPK ed NF-κB sono state ottenute da InnateDB [175]. L'analisi di centralità del *network* è stata effettuata attraverso il *plug-in* di Cytoscape *CytoHUBBA* [176]. L'analisi delle *Gene Ontologies* e delle *pathways* sovra-rappresentate nel *network* di interazione è stata condotta mediante il *tool* DAVID [170].

Analisi statistiche

Il calcolo del valore di p (*p-value*) per l'analisi statistica dei risultati è stato ottenuto mediante diversi metodi: 1) *Limma test* e correzione multipla con metodo Benjamini-Hockeberg [177, 178] per identificare i geni differenzialmente espressi negli esperimenti HT di *Real-Time* PCR; 2) *Student's t-test* e correzione dei dati con metodo Bonferroni; 3) *Tukey HSD post-hoc one-way ANOVA test*; 4) *Pearson's correlation test*; 5) χ^2 test e 6) *Fisher's exact test*. *P-values* corretti < 0.05 sono stati considerati significativi. I test statistici utilizzati ed i relativi metodi di correzione sono descritti all'interno del testo e nelle legende alle figure della sezione risultati.

Nomenclatura di geni e proteine

Le regole di nomenclatura di geni e proteine seguono le indicazioni internazionali del *Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* [179] (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>).

RISULTATI

Induzione dell'apoptosi nelle cellule α TC1-6 e β TC1

Per verificare la differente risposta alle citochine delle cellule α e β pancreatiche abbiamo indagato mediante il saggio dell'Annexina V/PI la percentuale di cellule della linea α TC1-6 che vanno in contro ad apoptosi dopo trattamento con una combinazione di tre diverse citochine (IL-1 β , IFN γ e TNF α) per 6, 24 e 48 ore. Nelle α TC1-6 il numero di cellule apoptotiche non varia significativamente rispetto ai controlli non trattati nell'intero *time course* (Fig. 32); questi risultati dimostrano che le cellule α pancreatiche resistono all'apoptosi indotta dalle citochine nelle condizioni sperimentali utilizzate. Al contrario, le cellule β TC1 sono risultate decisamente più suscettibili all'azione citotossica delle citochine (vedi Fig. 43).

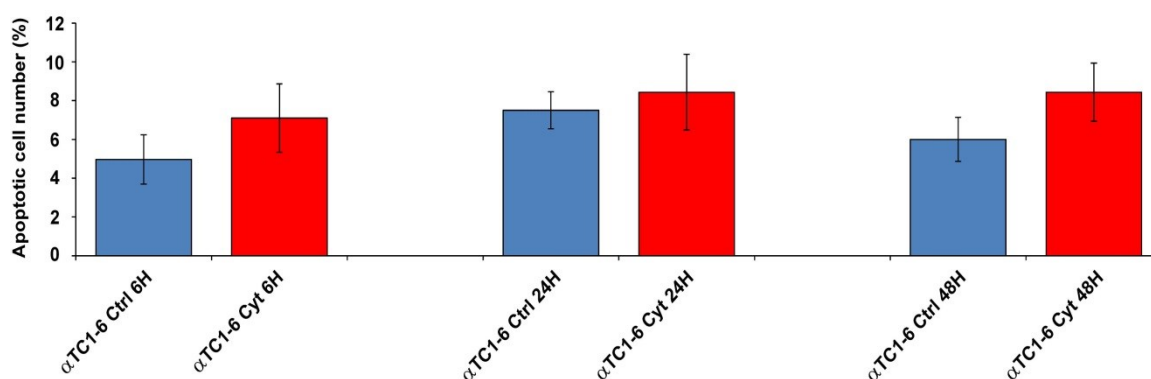


Figura 32. Apoptosi in cellule della linea α TC1-6 non trattate (*Ctrl*) e trattate con citochine (*Cyt*) per 6, 24 e 48 ore. I dati sono stati ottenuti mediante saggio dell'Annexina V/PI al citofluorimetro a flusso e presentati come media $\pm$ D.S. (deviazione standard) di tre esperimenti indipendenti ($n = 3$).

Profilo d'espressione dei microRNA nelle cellule α TC1-6 e β TC1 a *steady state*

Al fine di identificare i microRNA coinvolti nella resistenza delle cellule α TC1-6 all'apoptosi citochino-mediata abbiamo analizzato il trascrittoma microRNA in condizioni basali di non trattamento con citochine (*steady state*) delle α TC1-6 e delle β TC1; lo scopo di questo *profiling* è stato quello di ricercare microRNA cellulo-specifici, potenzialmente responsabili della differente risposta dei due tipi cellulari allo stress operato dalle citochine. A *steady state*, 23 microRNA sono risultati esclusivamente espressi nelle cellule α TC1-6 (α -miRNAs) e 26 espressi nelle sole β TC1 (β -miRNAs) (Tab. 4). 50 microRNA sono risultati significativamente più

espressi nelle α TC1-6 rispetto alle β TC1, mentre 74 significativamente più espressi nelle β TC1 rispetto alle α TC1-6 (*Limma test, Benjamini-Hochberg adjusted p-values* < 0.05) [1].

α -miRNAs	β -miRNAs
miR-127*, miR-296-3p, miR-297b-5p, miR-298, miR-299*, miR-329, miR-335-3p, miR-335-5p, miR-370, miR-376a*, miR-409-5p, miR-431, miR-434-5p, mmir-466a-3p, miR-466b-3-3p, miR-467a, miR-467c, miR-467d, miR-540-5p, miR-543, miR-669a, miR-673-3p, rno-miR-136*.	miR-10a, miR-10b, mir-18a, miR-18a*, miR-193, miR-19a, miR-20a, miR-216a, miR-216b, miR-217, miR-218-2*, miR-221, miR-224, miR-302b, mir-30c-1*, miR-322*, miR-463*, miR-483*, miR-499, miR-503*, miR-542-3p, miR-542-5p, miR-743a, miR-743b-3p, miR-883a-3p, miR-883a-5p.

Tabella 4. microRNA esclusivamente espressi nelle cellule α TC1-6 (α -miRNAs) e β TC1 (β -miRNAs) a *steady state* (in condizioni di non trattamento con citochine).

Profilo d'espressione dei microRNA nelle cellule α TC1-6 dopo trattamento con citochine

L'analisi HT (*High Throughput*) del profilo di espressione dei microRNA in cellule α TC1-6, trattate con citochine per 24 e 48 ore ha rivelato che dopo 48 ore di trattamento 3 microRNA (miR-146a, miR-203 e miR-298-5p) sono risultati differenzialmente espressi (DE) in modo significativo nelle α TC1-6 rispetto ai controlli non trattati (*Limma test, Benjamini-Hochberg adjusted p-values* < 0.05). In particolare, il miR-146a ed il miR-203 sono risultati sovraespressi rispettivamente di 14.9 e 6 volte mentre il miR-298-5p è risultato sottoespresso di 7.5 volte (Tabella Supplentare 2). Le condizioni di trattamento adottate non hanno permesso di ottenere per le β TC1 trattate con citochine una quantità tale di RNA per l'analisi HT del trascrittoma microRNA.

Espressione dei microRNA 296-3p e 298-5p in α TC1-6 trattate con citochine

Al fine di identificare i microRNA responsabili della differente risposta delle cellule α TC1-6 e β TC1 al trattamento con citochine abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul cluster miR-296-miR-298 per le seguenti ragioni: (i) negli organismi *Mus musculus* ed *Homo sapiens* entrambi i microRNA fanno parte del *cluster imprinted Gnas/GNAS*; (ii) a *steady state* entrambi i microRNA risultano specificatamente espressi nelle α TC1-6 e non trascritti nelle β TC1 (Fig. 33); (iii) nonostante le regioni *seed* siano diverse (Fig. 34) i due microRNA condividono molti

più *targets* di quelli attesi (44 vs 33, rispettivamente; $p\text{-value} = 0.0485$, $\chi^2\text{-test}$): ciò suggerisce regolazione di *pathways* e processi biologici comuni.

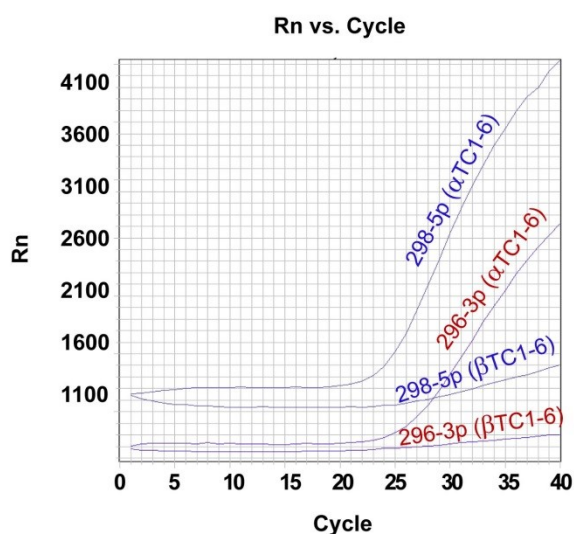


Figura 33. Real-Time PCR Amplification plot del miR-296-3p e del miR-298-5p in cellule α TC1 e β TC1 a *steady state*. Entrambi i microRNA non sono espressi in cellule della linea β TC1. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti ($n=3$).

mmu-miR-296-3p: GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCC (MIMAT0004576)
mmu-miR-298-5p: GGCAGAGGAGGGCUGUUCUCCCC (MIMAT0000376)

Figura 34. Sequenza della forma matura del miR-296-3p e del miR-298-5p. La porzione di sequenza sottolineata corrisponde alla regione *seed* del microRNA.

Single TaqMan gene expression assays (STAs) dei microRNA 296-3p e 298-5p in cellule α TC1-6 dopo 6, 12, 24 e 48 ore di trattamento con citochine hanno confermato la significativa sottoespressione del miR-298-5p (emersa già dai dati di *profiling* HT), ed evidenziato una significativa sottoespressione del miR-296-3p nelle cellule α TC1-6 dopo 24 e 48 ore di trattamento rispetto ai controlli non trattati (*Student's t-test*, *Bonferroni adjusted p-value* < 0.01). Il miR-298-5p è risultato significativamente sottoespresso già dopo 12 ore di trattamento con citochine (*Student's t-test*, *Bonferroni adjusted p-value* < 0.05), raggiungendo una sottoespressione altamente significativa dopo 48 ore di trattamento rispetto ai controlli non trattati (*Student's t-test*, *Bonferroni adjusted p-value* < 0.01) (Fig. 35). Entrambi i microRNA sono risultati co-espressi nelle cellule α TC1-6 durante l'intero *time course* ($r\text{-value} = 0.88$, $p\text{-value} = 1.15e-08$, *Pearson's correlation test*) (Fig. 36). I saggi singoli in *Real-Time PCR* hanno inoltre confermato che i due microRNA non sono espressi nelle linee β cellulari β TC1 ed INS-1E.

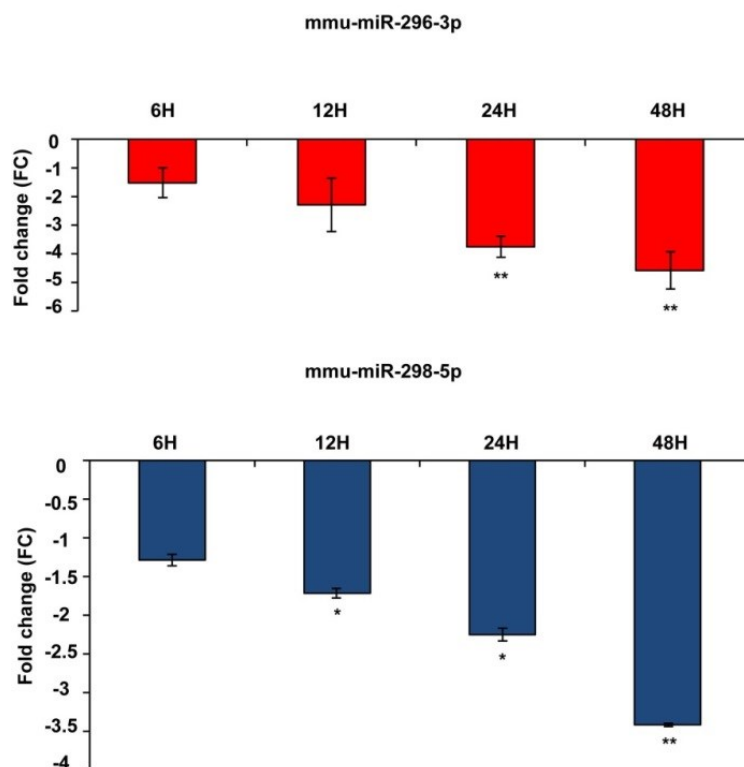


Figura 35. Profilo d'espressione del miR-296-3p e del miR-298-5p in cellule α TC1-6 dopo 6, 12, 24 e 48 ore di trattamento con citochine. I dati sono presentati come *fold change* medio $\pm$ D.S. di tre esperimenti indipendenti ($n = 3$). Il miR-26a è stato utilizzato come controllo endogeno. * p -value < 0.05 ; ** p -value < 0.01 (Student's t -test, Bonferroni correction).

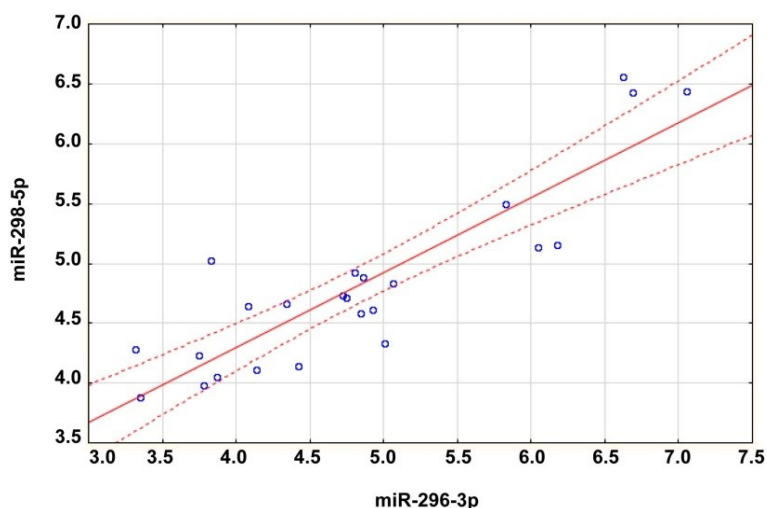


Figura 36. Scatter plot che mostra la correlazione di espressione tra il miR-296-3p (asse x) ed il miR-298-5p (asse y) nella cellule α TC1-6 dopo trattamento con citochine per l'intero *time course*. Per ogni *time point* sono stati correlati i DCt di entrambi microRNA in condizioni di non trattamento e trattamento (r -value = 0.88, p -value = $1.15e-08$, Pearson's correlation test). Tre indipendenti repliche biologiche ($n = 3$) sono state analizzate per ogni *time point*.

Le cellule α TC1-6, trasfettate con *mimics* dei microRNA 296-3p e -298-5p e trattate con citochine, aumentano il tasso di apoptosi rispetto alle corrispondenti cellule controllo

Per caratterizzare il ruolo biologico del miR-296-3p e del miR-298-5p nel sistema in esame abbiamo valutato i livelli di apoptosi di cellule α TC1-6, trasfettate con *miRNA-mimics* (Pre-miRs) dei microRNA 296-3p e 298-5p e trattate con citochine per 6, 24 e 48 ore; i dati ottenuti sono stati quantificati rispetto a quelli di cellule α TC1-6, trasfettate con una molecola *scrambled* (denominata Controllo Negativo) e trattate con citochine per i medesimi tre *time points*. La trasfezione con il *mimic* del miR-296-3p non induce cambiamenti nei livelli di apoptosi nell'intero *time course*; al contrario, la trasfezione con il *mimic* del miR-298-5p e la cotrasfezione di entrambi i *miRNA-mimics* determina un aumento statisticamente significativo dell'apoptosi (1.5 e 2.5 volte) a 24 ore di trattamento con citochine (*Tukey HSD post-hoc one-way ANOVA test*, $p\text{-value} < 0.01$) (Fig. 37).

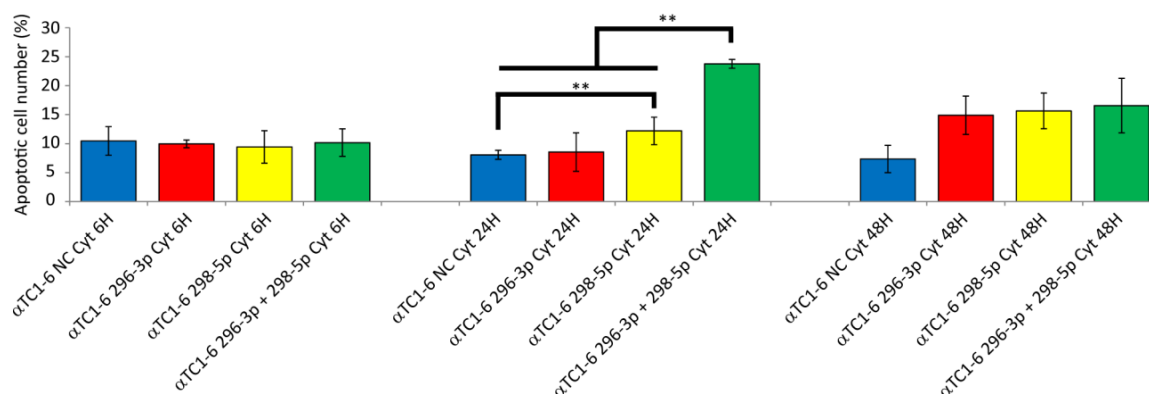


Figura 37. La sovraespressione del miR-296-3p e del miR-298-5p riduce la resistenza delle cellule α TC1-6 all'apoptosi indotta dalle citochine. L'asse y rappresenta la percentuale di cellule apoptotiche; l'asse x rappresenta le quattro condizioni sperimentali [(i) cellule trasfettate con molecola *scrambled* (NC, Negative Control); (ii) cellule trasfettate con molecola *mimic* del miR-296-3p; (iii) cellule trasfettate con molecola *mimic* del miR-298-5p; (iv) cellule trasfettate (cotrasfezione) con entrambe le molecole] ai tre *time point* di trattamento con citochine (6, 24 e 48 ore). I dati sono stati ottenuti al citofluorimetro a flusso con il saggio Annexina V/PI e presentati come media $\pm$ D.S. di tre esperimenti indipendenti ($n = 3$). ** $p\text{-value} < 0.01$ (*Tukey HSD post-hoc one-way ANOVA test*).

L'espressione di *Igf1r* e *Tnfa* è modulata dai microRNA 296-3p e 298-5p

La ricerca computazionale dei *targets* predetti e validati dei due microRNA ha portato all'identificazione di 1 *target* validato e 207 *targets* predetti per il miR-296-3p e di 5 *targets* validati e 707 *targets* predetti per il miR-298-5p. In virtù del loro coinvolgimento in importanti processi biologici quali apoptosi, ciclo cellulare, differenziamento e secrezione ormonale abbiamo focalizzato la nostra attenzione su un totale di 14 *targets* di cui 7 del miR-296-3p: *Bcl2*, *Ccna2*, *Gnas*, *Irs2*, *JunB*, *Nr4a2*, *Zbtb20*; 5 del miR-298-5p: *Bap1*, *Mapk4*, *Tnf*, *Vdr*, *Zbtb20*; 2 comuni ad entrambi i microRNA: *Igf1r* e *Pea15* (Tabella Supplementare 3). In particolare, *Bcl2*, *Ccna2*, *Irs2* ed *Nr4a2* sono *targets* indiretti del microRNA perché controllati dal fattore di trascrizione CREB1, un *target* validato del miR-296-3p [180]; *Tnf* e *Vdr* sono *targets* validati del miR-298-5p [181, 182]. Tutti gli altri bersagli sono stati individuati mediante analisi computazionale. Gli esperimenti di *Real-Time* PCR hanno evidenziato variazioni del profilo di espressione di diversi *targets*, tra cui *Igf1r*, *Tnf* e *Vdr* in cellule α TC1-6 trasfettate con *mimic* del miR-296-3p e *mimic* del miR-298-5p, rispetto a controlli trasfettati con molecola *scrambled* (Fig. 38). L'efficienza di trasfezione a 24 ore dall'esperimento è risultata in tutti i casi superiore al 90%.

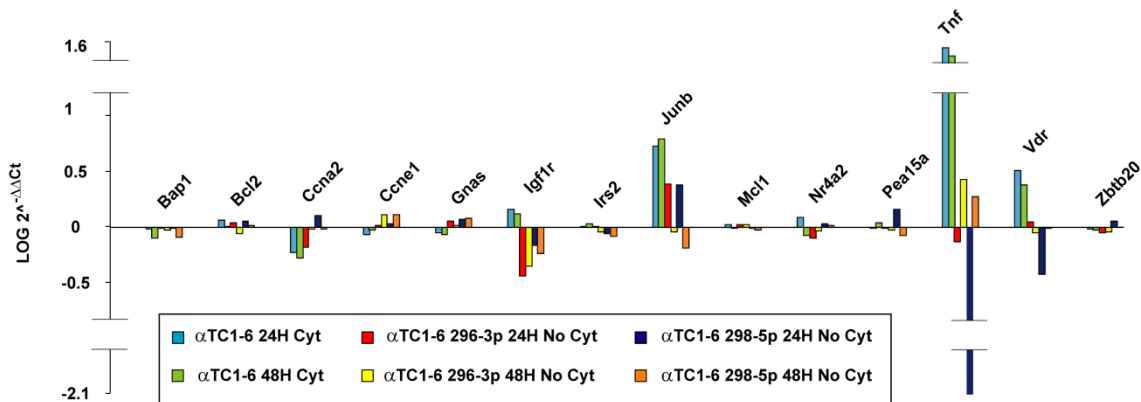


Figura 38. La modulazione del miR-296-3p e del miR-298-5p altera l'espressione dei loro *targets*. Il grafico a barre mostra i cambiamenti di espressione di un set di geni *target* dei microRNA miR-296-3p e miR-298-5p per tre differenti condizioni sperimentali: (i) α TC1-6 trattate con citochine per 24 e 48 ore rispetto ai controlli non trattati; (ii) α TC1-6 non trattate con citochine e trasfettate con *mimic* del mir-296-3p per 24 e 48 ore rispetto ai controlli trasfettati con molecola *scrambled*; (iii) α TC1-6 non trattate con citochine e trasfettate con *mimic* del mir-298-5p per 24 e 48 ore rispetto ai controlli trasfettati con molecola *scrambled*. I dati sono riportati come valori di LOG di $2^{-\Delta\Delta C_t}$. *Hprt* e *Ppia* sono stati utilizzati come controlli endogeni per normalizzare i dati *Real-Time* PCR.

I risultati di *Real-Time* PCR sono stati il punto di partenza per indagare mediante esperimenti *Western Blot* la relazione finale tra i microRNA di interesse ed i *targets Igflr* e *Tnf*. Abbiamo riscontrato un aumento dei livelli proteici di 1.5 volte per IGF1R β e di 1.7 volte per TNF α in cellule α TC1-6 trattate con citochine per 24 ore rispetto ai controlli non trattati; coerentemente, in questo *time point* i microRNA miR-296-3p e miR-298-5p risultano rispettivamente sotto-espressi di 3.7 e 2.2 volte. In condizione di non trattamento con citochine (*steady state*), la trasfezione per 24 ore delle α TC1-6 con *mimic* del miR-296-3p, *mimic* del miR-298-5p e la loro cotrasfezione determina una riduzione nei livelli proteici di IGF1R β rispettivamente di 1.38, 1.41 e 3.25 volte; quando alla trasfezione segue il trattamento con citochine per 24 ore si osserva una riduzione di 1.4 volte dei livelli proteici di IGF1R β solo nel caso della cotrasfezione (Fig. 39 A). Per quanto riguarda TNF α , a *steady state* si osserva una riduzione dei livelli proteici di 1.25 volte dopo trasfezione con *mimic* del miR-296-3p e di 1.23 volte dopo trasfezione con *mimic* del miR-298-5p; la riduzione è maggiore (1.6 volte) quando le cellule α TC1-6 vengono cotrasfettate con le due molecole *mimic* insieme. Una marcata riduzione nei livelli proteici di TNF α (in media 2.5 volte) si riscontra tutte le volte che il trattamento con citochine è preceduto da una delle tre condizioni di trasfezione (Fig. 39 B).

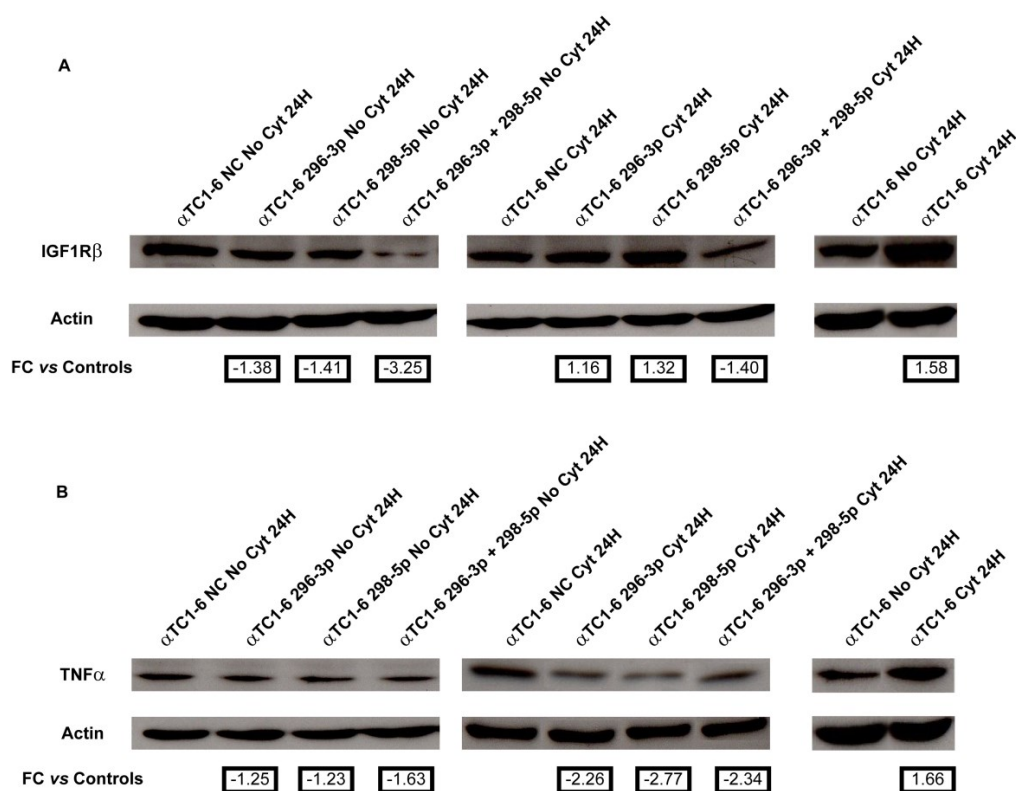


Figura 39. L'espressione di IGF1R β e TNF α è regolata dal miR-296-3p e dal miR-298-5p.

Pannello A. Analisi *western* di IGF1R in 1) cellule α TC1-6 non trattate con citochine e trasfettate per 24 ore con: (i) molecola *scrambled*; (ii) *mimic* del miR-296-3p; (iii) *mimic* del miR-298-5p; (iv) *mimic* del miR-296-3p e *mimic* del miR-298-5p insieme (sinistra); 2) cellule α TC1-6 trasfettate per 24 ore con: (i) molecola *scrambled*; (ii) *mimic* del miR-296-3p; (iii) *mimic* del miR-298-5p; (iv) *mimic* del miR-296-3p e *mimic* del miR-298-5p insieme e trattate con citochine per ulteriori 24 ore (centro); 3) cellule α TC1 trattate con citochine per 24 ore (destra). Pannello B. Analisi *western* di TNF α per le stesse condizioni sperimentali descritte per il Pannello A. β -Actina è stata utilizzata come *loading control*. I valori nei riquadri esprimono i *fold changes* rispetto ai controlli.

Per confermare la regolazione della via di IGF1R da parte dei microRNA miR-296-3p e miR-298-5p abbiamo indagato lo stato di fosforilazione di IRS-1 ed ERK-1 (due nodi a valle del recettore IGF1R) in cellule α TC1-6 dopo trasfezione con i due *miRNA-mimics* (singolarmente o in combinazione) a *steady state* e dopo trattamento con citochine. I livelli di p-IRS-1 (Tyr612) non variano in cellule non trattate e trasfettate con i singoli *miRNA-mimic* ma diminuiscono di circa 1.5 volte nelle α TC1-6 cotrasfettate con entrambi i *miRNA-mimic* (Fig. 40). Se alla trasfezione viene fatto seguire il trattamento con citochine osserviamo una riduzione nei livelli di p-IRS-1 di circa 1.2 volte esclusivamente nella condizione di cotrasfezione. Anche l'attivazione di ERK-1 (fosforilazione in Thr202) appare essere regolata dai microRNA 296-3p e 298-5p; in assenza di trattamento con citochine le cellule α TC1 trasfettate con il *mimic* del

miR-296-3p mostrano livelli di p-ERK-1 simili a quelli del controllo trasfettato con molecola *scrambled*; la trasfezione con il *mimic* del miR-298-5p e con entrambi i *mimics* rivela una riduzione nei livelli di p-ERK-1 di 1.2 e 1.3 volte. Nel contesto di trattamento con citochine i livelli di p-ERK-1 mostrano variazioni apprezzabili rispetto al controllo trasfettato con molecola *scrambled* solo dopo cotrasfezione.

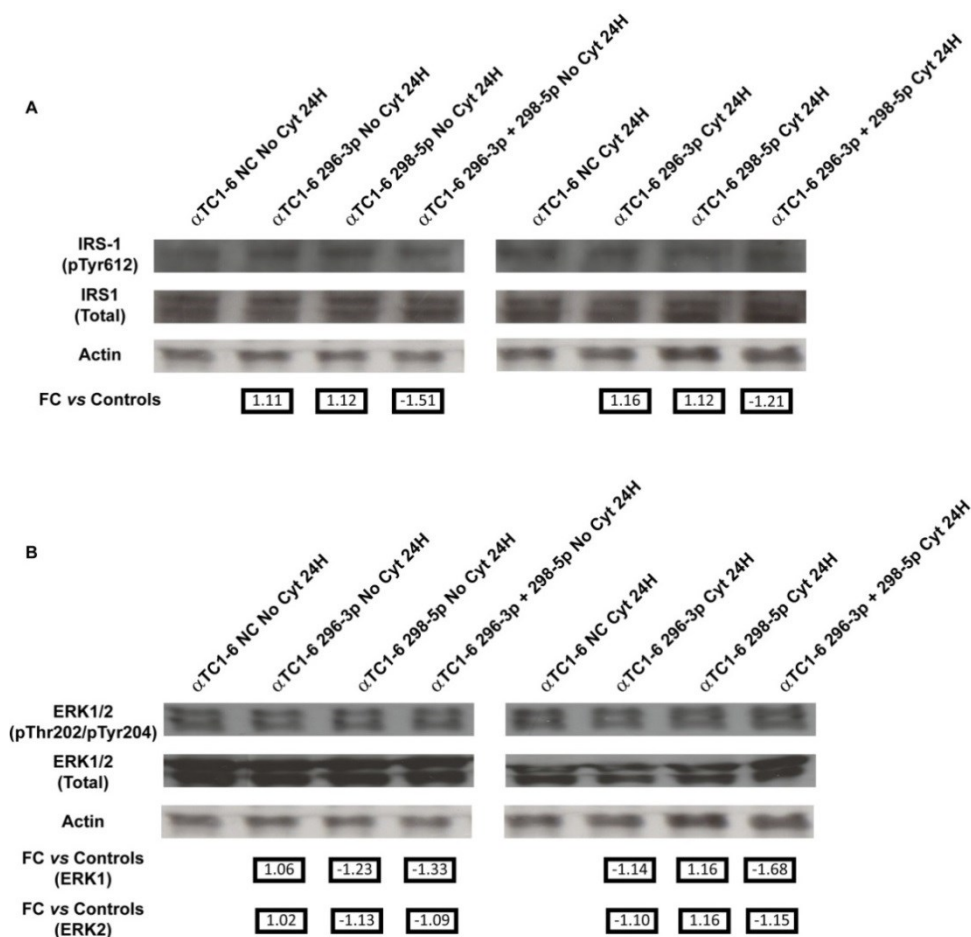


Figura 40. L'attivazione di IRS-1 ed ERK-1 è sotto il controllo del miR-296-3p e del miR-298-5p. Pannello A: Analisi *western* di phosho-IRS-1 (Tyr612) in 1) cellule αTC1-6 non trattate con citochine e trasfettate per 24 ore con: (i) molecola *scrambled*; (ii) *mimic* del miR-296-3p; (iii) *mimic* del miR-298-5p; (iv) *mimic* del miR-296-3p e *mimic* del miR-298-5p insieme. 2) cellule αTC1-6 trasfettate per 24 ore con: (i) molecola *scrambled*; (ii) *mimic* del miR-296-3p; (iii) *mimic* del miR-298-5p; (iv) *mimic* del miR-296-3p e *mimic* del miR-298-5p insieme e trattate con citochine per ulteriori 24 ore (destra). Pannello B. Analisi *western* di phospho-ERK-1 (Thr202/Tyr204) per le stesse condizioni sperimentali descritte per il Pannello A. β-Actina è stata utilizzata come *loading control*. I valori nei riquadri esprimono i *fold changes* rispetto ai controlli.

Genomica dei geni codificanti i microRNA 296-3p e 298-5p

I geni codificanti i microRNA 296-3p e 298-5p sono localizzati in *cluster* in una regione genomica, che comprende anche il gene per il trascritto *non-coding Nespas*, questa regione risulta *imprinted* nel topo e nell'uomo [183]. Le sequenze del miR-296-3p maturo sono conservate al 100% nell'uomo e nel topo, mentre quella relativa alla forma matura del miR-298-5p è identica al 74%. L'analisi della regione mediante il tool UCSC browser ha rivelato la presenza di due *clusters* di isole CpG: 1) il primo comprende due isole CpG da 17.5 a 18.8 kb a monte il primo nucleotide del pre-miR-296 ed è localizzato a 9.2 e 10 Kb a valle del TSS (*Transcription Start Site*) di *Nespas*; 2) il secondo è costituito da tre isole CpG da 30.1 a 33.6 Kb a monte del primo nucleotide del pre-miR-296 ed è localizzato 1.8-5 Kb a monte del TSS di *Nespas* (Fig. 41). Il tool MatInspector ha rivelato un presunto promotore di *Nespas* 500 bp a monte - 100 bp a valle il suo TSS (vedi dopo le predizioni dei TF regolanti l'espressione del cluster).

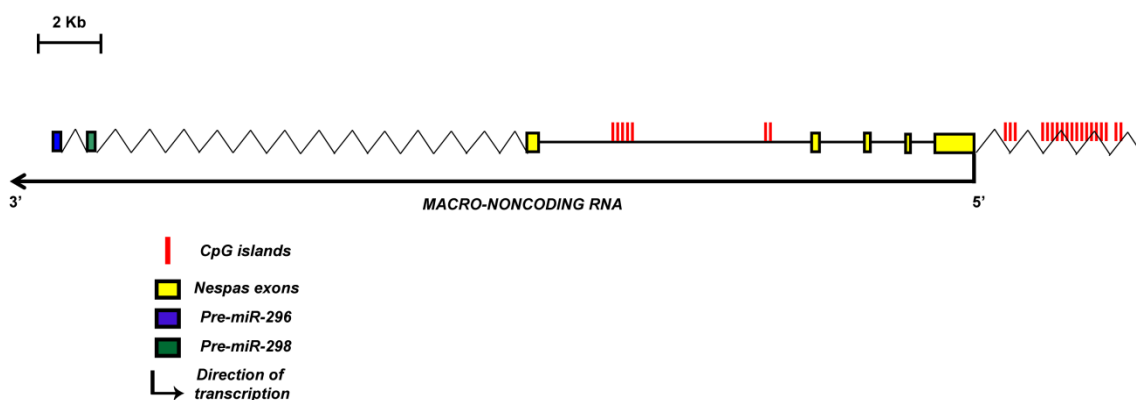


Figura 41. Rappresentazione in scala della regione genomica comprendente Nespas, miR-296 e miR-298. Le isole CpG sono rappresentate da linee verticali di colore rosso; i pre-miR 296 e 298 da segmenti rispettivamente di colore blu e verde; gli esoni del *non-coding RNA Nespas* sono rappresentati da segmenti di colore giallo. L'espressione del macro *non-coding RNA* (precursore dei microRNA 296 e 298 e di *Nespas*) è predetta essere regolata da due gruppi di isole CpG.

Identificazione dei fattori di trascrizione dei microRNA

Nella regione genomica comprendente i geni codificanti i microRNA 296-3p e 298-5p e *Nespas*, il tool MatInspector ha identificato TFBS (*Transcription Factor Binding Sites*) per 77 fattori di trascrizione; quattro di questi: HMX2, HNF4A, LEF1 e MAFB sono noti essere espressi nelle isole del Langerhans ed in particolare MAFB nel pancreas adulto risulta esclusivamente espresso nelle α cellule pancreatiche [184]. La presenza di due siti di legame per il fattore di trascrizione α -specifico MAFB, all'interno del promotore predetto dei microRNA

296-3p e 298-5p, potrebbe fornire una spiegazione dell'espressione cellulo-specifica dei due microRNA; a supporto di questa ipotesi il *tool Multi Experiment Matrix* (MEM) (<http://biit.cs.ut.ee/mem/>) ha mostrato una correlazione negativa statisticamente significativa ($p\text{-value} < 0.0001$, *Pearson Correlation Test*) tra *Mafb* ed il *target* dei microRNA *Igf1r*; inoltre, il *tool* di predizione microrna.org ha identificato inoltre due siti di legame per mmu-miR-296-3p ed mmu-miR-298-5p all'interno del 3'-UTR di *Mafb*.

Network regolatoria in cellule α TC1-6 e β TC1 a steady state

14 dei 73 microRNA esclusivamente o più abbondantemente espressi nelle cellule α TC1-6 rispetto alle β TC1 hanno *targets* validati espressi in cellule α pancreatiche di mammifero (fonte T1Base, <http://www.t1dbase.org/>); a partire da questi dati abbiamo costruito un *network* di 560 nodi e 8222 archi [1] da cui abbiamo fatto derivare un *subnetwork* dei *targets* validati di 4 α -*miRNAs* [1]. Per quanto riguarda le β TC1 abbiamo individuato *targets* validati espressi nelle cellule β pancreatiche di mammifero per 36 dei 100 microRNA esclusivamente o più abbondantemente espressi nelle cellule β TC1 rispetto alle α TC1-6 (fonte T1Base, <http://www.t1dbase.org/>); a partire da questi dati abbiamo costruito un *network* di 439 nodi e 2079 archi [1] ed un *subnetwork* dei *targets* validati di 15 β -*miRNAs* [1]. Abbiamo infine arricchito i nodi dei due *subnetworks* con l'analisi dei processi biologici e confrontato i dati ottenuti per i due tipi cellulari (Tab. 5). Il processo biologico “*pancreatic α cell fate commitment*” è risultato più arricchito nel *network* di geni regolato dagli α -*miRNAs* rispetto a quello dei β -*miRNAs* (*Hypergeometric test*, *Benjamini-Hochberg adjusted p-value* < 0.05).

Biological process (α -miRNAs network vs β -miRNAs network)	Adj-p-value (Benjamini-Hochberg)
DNA replication	3.15e-23
Cell division	2.51e-09
Cellular response to metal ion	4.61e-05
Positive regulation of mesenchymal cell proliferation	5.24e-05
Pancreatic α cell fate commitment	2.23e-02

Tabella 5. Principali processi biologici significativamente arricchiti nel *network* degli α -*miRNAs* rispetto a quella dei β -*miRNAs*. I processi biologici sono stati elencati in ordine decrescente di *adjusted p-value* (dal più significativo al meno significativo).

Profilo d'espressione di 92 geni *core* dell'apoptosi nelle cellule α TC1-6 e β TC1 trattate con citochine

Mediante *Real-Time PCR High-Throughput* (HT) abbiamo dimostrato che il trattamento con citochine di cellule α TC1-6 e β TC1 determina una profonda alterazione del profilo d'espressione di 92 geni *core* del macchinario apoptotico; in particolare, 21 geni sono risultati sovraespressi nella linea α cellulare e 55 nella linea β cellulare nell'intero *time course* sperimentale (24 – 48 ore) rispetto alla controparte non trattata (*untreated controls*, NCs; *Limma test*, *Benjamini-Hochberg adjusted* $p \leq 0.05$) (Tab. 6 e 7). Il numero di geni differenzialmente espressi (DE) nelle β TC1 è risultato significativamente più alto rispetto a quello delle α TC1 (*Fisher's exact test*, $p < 0.0001$); molti più geni (36) sono risultati sovraespressi esclusivamente nella linea β TC1 dopo trattamento con citochine rispetto ai controlli non trattati. Analisi di *literature mining* hanno rivelato che 9, 4 e 8 dei 21 geni DE nelle α TC1-6 hanno rispettivamente funzione proapoptotica, antiapoptotica o presentano entrambe le caratteristiche a seconda del tipo cellulare e del contesto molecolare; 27, 16 e 12 dei 55 geni DE nelle β TC1 sono rispettivamente proapoptotici, antiapoptotici o presentano entrambe le caratteristiche a seconda del tipo cellulare e del contesto molecolare.

Cell Type	Official Gene Symbol	Full Name	FC 24H	Adj P-Value	FC 48H	Adj P-Value	Function	Reference
α TC1-6	<i>Atf3</i>	Activating transcription factor 3	1.66	Not Significant	1.95	0.0518	Anti-apoptotic	PMID: 21841823
α TC1-6	<i>Bak1</i>	BCL2-antagonist/killer 1	1.53	Not Significant	2.34	0.0518	Pro-apoptotic	PMID: 19638530
α TC1-6	<i>Bbc3</i>	BCL2 binding component 3	1.71	0.0442	2.61	Not Significant	Pro-apoptotic	PMID: 20421300
α TC1-6	<i>Bid</i>	BH3 interacting domain death agonist	4.85	0.0048	6.99	0.0009	Pro-apoptotic	PMID: 18252892
α TC1-6	<i>Bmf</i>	Bcl-2-modifying factor	2.05	0.0337	2.31	Not Significant	Pro-apoptotic	PMID: 20706276
α TC1-6	<i>Casp12</i>	Caspase 12	218.81	0.0037	6.97	Not Significant	Pro-apoptotic	PMID: 19402918
α TC1-6	<i>Fas</i>	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	69.96	0.0055	45.59	0.0126	Pro-apoptotic	PMID: 11473025
α TC1-6	<i>Gadd45b</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	2.13	0.05	3.78	0.0578	Pro/Anti-apoptotic	PMID: 12933797 PMID: 16528573
α TC1-6	<i>Ikbkg</i>	Inhibitor of kappaB kinase gamma	1.22	Not Significant	2.83	0.0141	Pro/Anti-apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
α TC1-6	<i>Jak3</i>	Janus kinase 3	2.31	0.0021	4.05	Not Significant	Anti-apoptotic	PMID: 12934099

α TC1-6	<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1, p105	2.45	0.0006	3.19	0.0545	Pro/Anti-apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
α TC1-6	<i>Nfkb2</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 2, p49/p100	9.16	0.0001	14.44	0.0021	Pro/Anti-apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
α TC1-6	<i>Nfkbia</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha	8.95	0.0002	13.51	0.0009	Pro/Anti-apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
α TC1-6	<i>Nfkbib</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, beta	2.07	0.0285	3.37	0.0325	Pro/Anti-apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
α TC1-6	<i>Nod1</i>	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	39.3	0.0002	54.45	0.0017	Pro/Anti-apoptotic	PMID: 10329646
α TC1-6	<i>Nos2</i>	Nitric oxide synthase 2, inducible	4102.54	0.048	9488.83	0.0009	Pro-apoptotic	PMID: 18217711
α TC1-6	<i>Relb</i>	Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	14.72	0.0002	18.29	0.0009	Pro/Anti-apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
α TC1-6	<i>Stat1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1	19.27	0.0002	28.56	0.0009	Pro-apoptotic	PMID: 21937453 PMID: 17620422
α TC1-6	<i>Stat3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	4.7	0.0002	5.89	0.0085	Anti-apoptotic	PMID: 12949733 PMID: 16499450
α TC1-6	<i>Tnfaip3</i>	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	8.65	0.0015	8.38	0.0009	Anti-apoptotic	PMID: 16936197
α TC1-6	<i>Traf4</i>	TNF receptor associated factor 4	3.47	0.0006	5.42	0.0123	Pro-apoptotic	PMID: 12788948

Tabella 6. Geni differenzialmente espressi (DE) in α TC1-6. I geni evidenziati sono specificatamente DE in α TC1-6.

Cell Type	Official Gene Symbol	Full Name	FC 24H	Adj P-Value	FC 48H	Adj P-Value	Function	Reference
βTC1	<i>Akt1</i>	Thymoma viral proto-oncogene 1	1.23	Not Significant	1.57	0.0342	Anti-apoptotic	PMID: 19541499
βTC1	<i>Apaf1</i>	Apoptotic peptidase activating factor 1	1.93	0.0244	1.84	0.0262	Pro-apoptotic	PMID: 12022951
βTC1	<i>Atf3</i>	Activating transcription factor 3	4.23	0.0041	5.4	0.0019	Anti-apoptotic	PMID: 21841823
βTC1	<i>Bak1</i>	BCL2-antagonist/killer 1	2.12	0.0349	2.52	0.0184	Pro-apoptotic	PMID: 19638530
βTC1	<i>Bax</i>	BCL2-associated X protein	1.59	Not Significant	2.57	0.0145	Pro-apoptotic	PMID: 19193868
βTC1	<i>Bbc3</i>	BCL2 binding component 3	2.76	0.0459	4.62	0.0073	Pro-apoptotic	PMID: 20421300
βTC1	<i>Bcl2l1</i>	BCL2-like 1	1.39	Not Significant	1.88	0.0328	Anti-apoptotic	PMID: 19193868
βTC1	<i>Bid</i>	BH3 interacting domain death agonist	4.56	0.0005	10.3	0.0006	Pro-apoptotic	PMID: 18252892
βTC1	<i>Birc2</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 2	1.97	Not Significant	2.14	0.0068	Anti-apoptotic	PMID: 23250032
βTC1	<i>Birc3</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 3	84.19	0	83.48	0.0008	Anti-apoptotic	PMID: 19343319 PMID: 23250032
βTC1	<i>Casp12</i>	Caspase 12	27.06	0.0498	156.46	0.0085	Pro-Apoptotic	PMID: 19402918
βTC1	<i>Cebpa</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	2.48	Not Significant	2.14	0.0493	Pro-Apoptotic	PMID: 19168033 PMID: 21539866
βTC1	<i>Chuk</i>	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	1.27	Not Significant	1.94	0.0207	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
βTC1	<i>Dapk1</i>	Death associated protein kinase 1	1.57	Not Significant	2.28	0.0262	Anti-apoptotic	PMID: 14530257
βTC1	<i>Ddit3</i>	DNA-damage inducible transcript 3	4.2	0.0342	3.9	0.0262	Pro-Apoptotic	PMID: 18776938
βTC1	<i>Dedd2</i>	Death effector domain-containing DNA binding protein 2	1.57	Not Significant	2.05	0.0417	Pro-Apoptotic	PMID: 12527898
βTC1	<i>Dffa</i>	DNA fragmentation factor, alpha subunit	1.66	Not Significant	2.14	0.006	Anti-apoptotic	PMID: 9422506
βTC1	<i>Dffb</i>	DNA fragmentation factor, beta subunit	1.92	Not Significant	3.58	0.0085	Pro-Apoptotic	PMID: 9422506
βTC1	<i>Diablo</i>	Diablo homolog (Drosophila)	1.27	Not Significant	1.92	0.031	Pro-Apoptotic	PMID: 19193868
βTC1	<i>Ern1</i>	Endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 1	1.77	Not Significant	3.63	0.0119	Pro-Apoptotic	PMID: 22518128
βTC1	<i>Fas</i>	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	31.51	0.0077	39.75	0.0002	Pro-Apoptotic	PMID: 11473025

βTC1	<i>Gadd45a</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	1.56	<i>Not Significant</i>	1.89	0.05	Pro-Apoptotic	PMID: 19003803 PMID: 10605933
βTC1	<i>Htra2</i>	HtrA serine peptidase 2	1.38	<i>Not Significant</i>	2.25	0.0207	Pro-Apoptotic	PMID: 15371414
βTC1	<i>Ikbkg</i>	Inhibitor of kappaB kinase gamma	1.72	<i>Not Significant</i>	2.61	0.0262	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
βTC1	<i>Irs2</i>	Insulin receptor substrate 2	1.35	<i>Not Significant</i>	2.22	0.0262	Anti-apoptotic	PMID: 14604813
βTC1	<i>Jak2</i>	Janus kinase 2	2.04	0.0459	3.05	0.0207	Anti-apoptotic	PMID: 18035585 PMID: 22382519 PMID: 21149549
βTC1	<i>Jak3</i>	Janus kinase 3	2.13	0.0449	3.7	0.05	Pro-Apoptotic	PMID: 19414010
βTC1	<i>Lrdd</i>	Leucine-rich and death domain containing	1.98	0.0449	3.26	0.0068	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 16360037
βTC1	<i>Map3k14</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	3.28	0.0547	3.82	0.0019	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 15084608
βTC1	<i>Mapk14</i>	Mitogen-activated protein kinase 14	1.08	<i>Not Significant</i>	1.67	0.05	Pro-Apoptotic	PMID: 11334433
βTC1	<i>Mapk4</i>	Mitogen-activated protein kinase 4	2.16	0.0547	2.9	0.0073	Pro-Apoptotic	PMID: 11334433
βTC1	<i>Mdm2</i>	Transformed mouse 3T3 cell double minute 2	2.32	0.0547	5	0.003	Pro-Apoptotic	PMID: 18802403
βTC1	<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1, p105	2.39	0.0083	3.77	0.0036	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
βTC1	<i>Nfkb2</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 2, p49/p100	7.33	0.0001	14.08	0.0004	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
βTC1	<i>Nfkbia</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha	7.75	0.001	13.1	0.0029	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
βTC1	<i>Nfkbib</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, beta	2.21	0.0034	3.08	0.0154	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
βTC1	<i>Nod1</i>	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	3.44	0.0449	5.69	0.0302	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 10329646
βTC1	<i>Nos2</i>	Nitric oxide synthase 2, inducible	131.04	0.0007	694.3	0.0059	Pro-Apoptotic	PMID: 18217711
βTC1	<i>Ptpn13</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13	1.62	<i>Not Significant</i>	1.78	0.0342	Anti-apoptotic	PMID: 23559010

β TC1	<i>Rel</i>	Reticuloendotheliosis oncogene	1.42	<i>Not Significant</i>	2.15	0.037	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
β TC1	<i>Rela</i>	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	1.99	0.0961	2.47	0.032	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
β TC1	<i>Relb</i>	Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	17.53	0.0005	38.63	0	Pro/Anti-Apoptotic	PMID: 18481952 PMID: 10849002
β TC1	<i>Stat1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1	39.11	0.0001	55.4	0.0001	Pro-apoptotic	PMID: 21937453 PMID: 17620422
β TC1	<i>Stat3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	7.96	0.0002	9.43	0.0006	Anti-apoptotic	PMID: 12949733 PMID: 16499450
β TC1	<i>Stat5a</i>	Signal transducer and activator of transcription 5A	1.42	<i>Not Significant</i>	2.29	0.0207	Anti-apoptotic	PMID: 16214938
β TC1	<i>Stat5b</i>	Signal transducer and activator of transcription 5B	1.48	<i>Not Significant</i>	2.11	0.0157	Anti-apoptotic	PMID: 16214938
β TC1	<i>Tax1bp1</i>	Tax1 (human T cell leukemia virus type I) binding protein 1	1.48	<i>Not Significant</i>	1.78	0.0342	Anti-apoptotic	PMID: 20185725
β TC1	<i>Tnfaip3</i>	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	5.94	0.0273	9.43	0.0068	Anti-apoptotic	PMID: 16936197
β TC1	<i>Tnfrsf10b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	4.64	0.0008	15.7	0.042	Pro-apoptotic	PMID: 15173180
β TC1	<i>Tnfrsf21</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	1.21	<i>Not Significant</i>	3.1	0.0042	Pro-apoptotic	PMID: 11753679
β TC1	<i>Traf2</i>	TNF receptor-associated factor 2	1.69	<i>Not Significant</i>	2.9	0.0085	Anti-apoptotic	PMID: 16581782
β TC1	<i>Traf3</i>	TNF receptor-associated factor 3	2.07	0.0221	3.42	0.0154	Pro-apoptotic	PMID: 17277885
β TC1	<i>Traf4</i>	TNF receptor associated factor 4	1.35	<i>Not Significant</i>	2.23	0.0143	Pro-apoptotic	PMID:12788948
β TC1	<i>Traf6</i>	TNF receptor-associated factor 6	1.31	<i>Not Significant</i>	2.18	0.0085	Pro-apoptotic	PMID: 16436380
β TC1	<i>Trp53</i>	Transformation related protein 53	2.26	0.0273	3.11	0.0154	Pro-apoptotic	PMID: 16360037

Tabella 7. Geni differenzialmente espressi (DE) in β TC1. I geni evidenziati sono specificatamente DE in β TC1.

IL-1 β , IFN γ e TNF α up-regolano l'espressione di *Cebpa* sia a livello di mRNA che a livello di proteina nelle β TC1

Dei 55 geni sovraespressi nelle β TC1 abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul fattore di trascrizione *Cebpa*, la cui espressione nel *profiling* HT a *steady state* risultava bassa sia nelle α TC1-6 che nelle β TC1, ma aumentava specificatamente nella linea β cellulare dopo il trattamento con citochine; questo dato è stato confermato mediante saggio singolo in *Real-Time* PCR su tre diverse repliche biologiche, aggiungendo un ulteriore *time point* precoce (6 ore) di trattamento. Abbiamo riscontrato nelle β TC1 un aumento dell'espressione dell'mRNA di *Cebpa* superiore a 2 volte già dopo 6 ore di trattamento con citochine (*Student's t-test*, $p < 0.001$) (Fig. 42, pannello A). Similmente, un aumento dell'espressione della proteina superiore a 9 volte è stato osservato in maniera specifica per le β TC1 dopo 24 ore di trattamento con citochine rispetto al controllo non trattato (Fig. 42, pannello B). Al contrario di quanto osservato nelle β TC1, nelle α TC1-6 trattate per 24 ore con citochine non abbiamo riscontrato alcuna variazione significativa nei livelli proteici di *Cebpa* (Fig. 42, pannello B).

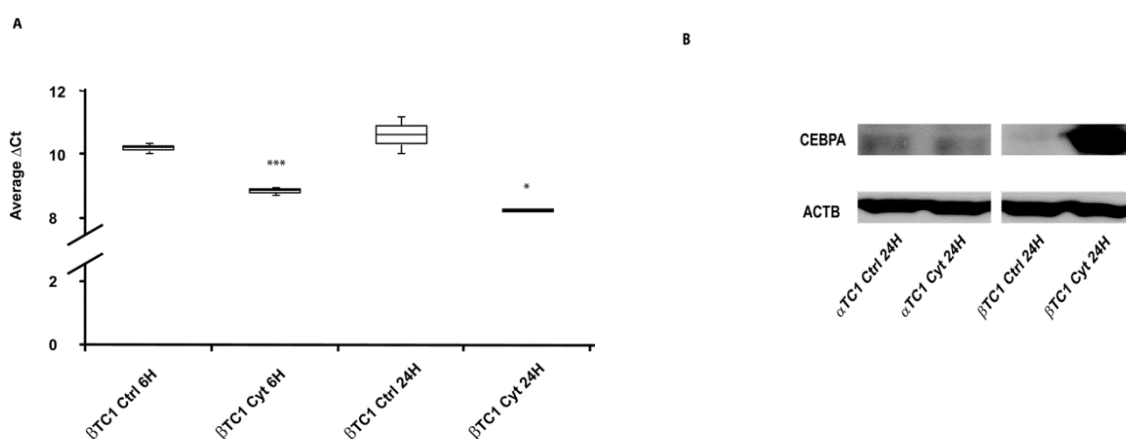


Figura 42. Espressione di *Cebpa*, mRNA e proteina, in cellule α TC1-6 e β TC1. (A) *Box-and-whisker plots* rappresentante i livelli di espressione dell'mRNA di *Cebpa* in β TC1 non trattate (Ctrl, $n = 3$) e trattate con citochine (Cyt, $n = 3$) per 6 e 24 ore. **Two-tailed* $p < 0.05$, ****two-tailed* $p < 0.001$; *paired Student's t test*. (B) *Western blot* di CEBPA in α TC1-6 (pannello a SN) e β TC1 (pannello a DX) non trattate (Ctrl) e trattate (Cyt) con citochine per 24 ore. β -Actina (ACTB) è stata utilizzata come *loading control*.

Il *knockdown* di *Cebpa* con specifici *small interfering* RNAs diminuisce i livelli di apoptosi in cellule β TC1 trattate con citochine

Per indagare il ruolo dell'induzione di *Cebpa* nelle β TC1 a seguito del trattamento con citochine abbiamo trasfettato cellule β TC1 con specifici siRNA contro *Cebpa* (si*Cebpa*) e analizzato le variazioni nei livelli dell'apoptosi rispetto a controlli trasfettati con una molecola *scrambled* (*Negative Control*, NC) e trattati con citochine. I nostri dati rivelano una significativa diminuzione dell'apoptosi ($> 2,5$ volte) nelle β TC1 trasfettate con siRNA specifici per *Cebpa* e trattate con citochine per 24 ore rispetto al controllo descritto (*Tukey honestly significant difference* [HAD] *post hoc one-way analysis of variance* [ANOVA] test, $p < 0.01$; Fig. 43, pannello A). Allo stesso *time point* abbiamo riscontrato una diminuzione di 5,5 volte dei livelli proteici di CEBPA nelle β TC1 trasfettate con si*Cebpa* e trattate con citochine rispetto a β TC1 trasfettate con la molecola *scrambled* e trattate con citochine (Fig. 43, pannello B).

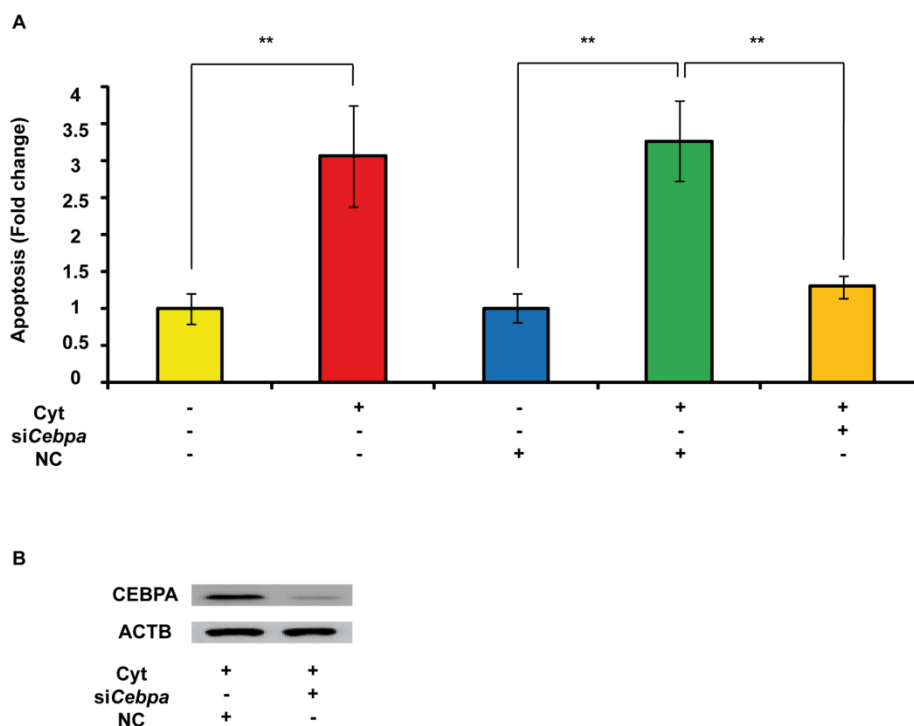


Figura 43. Livelli dell' apoptosi indotta da citochine in cellule β TC1 trasfettate con si*Cebpa*. (A) I valori di apoptosi sono stati misurati mediante il metodo dell'Annexina V/PI ed indicati come *fold change* rispetto al controllo. I dati rappresentano la media $\pm$ deviazione standard (D.S.) di tre esperimenti indipendenti ($n = 3$). $**p < 0.01$, *Tukey honestly significant difference* (HSD) *post hoc one-way* ANOVA test. (B) Western blot di CEBPA in β TC1 trasfettate con si*Cebpa* e trattate con citochine e nel rispettivo controllo. β -Actina (ACTB) è stata utilizzata come *loading control*.

Cebpa* esercita il suo ruolo proapoptotico mediante i suoi *targets* trascrizionali: *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b

L'analisi della letteratura scientifica ci ha permesso di indentificare 16 potenziali *targets* trascrizionali del fattore di trascrizione *Cebpa*, validati o la cui espressione è stata dimostrata essere indotta da *Cebpa* in altri tipi cellulari (Tab. 8).

CEBPA Targets Official Gene Symbol	Function in Apoptosis	Control by CEBPA (REF)	Tissue	Role in pancreatic β cell death (REF)
<i>Arl6ip5</i>	Pro-apoptotic	Positive Control (PMID: 18313667; 21655096)	Murine fibroblast cell line; Human adipocytes	N/A
<i>Bcl2</i>	Anti-apoptotic	Negative Control (PMID: 18313667)	Murine fibroblast cell line	PMID: 8739912
<i>Bcl2l1</i>	Anti-apoptotic	Negative Control (PMID: 18313667)	Murine fibroblast cell line	PMID: 19581414
<i>Capn5</i>	Pro-apoptotic	Positive Control (PMID: 18313667)	Murine fibroblast cell line	N/A
<i>c-Myc</i>	Oncogene/Pro-apoptotic	Negative Control (PMID: 11340171)	Human leukemic monocyte limphoma cell line	PMID: 12015982
<i>Ddit3</i>	Pro-apoptotic	Positive Control (PMID: 18445634)	Human Hepatic cell line	PMID: 18559892
<i>Fas</i>	Pro-apoptotic	Positive Control (PMID: 18313667)	Murine fibroblast cell line	PMID: 11473033
<i>Foxa2</i>	Transcription Factor	Transcription Factor of C/EBP α (PMID: 16467360, PMID: 20659319)	Mouse Lung	PMID: 20534694
<i>Fth1</i>	Anti-apoptotic	Positive Control (PMID: 11340171)	Human leukemic monocyte limphoma cell line	N/A
<i>Hdac1</i>	Histone deacetylase	Positive Control (PMID: 18313667)	Murine fibroblast cell line	PMID: 22772764
<i>Hint1</i>	Tumor suppressor activity	Positive Control (PMID: 11340171)	Human leukemic monocyte limphoma cell line	N/A
<i>Per2</i>	Pro-apoptotic	Positive Control (PMID: 15985538)	Murine fibroblast cell line	N/A
<i>S100a8</i>	Apoptosis/Inflammation	Positive Control (PMID: 11340171)	Human leukemic monocyte limphoma cell line	N/A
<i>Smad4</i>	TGF β pathway	Positive Control (PMID: 18313667)	Murine fibroblast cell line	N/A
<i>Tgfb2</i>	Anti-apoptotic/Pro- apoptotic	Negative Control (PMID: 16467360)	Mouse Lung	PMID: 16435884
<i>Tnfrsf10b</i>	Pro-Apoptotic	Positive Control (PMID: 19168033)	Rat hepatic stellate cell line	PMID: 12488957

Tabella 8. Lista dei *targets* di CEBPA.

Abbiamo focalizzato la nostra attenzione su due geni: *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b* per il loro ruolo validato di induttori positivi dell'apoptosi, seppur in altri sistemi cellulari modello. Esperimenti di *Real-Time* PCR hanno confermato la sovraespressione di entrambi i *targets* in β TC1 trattate con citochine per 24 ore rispetto ai controlli non trattati; in particolare, per *Arl6ip5* la sovraespressione diventava significativa dopo 24 ore di trattamento con citochine, mentre per *Tnfrsf10b* l'induzione era significativa già dopo 6 ore di trattamento e si manteneva tale per l'intero *time course* (Fig. 44, pannelli A e B). Per confermare il controllo di *Cebpa* sull'espressione di *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b* abbiamo valutato i profili di mRNA e proteina dei due geni *target* in β TC1 dopo trasfezione con si*Cebpa* e trattamento con citochine. L'mRNA di *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b* diminuisce significativamente nelle β TC1 trasfettate con si*Cebpa* e trattate con citochine per 6 ore (Fig. 44, pannelli A e B); similmente i livelli delle proteine ARL6IP5 e TNFRSF10B diminuiscono la loro espressione di 1,7 e 1,3 volte rispettivamente nelle β TC1 trasfettate con si*Cebpa* e trattate con citochine per 24 ore (Fig. 45)

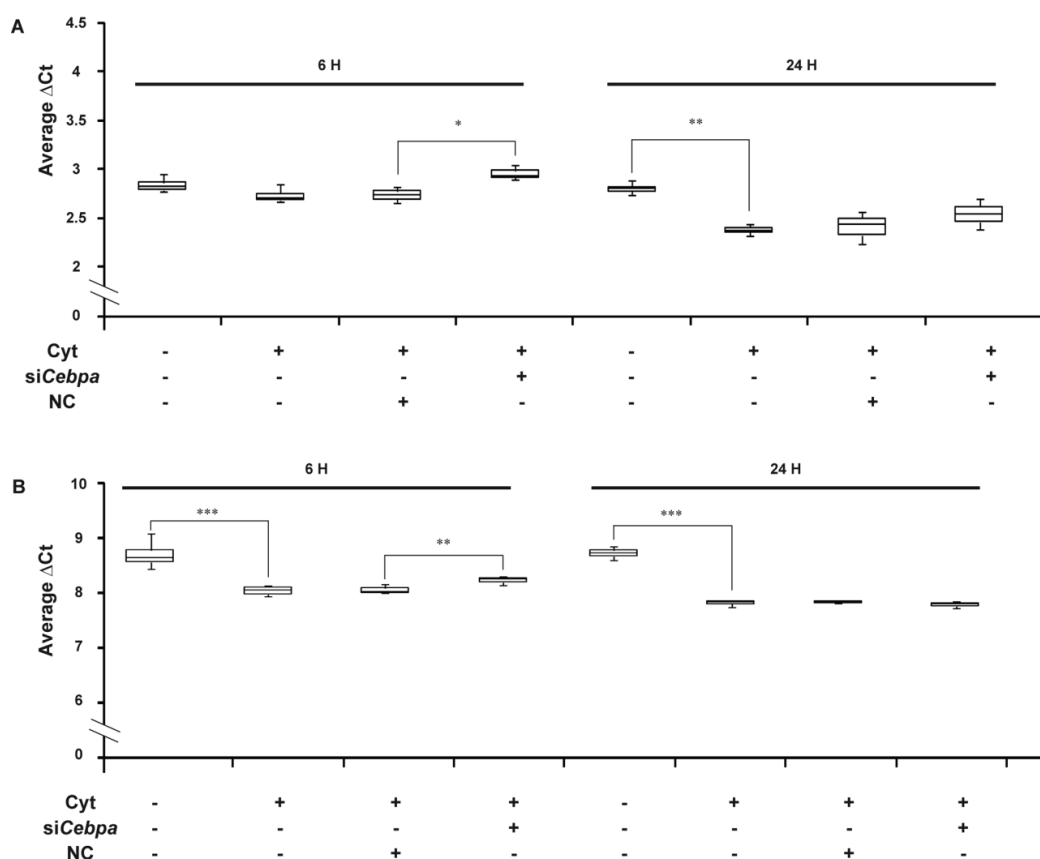


Figura 44. Livelli dell' mRNA di *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b* a *steady state* e dopo trattamento con citochine per 6 e 24 ore in β TC1 trasfettate con si*Cebpa*. (A) *Box-and-whisker plots* rappresentanti i risultati relativi ad *Arl6ip5*; (B) *Box-and-whisker plots* rappresentanti i risultati relativi a *Tnfrsf10b*. *Two-tailed $p < 0.05$, **two-tailed $p < 0.01$, ***two-tailed $p < 0.001$; paired Student's t test ($n = 3$).

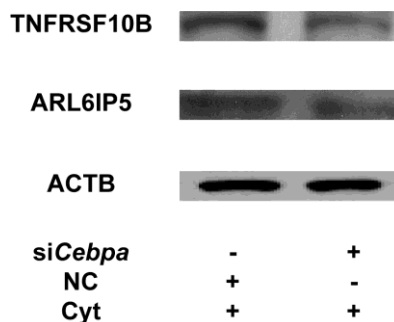


Figura 45. *Western blot* di ARL6IP5 e TNFRSF10B in cellule β TC1 trasfettate con molecola *scrambled* e con siCebpa e trattate con citochine per 24 ore. β -Actina (ACTB) è stata utilizzata come *loading control*.

I profili di espressione dell'mRNA di *Arl6ip5* correlano positivamente con quelli dell'mRNA di *Cebpa* ($r = 0.66$, $p = 0.019$; *Pearson correlation test*) nelle β TC1 durante l'intero *time course* sperimentale di 6 e 24 ore (Figura Supplementare 1 A); nello stesso contesto biomolecolare l'espressione dell'mRNA di *Tnfrsf10b* è risultata leggermente ma non significativamente correlata a quella dell'mRNA messaggero di *Cebpa* ($r = 0.40$, $p = 0.19$; *Pearson correlation test*). Figura Supplementare 1 B). L'analisi dell'espressione di *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b* nelle cellule della linea α TC1-6 non ha rivelato significative variazioni dell'espressione dell'mRNA di *Arl6ip5* dopo 24 ore di trattamento con citochine rispetto al controllo non trattato; tuttavia, i livelli d'espressione dell'mRNA di *Tnfrsf10b* sono risultati significativamente più alti anche nelle α TC1-6 trattate con citochine rispetto al controllo non trattato ma la dimensione dell'incremento è comunque inferiore rispetto a quanto osservato nelle β TC1 e non si traduce a livello proteico (Fig. 46 A e B).

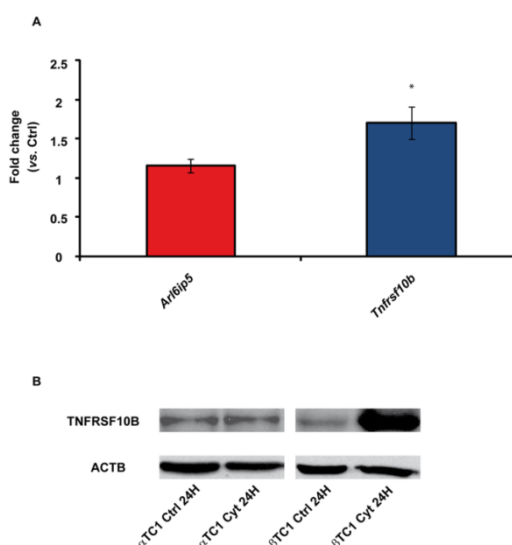


Figura 46. Espressione di *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b* in cellule α TC1 e β TC1.

Il knockdown di *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b* con specifici *small interfering RNA* diminuisce i livelli di apoptosi in cellule β TC1 trattate con citochine

Per valutare il ruolo funzionale di *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b* nell'apoptosi citochino-mediata delle β TC1 abbiamo valutato i livelli di apoptosi di cellule β TC1 trasfettate con *siArl6ip5* o *siTnfrsf10b* e trattate con citochine per 24 ore rispetto ad un controllo trasfettato con molecola *scrambled* e trattato con citochine. In entrambi i casi abbiamo assistito ad un decremento nei livelli di apoptosi; in particolare l'utilizzo dei siRNA specifici per *Tnfrsf10b* e per *Arl6ip5* ha determinato una diminuzione dell'apoptosi rispettivamente di 1,7 volte e 1,2 volte nei confronti dei relativi controlli (Fig. 47 A e B). Alle stesse condizioni sperimentali abbiamo verificato l'effettiva riduzione dei livelli proteici di TNFRSF10B e ARL6IP5 osservando una riduzione rispettivamente di 2,1 e 1,8 volte delle proteine TNFRSF10B e ARL6IP5 dopo trasfezione delle β TC1 con *siTnfrsf10b* e *siArl6ip5* e trattamento con citochine rispetto al controllo trasfettato con molecola *scrambled* e trattato con citochine (Fig. 47 C e D).

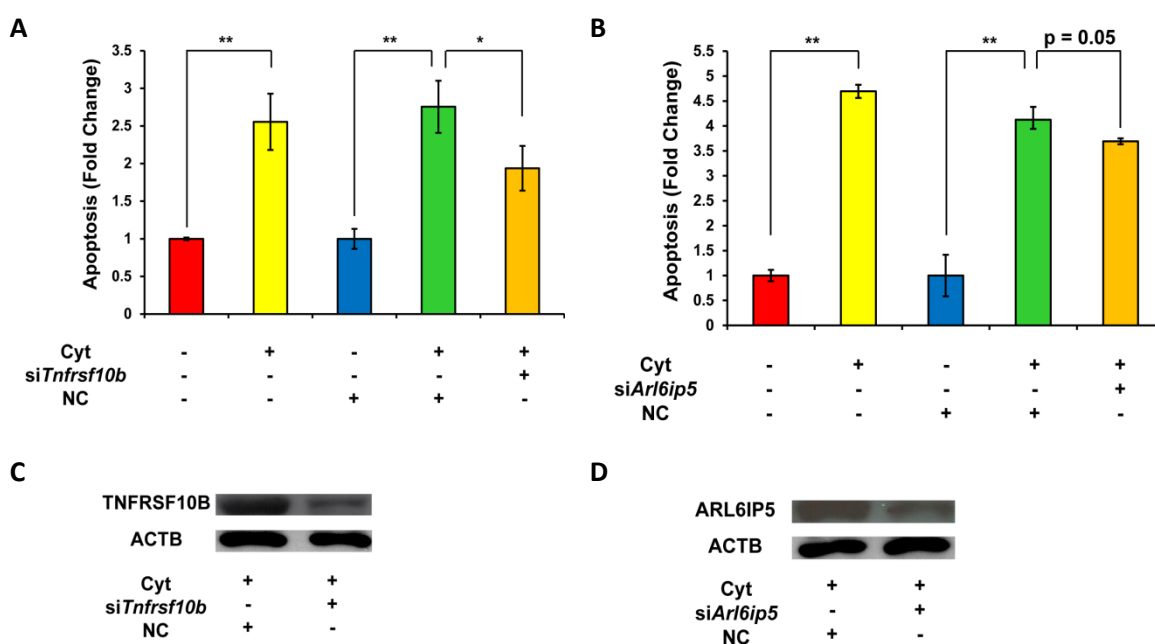


Figura 47. Livelli dell' apoptosi indotta da citochine in cellule β TC1 trasfettate con *siTnfrsf10b* (pannello A) e *siArl6ip5* (pannello B). I valori di apoptosi sono stati misurati mediante il metodo dell'Annessina V/PI ed indicati come *fold change* rispetto ai controlli. I dati rappresentano la media $\pm$ deviazione standard (DS) di tre esperimenti indipendenti ($n = 3$). $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, Tukey honestly significant difference (HSD) post hoc one-way ANOVA test. (C) Western blot di TNFRSF10B in β TC1 trasfettate con *siTnfrsf10b* e trattate con citochine e nel rispettivo controllo; (D) Western blot di ARL6IP5 in β TC1 trasfettate con *siArl6ip5* e trattate con citochine e nel rispettivo controllo. β -Actina (ACTB) è stata utilizzata come *loading control*.

Espressione di *Cebpa* dopo induzione del fattore di trascrizione β cellulare *Pdx-1*

Per studiare la relazione tra l'espressione di *Cebpa* ed il fenotipo differenziato delle β cellule pancreatiche, abbiamo indotto l'espressione di *Pdx-1* in cellule della linea INS-1 $\alpha\beta$ attraverso il trattamento con doxociclina per 36 e 48 ore (esperimenti effettuati in collaborazione con il gruppo di ricerca coordinato da J. Størling). Abbiamo osservato una significativa diminuzione nei livelli di espressione dell'mRNA di *Cebpa* a 36 e 48 ore dopo il trattamento con doxociclina rispetto ai controlli non trattati. In concomitanza alla diminuzione di *Cebpa* abbiamo verificato la diminuzione dei livelli di espressione dell'mRNA di *Tnfrsf10b* dopo 36 ore di trattamento con doxociclina rispetto ai controlli non trattati (Fig. 48).

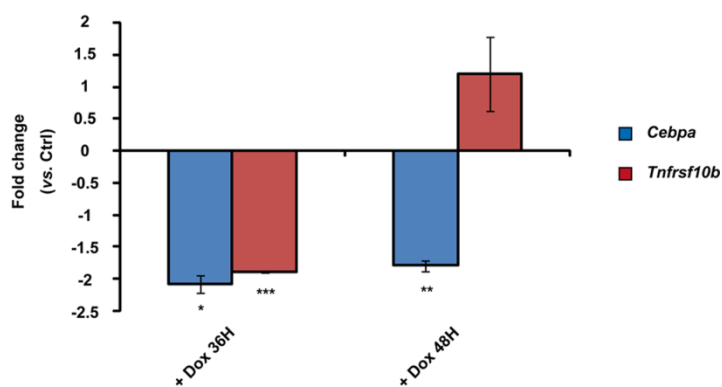


Figura 48. Espressione dell'mRNA di *Cebpa* e *Tnfrsf10b* in cellule della linea INS-1 $\alpha\beta$ dopo induzione di *Pdx-1* con doxociclina per 36 e 48 ore. I valori sono riportati come *fold change* rispetto ai controlli non trattati. *Two-tailed $p < 0.05$; **two-tailed $p < 0.01$; ***two-tailed $p < 0.001$; paired Student's t test ($n = 3$).

Ricostruzione del *network* trascrizionale a valle di CEBPA

Attraverso analisi *in silico* (che si sono avvalse dell' algoritmo LASAGNA) abbiamo individuato rispettivamente 4 e 6 TFBS (*Transcription Factor Binding Sites*) per il fattore di trascrizione CEBPA in una regione genomica di 5 kb a monte del TSS (*Transcription Start Site*) di *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b* (Figura Supplementare 2 A e B). Sfruttando il tool ECR browser abbiamo identificato un TFBS per NFKB1 (localizzato in una ECR – *Evolutionary Conserved Region*, di uomo e topo) vicino il TFBS per CEBPA centrato a 2251 bp *upstream* il TSS di *Arl6ip5* (Figura Supplementare 2 A). ECR browser ha identificato anche un TFBS per DDIT3:CEBPA a 3070 pb *upstream* il TSS di *Tnfrsf10b* e conservato tra uomo e topo (Figura Supplementare 2 B). Sulla base dei dati sperimentali ottenuti abbiamo costruito un *network* di 182 nodi e 336 archi delle interazioni fisiche e funzionali di CEBPA; il *network* è stato generato a partire dall'unione dei seguenti *subnetworks*: (i) ARL6IP5, CEBPA, NFKB1, PDX1, TNFRSF10B e loro primi interattori; (ii) proteine dell'apoptosi i cui trascritti sono stati

analizzati in questo studio mediante la tecnologia TLDA; (iii) proteine della via di MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) e di NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) [162] di cui è noto il coinvolgimento nella disfunzione delle β cellule indotta dalle citochine. L'intersezione dei risultati ottenuti dall'analisi di diversi parametri di centralità della *network* (MCC, *Degree*, *Bottleneck*, *Closeness*, *Betweenness*) ha rivelato CEBPA, ARL6IP5, TNFRSF10B, TRAF2 e UBC come nodi più centrali (Figura Supplementare 3). Dallo studio delle GO (*Gene Ontologies*) e delle *pathways* è emerso che i geni più rappresentati all'interno della *network* sono coinvolti nei seguenti processi biologici: morte cellulare, degenerazione e trasformazione neoplastica (Tabella Supplementare 4). Per trovare un *link* diretto tra i nodi più centrali della *network* (CEBPA, ARL6IP5, TNFRSF10B, TRAF2 e UBC) e la citotossicità indotta dalle citochine nelle β cellule pancreatiche, abbiamo cercato a livello delle loro regioni promotore le seguenti caratteristiche: (i) TFBSs evolutivamente conservati per membri della famiglia C/EBP e (ii) elementi di risposta alle citochine. *ECR Browser* ha rivelato *TFBSs* conservati tra uomo e topo per AP1, NF- κ B e STAT (tutti noti mediatori chiave della risposta immune) all'interno delle regioni predette essere promotori di *Arl6ip5*, *Cebpa* e *Traf2*. Per quanto riguarda *Tnfrsf10b* abbiamo individuato a livello del promotore un TFBS evolutivamente conservato tra uomo e topo per DDIT3. Secondo questa analisi, a livello del promotore di *Ubc* non risiedono TFBSs per membri della famiglia C/EBP né per elementi di risposta alle citochine (Tabella Supplementare 5). I nostri dati TLDA e saggi singoli di *Real-Time* PCR dimostrano che i livelli dell'mRNA di *Rela* e *Jun* (due geni che codificano per membri dei complessi NF- κ B e AP1, rispettivamente) aumentano nelle β TC1 dopo trattamento con citochine, l'espressione di entrambi non varia invece nelle cellule della linea α TC1-6 sottoposte al medesimo trattamento (Fig. 49). I dati TLDA sui geni del macchinario apoptotico (*AM genes*) rivelano che l'espressione dell'mRNA di *Cebpa* correla positivamente con quella di 24 geni sovraespressi nelle β TC1 dopo 24 ore di trattamento con citochine (*Pearson correlation test*, $p < 0.01$, Tabella Supplementare 6); secondo il database *TELiS* un maggior numero di questo set di geni contiene elementi di risposta ad NF- κ B nel loro promotore rispetto a tutti gli altri *AM genes* sovraespressi nelle β TC1 dopo il trattamento con citochine ($p = 0.0451$, *two-sample t test*).

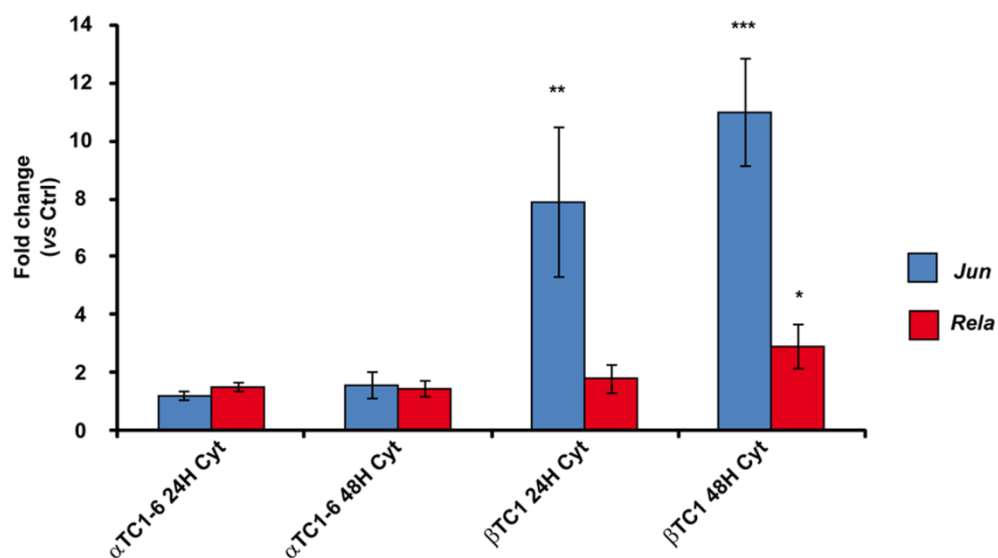


Figura 49. Espressione dell'mRNA di *Jun* (barre blu) e *Rela* (barre rosse) in cellule αTC1-6 e βTC1 dopo trattamento con citochine per 24 e 48 ore. I valori sono riportati come *fold change* rispetto a controlli non trattati. *Two-tailed $p < 0.05$; **two-tailed $p < 0.01$; ***two-tailed $p < 0.001$; paired Student's t test ($n = 3$).

DISCUSSIONE

Sebbene l'insorgenza del Diabete Mellito non possa essere ancora efficacemente prevenuta, importanti progressi sono stati fatti nella conoscenza delle sue basi patogenetiche. Di particolare interesse è la comprensione del ruolo dell'autoimmunità e dei mediatori dell'infiammazione (es. citochine proinfiammatorie) nella disfunzione β cellulare caratteristica del Diabete Mellito, soprattutto per quello di tipo 1. L'innesco iniziale dell'attacco immunitario e la sua amplificazione dipenderebbero da interazioni tra ligandi endogeni ed esogeni di varia natura (es. antigeni virali) ed i recettori dell'immunità innata PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), presenti sulla superficie sia delle cellule del sistema immunitario che delle β cellule pancreatiche. Questa interazione determina l'attivazione di diverse vie di segnalazione (es. IRFs, NF- κ B, STATs) che inducono stress del reticolo endoplasmatico (ER *stress*), apoptosi β cellulare e produzione di chemochine e citochine che attraggono a livello dell'isola del Langerhans diverse tipologie cellulari del sistema immunitario (linfociti T attivati, macrofagi, cellule dendritiche); queste amplificano in un "circolo vizioso" di eventi molecolari, il processo infiammatorio dell'insulite. Il *background* genetico degli individui affetti riveste un ruolo chiave in ambito patogenetico perché conferisce al soggetto una maggiore suscettibilità o resistenza allo sviluppo del Diabete Mellito ed è responsabile della "stabilizzazione" e "cronicizzazione" dell'evento infiammatorio. L'assetto molecolare del paziente è inoltre alla base dell'enorme complessità di *pathways* molecolari attivate dalla reazione autoimmunitaria nelle β cellule, ma convergenti tutte nel danno/disfunzione β cellulare per fenomeni di: (i) morte cellulare e (ii) de-differenziamento. In questo scenario un ruolo importante è svolto dagli RNA non-codificanti (es. microRNA, *long non-coding* RNA), di cui è ben noto il coinvolgimento negli eventi di: (i) produzione e secrezione insulinica; (ii) sviluppo e differenziamento del pancreas endocrino; (iii) regolazione della funzione immunitaria; iv) controllo post-trascrizionale dei geni candidati del T1DM; (iv) morte cellulare citochino-mediata. Il loro interesse è sottolineato da esperimenti GWAS (*Genome Wide Association Studies*), che associano variazioni in regioni *non-coding* del genoma al maggiore rischio di sviluppare la patologia. La comprensione degli intricati *networks* molecolari, responsabili della disfunzione β cellulare nel T1DM, è da molto tempo argomento privilegiato della ricerca biomedica; di recente, anche gli altri tipi cellulari del complesso microorgano che è l'isola del Langerhans, sono diventati oggetto di numerosi studi, in particolare per la loro capacità di riprogrammarsi, in particolari condizioni, in β cellule produttrici di insulina. La β cellula non rappresenta quindi l'unico bersaglio da considerare per contrastare la progressione della patologia. A tal proposito, l' α cellula pancreatica è diventata un importante *topic* in ambito diabetologico per la sua duplice natura di "guardiano" della funzione β pancreatica (es. capacità di transdifferenziare in β cellula,

secrezione di GLP-1) ed “antagonista” dell’azione insulinica (es. iperplasia e iper-secrezione di glucagone). Seppur vicine “fisicamente” ed “ontogeneticamente” alle cellule β pancreatiche, i tipi cellulari “non- β ” dell’isola del Langerhans ed in particolar modo le cellule α (il tipo cellulare più abbondante nell’isola dopo le cellule β), riescono ad evedere l’azione citotossica delle citochine infiammatorie; il conseguente incremento relativo della popolazione α cellulare e l’iper-secrezione dell’ormone glucagone sono eventi importanti nell’aggravare la condizione iperglicemica [24]. Oggetto di questa dissertazione è stato lo studio delle basi molecolari della resistenza delle cellule α pancreatiche e della suscettibilità della controparte β cellulare all’apoptosi indotta dalle citochine proinfiammatorie (IL-1 β , IFN γ e TNF α). L’analisi dell’espressione di microRNA e geni *core* dell’apoptosi nelle linee cellulari murine α TC1-6 e β TC1 a *steady state* e dopo trattamento con citochine proinfiammatorie (una condizione che mima *in vitro* l’insulto autoimmune), ci ha permesso di identificare un *set* di geni differenzialmente sovraespressi o sottoespressi in maniera cellulo-specifica e di caratterizzarne il ruolo funzionale nelle *pathways* di resistenza/suscettibilità all’apoptosi. Abbiamo studiato in particolare il ruolo dei microRNA 296-3p e 298-5p perché: (i) essi sono specificatamente espressi a *steady state* in cellule α TC1-6, ma non in cellule β pancreatiche (β TC1 ed INS-1E); e (ii) sono sottoespressi in cellule α TC1-6 dopo trattamento con citochine rispetto ai controlli non trattati. Lo studio funzionale dei due microRNA ha sfruttato la trasfezione di *miRNA-mimics* dei miR-296-3p e miR-298-5p (da soli o in combinazione) in cellule α TC1-6 trattate con citochine ed ha rivelato che la sottoespressione α -cellula specifica dei miR-296-3p e miR-298-5p a seguito del trattamento con citochine esercita un ruolo protettivo nei confronti dell’apoptosi. I microRNA miR-296-3p e miR-298-5p svolgono la loro azione antiapoptotica/pro-proliferativa regolando sinergisticamente l’espressione dei geni *target* *Igf1r* e *Tnfa*. L’identificazione di isole CpG e la presenza a livello del promotore di siti di legame per fattori di trascrizione α cellula-specifici (come LEF1 e MAFB) suggeriscono che alla base dell’espressione α -specific dei microRNA 296 e 298 possano risiedere fenomeni di regolazione epigenetica e specifici fattori di trascrizione.

I microRNA 296 e 298 sono stati identificati sia nel topo (cromosoma 2) che nell’uomo (cromosoma 20) in prossimità del *cluster imprinted Gnas/GNAS*; questo *cluster* è similmente organizzato nelle due specie e dà origine mediante *splicing* alternativo a diversi trascritti codificanti per proteine e *non-coding* RNA. I trascritti *non-coding* sono espressi solo dall’allele paterno ed uno, *Nespas/NESPAS*, è in orientamento “antisense” rispetto alla sua controparte “senso” *Nesp/NESP*; *Nespas/NESPAS* è anche la molecola precursore dei microRNA 296 e 298 [183]. Il-miR-296-3p svolge un ruolo importante in diversi modelli tumorali [185, 186] ma soltanto per il miR-296-5p è noto un coinvolgimento nella fisiologia dei tipi cellulari componenti l’isola pancreatica. In particolare, il miR-296 -5p è risultato sottoespresso in cellule della linea MIN6, dopo trattamento con alte dosi di glucosio [187], è coinvolto nello sviluppo

del pancreas [188] ed è presente nelle microvescicole (MVs, *Microvesicles*) responsabili del *cross-talk* tra cellule dell'isola pancreatica e cellule endoteliali dell'isola pancreatica (IECs, *Islet Endothelial Cells*) [189, 190]. Il miR-298-5p è stato dimostrato regolare l'espressione di *Bace1* (β -amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) [191], l'enzima responsabile della produzione del β amiloide, e una sua sotto-espressione è stata recentemente descritta in tessuti cerebrali di modelli murini di *Alzheimer's disease* [192]. Anche per il miR-298-5p, così come per il miR-296-3p, non sono state pubblicate in precedenza evidenze dirette di un'azione a livello dell'isola del Langerhans. Lo studio dei bersagli molecolari dei due microRNA in sistemi cellulari diversi dalle cellule pancreatiche ha rivelato *Creb1* come *target* validato del miR-296-3p [180] e *Tnf* e *Vdr* come *targets* validati del miR-298-5p [181, 182]. In questo lavoro abbiamo dimostrato che l'azione dei due microRNA si esplica mediante la regolazione, sinergica e cooperativa, dell'espressione dei geni target *Tnf* e *Igflrb* e delle *pathways* a valle di IRS-1 ed ERK-1. IGF1R promuove resistenza all'apoptosi mediante diversi meccanismi che vedono: (i) l'incremento nei livelli di espressione delle molecole antiapoptotiche BCL-2 e BCL-XL; (ii) l'inattivazione delle molecole proapoptotiche BAD e CASP9 [193, 194] e l'attivazione della proliferazione cellulare attraverso la fosforilazione di IRS-1 e di ERK-1 [195, 196]. La sottoespressione del miR-296-3p e del miR-298-5p e la contemporanea attivazione di *pathways* correlate alla sopravvivenza e alla proliferazione (es. IGF1R) potrebbe spiegare la resistenza delle cellule α TC1-6 all'apoptosi indotta dalle citochine (Figura Supplementare 4). Del TNF α , (altro *target* validato dei due microRNA) sono noti l'espressione fisiologica da parte delle cellule endocrine del pancreas, il suo contributo nell'omeostasi insulare [83, 197], il ruolo esercitato nella fisiologia dell'isola pancreatica e la capacità di indurre proteine con funzione antiapoptotica [198]: questi dati potrebbero spiegare positivamente l'aumentata sintesi del TNF α in conseguenza della sottoespressione dei microRNA regolatori (miR-296-3p e miR-298-5p) nel contesto della resistenza α cellulare all'apoptosi. Allo stesso tempo, il TNF α prodotto dalle cellule α nel corso dell'insulite potrebbe agire in maniera paracrina sulle vicine β cellule amplificando il danno.

L'analisi del profilo di espressione di 92 geni *core* del Macchinario Apoptotico (AM) in cellule α TC1-6 e β TC1 a *steady state* e dopo trattamento con una combinazione di citochine proinfiammatorie (IL-1 β , IFN γ e TNF α) ha rivelato significative differenze nel trascrittoma dei due tipi cellulari. Dopo trattamento con citochine 21 e 55 geni sono risultanti sovraespressi rispettivamente in cellule della linea α e β pancreatica; di questi, diversi mostrano una interessante induzione cellulo-specifica. Dei geni identificati come differenzialmente espressi (DE) nella linea β TC1 dopo trattamento con citochine abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul fattore di trascrizione C/EBP α , per il quale abbiamo dimostrato che: (i) è espresso a bassi livelli in cellule α TC1-6 e β TC1 a *steady state* ma risulta significativamente e specificatamente sovraespresso (a livello di mRNA e a livello proteico) in cellule β TC1 trattate con citochine; (ii)

è direttamente coinvolto nell'apoptosi citochino-mediata delle cellule β TC1; 3) il ruolo proapoptotico è esercitato mediante l'induzione dell'espressione dei *targets* trascrizionali *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b*; iv) C/EBP α risulta sottoespresso, a livello di mRNA, dopo induzione del fattore di trascrizione β -specifico PDX-1 in un sistema modello di differenziamento “ α to β ”.

Diversi studi hanno confermato il ruolo critico di C/EBP α nel differenziamento delle cellule della linea mieloide così come nella loro trasformazione neoplastica [108, 199]. Il nostro lavoro dimostra per la prima volta che l'espressione di *Cebpa*, sia a livello di mRNA che di proteina, è significativamente più elevata in cellule della linea β TC1 trattate con citochine rispetto ai controlli non trattati e svolge in questo contesto cellulare un importante ruolo nella morte cellulare per apoptosi. Al contrario, nella linea α TC1-6 (dove le citochine non svolgono alcun ruolo proapoptotico) l'espressione di *Cebpa* non è risultata alterata. Degli altri membri della famiglia dei fattori di trascrizione C/EBP (CAAT Enhancer Binding Proteins) è stata già attribuita una funzione nel contesto β cellulare a C/EBP β [102], C/EBP δ [105] e C/EBP ξ [103].

Prima del nostro lavoro sul fattore di trascrizione C/EBP α non erano note evidenze sperimentali a supporto di un suo coinvolgimento nella fisiologia β cellulare, né nella risposta allo stimolo proapoptotico mediato dalle citochine proinfiammatorie. Solo di recente, Ren e coll. [200] hanno dimostrato che C/EBP α controlla l'espressione del gene *FTO* (*fat mass and obesity associated*), altamente espresso nel cervello (ipotalamo) e nel pancreas e localizzato da studi GWAS in una regione di suscettibilità al T2DM. La significativa protezione dall'apoptosi indotta dalle citochine, osservata nel nostro studio in β cellule pancreatiche trasfettate con siRNA specifici per *Cebpa*, suggerisce fortemente che la sovraespressione di *Cebpa* contribuisca all'induzione di *pathways* proapoptotiche. *Cebpa* svolgerebbe il ruolo descritto inducendo l'espressione di due *targets* trascrizionali con funzione proapoptotica: *Arl6ip5* e *Tnfrsf10b*; l'espressione di questi due geni correla positivamente con quella di *Cebpa* ed il loro *knockdown* funzionale riduce significativamente l'apoptosi delle β TC1 trattate con citochine.

ARL6IP5, conosciuta anche come JWA, è una proteina citoscheletrica identificata per la prima volta in cellule dell'epitelio bronchiale e tracheale. Diversi studi hanno dimostrato che ARL6IP5 è coinvolta in diverse funzioni biologiche, quali apoptosi [111], proliferazione cellulare, differenziamento e migrazione. In modelli tumorali ARL6IP5 si comporta da oncosoppressore [201, 202] ed una sua disregolazione è associata alla metastatizzazione tumorale [203, 204]. Wu YY e coll. [205] hanno recentemente caratterizzato il ruolo proapoptotico di ARL6IP5 in un modello di carcinoma pancreatico: come sistema modello è stata utilizzata la linea tumorale PANC-1 (cellule epiteliali duttali). In questo sistema è stato osservato che la sottoespressione di ARL6IP5 mediata da siRNA specifici determina un aumento della proliferazione cellulare, una diminuzione dell'espressione proteica della molecola proapoptotica BAX e l'aumento dell'espressione della proteina antiapoptotica BCL-2; questi eventi sono spiegati con la depressione nell'attivazione della via delle MAPK dopo lo

spegnimento di ARL6IP5. Questi dati indicano quindi che ARL6IP5 in cellule della linea PANC-1 regola proliferazione, apoptosi, invasione e migrazione agendo sulla *pathway* delle MAPK. Riferendoci al recente lavoro di Wu YY e coll., il ruolo di AR6IP5 nell'apoptosi delle β cellule pancreatiche trattate con citochine potrebbe spiegarsi anche con l'attivazione della famiglia delle MAPK, già note svolgere in questo tipo cellulare una importante funzione di mediatori nel processo di morte cellulare programmata. Il controllo della trascrizione di *Arl6ip5* da parte di CEBPA è stato già descritto in studi condotti su fibroblasti murini ed adipociti umani [111, 206]; le nostre analisi *in silico* hanno rivelato la presenza di due TFBS (*Transcription Factor Binding Sites*) adiacenti per NFkB1 e CEBPA all'interno del sito promotore predetto di *Arl6ip5*: questi dati suggeriscono che il controllo dell'espressione di questo gene possa essere mediata dalla cooperazione di questi due fattori di trascrizione; la cooperazione tra NF- κ B e C/EBP α nell'espressione genica è stata validata nell'induzione della trascrizione di diversi mediatori dell'infiammazione [207]. TNFRSF10B appartiene alla superfamiglia delle proteine *Tumor Necrosis Factor* (TNF), composta da 19 ligandi e 29 recettori, che svolge ruoli altamente diversificati, e talvolta contrapposti, negli organismi. Tuttavia, tutti i membri della superfamiglia TNF, senza eccezioni, esibiscono attività proinfiammatoria, in parte attraverso l'azione del fattore di trascrizione a valle NF- κ B. Il primo membro della famiglia ad essere identificato è stata la citochina proinfiammatoria TNF α , il cui ruolo proapoptotico nella patogenesi del Diabete Mellito, in particolare nel Diabete mellito di tipo 1 (T1DM), è stato ben caratterizzato. Insieme al TNF α un altro membro della superfamiglia denominato TRAIL (*Tumor necrosis factor alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) è stato identificato come mediatore importante nella patogenesi del Diabete Mellito. TRAIL è una proteina di 40kDa presente sia in forma solubile che come proteina transmembrana di tipo 2; gli effetti biologici indotti dalla forma solubile di TRAIL sono mediati dalle interazioni con specifici recettori di membrana (*TRAIL receptors*). Diversi studi hanno sottolineato una profonda complessità di espressione e di funzioni per i recettori della famiglia TRAIL: dei diversi membri, solo TRAIL-R1 (DR4) e TRAIL-R2 (DR5 o TNFRSF10B) sembrano trasdurre segnali proapoptotici a seguito del legame di TRAIL, mentre TRAIL-3 (DcR1) e TRAIL-R4 (DcR2), così come OPG (*osteoprotegerin*), mancando del dominio di morte intracitoplasmatico (*Death Domain*) sono incapaci di innescare la via estrinseca dell'apoptosi. Il *pathway* di TRAIL può indurre apoptosi in un ampio *range* di tipi cellulari come cellule tumorali, epatociti, cellule nervose ed isole del Langerhans isolate [208]. In cellule stellate epatiche è stato dimostrato che la sovraespressione di C/EBP α mediante trasfezione di un vettore adenovirale (Ad-C/EBP α) induce apoptosi in modo dose- e tempo-dipendente a seguito della sovraespressione di effettori dell'apoptosi come Fas, FasL, TNFRSF10B (DR5) e TRAIL [113]. Anche nelle cellule β pancreatiche è stato evidenziato il ruolo proapoptotico del fattore TRAIL. In particolare, è stato dimostrato che tutti i recettori per TRAIL (-R1,-R2,-R3 ed R4) sono espressi nelle isole del Langerhans e nelle linee

cellulari β pancreatiche CM e HP62; in questi sistemi modello TRAIL esercita un ruolo citotossico e proapoptotico superiore rispetto a quello di altre citochine proinfiammatorie come FasL, TNF α ed IFN γ [209]. Ou e coll. hanno trattato la linea CM con un anticorpo anti-R2 evidenziando una forte riduzione della citotossicità di TRAIL: questa evidenza sperimentale sottolinea il ruolo cruciale della coppia TRAIL/TRAIL-R2 (TNFRSF10B) nell'attivazione del programma apoptotico. I vari meccanismi proposti per l'attivazione del programma apoptotico da parte di TRAIL comprendono sia una via FADD-dipendente che una FADD-indipendente, in cui TRAIL attiva in maniera diretta la Caspasi-3. In aggiunta a quanto descritto, TRAIL è stata dimostrata essere espressa sulla superficie di linfociti T citotossici (CTL) CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ da pazienti diabetici [209]. Nonostante quanto detto l'azione proapoptotica diretta della *pathway* di TRAIL nel sistema delle cellule β pancreatiche rimane ad oggi abbastanza controversa [210] ed in particolare, si tende a considerare TRAIL più un regolatore della funzione immunitaria che un effettore dell'apoptosi β cellulare nel Diabete mellito di tipo 1 [211]. Il rilevante ruolo biologico esercitato da *Cebpa* e dai suoi *targets* trascrizionali nell'apoptosi delle β cellule esposte a citochine è stato confermato anche dall'analisi di centralità del *network* di interazione costituito da tutti i membri noti essere coinvolti nella risposta β cellulare alle citochine; essa ha rivelato come *hub nodes* le proteine ARL6IP5, CEBPA, TNFRSF10B, TRAF2 e UBC. Anche *Traf2* ed *Ubc* sono risultati sovraespressi nelle β cellule trattate con citochine (Ref. [2] per *Traf2*; Ref. [30] per *Ubc*). L'espressione cellulo-specifica esibita da *Cebpa* ed il suo coinvolgimento nello sviluppo e differenziamento fanno di questo fattore di trascrizione una possibile "molecola ponte" tra i fenomeni di morte cellulare ed il de-differenziamento caratterizzanti la patogenesi del Diabete Mellito.

CONCLUSIONI

Il Diabete Mellito è una patologia complessa il cui esordio dipende dalle interazioni tra un gran numero di geni con funzione protettiva o predisponente e fattori ambientali multipli non ancora pienamente caratterizzati. Il severo attacco autoimmune a carico della β cellula pancreatica è il segno distintivo del T1DM e determina la selettiva distruzione della popolazione β cellulare per apoptosi (ed altri tipi di morte cellulare) [212] o la sua disfunzione per fenomeni di de-differenziamento. La patogenesi del T2DM sembra avere alcuni aspetti biomolecolari in comune con quella del T1DM, anche se sembra evidente che esistono differenze concernenti altri aspetti. La comprensione dei meccanismi molecolari alla base di questi processi è necessaria per lo sviluppo di strumenti diagnostici e terapeutici atti a prevenire l'esordio ed arrestare la progressione del DM che ha ormai raggiunto proporzioni epidemiche. Un ruolo chiave sembra essere svolto dal *background* genetico del paziente in quanto responsabile dell'eterogeneità delle *pathways* molecolari che convergono nel danno β cellulare. La riclassificazione della malattia sulla base delle caratteristiche genetiche degli individui affetti porterà ad un miglioramento delle strategie diagnostiche, prognostiche e terapeutiche. L'analisi delle basi molecolari del DM non può inoltre prescindere dalla caratterizzazione dei profili di espressione genica dei tipi cellulari componenti il microorgano *isola del Langerhans* per (i) la loro diretta influenza sulla fisiologia β cellulare; (ii) la capacità di transdifferenziare nel fenotipo produttore insulina in risposta al danno β cellulare; (iii) la possibilità individuare *pathways* apoptotiche β -specifiche, su cui poter intervenire in maniera mirata.

In questo studio, il confronto dell' "assetto molecolare" di α e β cellule pancreatiche in condizioni fisiologiche (*steady state*) e dopo trattamento con citochine ci ha permesso di (i) caratterizzare nuovi marcatori β cellulari di disfunzione e (ii) descrivere alcuni eventi molecolari responsabili della "resistenza" α -cellulare e della "suscettibilità" β -cellulare all'apoptosi citochino-mediata a livello di *pathways* coinvolgenti sia i microRNA, che geni codificanti proteine. La conferma finale di questi risultati in isole pancreatiche umane così come in cellule α e β purificate, una più ampia analisi dei fenomeni descritti e lo studio del *cross-talk* molecolare tra i due tipi cellulari potrebbero permettere di sviluppare efficaci strumenti diagnostici e terapeutici.

In base a quanto detto, è chiaro che lo studio delle basi molecolari del Diabete Mellito debba necessariamente essere di tipo sistemico ed avvalersi delle più moderne tecnologie di indagine *High-Througput* (HT), in grado di fornire il quadro del genoma e dei cambiamenti dell'espressione genica a livello di trascrittoma e proteoma in condizioni basali e nel contesto patologico. Dal crocevia costituito dalla Biomedicina passa il futuro della ricerca scientifica e della lotta alle malattie complesse come il Diabete Mellito.

BIBLIOGRAFIA

1. Barbagallo D, Piro S, Condorelli AG et al. **miR-296-3p, miR-298-5p and their downstream networks are causally involved in the higher resistance of mammalian pancreatic α cells to cytokine-induced apoptosis as compared to β cells.** *BMC Genomics*, 2013.
2. Barbagallo D, Condorelli AG, Piro S et al. **CEBPA exerts a specific and biologically important proapoptotic role in pancreatic β cells through its downstream network targets.** *Mol Biol Cell*, 2014.
3. Scharfmann R, Rachdi L, Ravassard P. **Concise review: in search of unlimited sources of functional human pancreatic beta cells.** *Stem Cells Transl Med*, 2013.
4. Jain R, Lammert E. **Cell-cell interactions in the endocrine pancreas.** *Diabetes Obes Metab*, 2009.
5. 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.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006.
6. Dunning BE, Foley JE, Ahrén B. **Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1.** *Diabetes*, 2005.
7. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. **Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains.** *Endocrin Rev*, 2007.
8. Quoix N, Cheng-Xue R, Guiot Y, Herrera PL, Henquin JC, Gilon P. **The GluCre-ROSA26EYFP mouse: a new model for easy identification of living pancreatic alpha-cells.** *FEBS Lett*, 2007.
9. Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal A. **Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes.** *J Endocrinol*, 2008
10. Hughes DS, Narendran P. **Alpha cell function in type 1 diabetes.** *Br J Diabetes Vasc Dis*, 2014.
11. Rondas D, Bugliani M, D'Hertog W et al. **Glucagon-Like Peptide-1 Protects Human Islets against Cytokine-Mediated β -Cell Dysfunction and Death: A Proteomic Study of the Pathways Involved.** *J Proteome Res*, 2013.
12. Habener JF, Stanojevic V. **Alpha cell role in beta cell generation and regeneration.** *Islets*, 2012.
13. Collombat P, Xu X, Ravassard P et al. **The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells.** *Cell*, 2009.
14. Thorel F, Népote V, Avril I et al. **Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss.** *Nature*, 2010.
15. Wagner BK. **Gran challenge commentary: Chemical transdifferentiation and regenerative medicine.** *Nat Chem Biol*, 2010.
16. Bramswig NC, Everett LJ, Schug J et al. **Epigenomic plasticity enables human pancreatic α to β cell reprogramming.** *J Clin Invest*, 2013.
17. Moss LG. **Creating new β cells: cellular transmutation by genomic alchemy.** *J Clin Invest*, 2013.

18. Fomina-Yadlin D, Kubicek S, Walpita D et al. **Small-molecule inducers of insulin expression in pancreatic alpha-cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010.
19. Fomina-Yadlin D, Kubicek S, Vetere A, He KH, Schreiber SL, Wagner BK. **GW8510 increases insulin expression in pancreatic alpha cells through activation of p53 transcriptional activity.** *PLoS One*, 2012.
20. Choudhary A, Hu He K, Mertins P et al. **Quantitative-proteomic comparison of alpha and Beta cells to uncover novel targets for lineage reprogramming.** *PLoS One*, 2014.
21. Kubicek S, Gilbert JC, Fomina-Yadlin D et al. **Chromatin-targeting small molecules cause class-specific transcriptional changes in pancreatic endocrine cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012.
22. Dorrell C, Schug J, Lin CF et al. **Transcriptomes of the major human pancreatic cell types.** *Diabetologia*, 2011.
23. Waguri M, Hanafusa T, Itoh N et al. **Histopathologic study of the pancreas shows a characteristic lymphocytic infiltration in Japanese patients with IDDM.** *Endocr J*, 1997.
24. Unger RH, Orci L. **Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010.
25. Hamaguchi K, Leiter EH. **Comparison of cytokine effects on mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines.** *Diabetes*, 1990.
26. Iwahashi H, Hanafusa T, Eguchi Y et al. **Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2.** *Diabetologia*, 1996.
27. Blodgett DM, Cura AJ, Harlan DM. **The pancreatic β -cell transcriptome and integrated-omics.** *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2014.
28. Kutlu B, Burdick D, Baxter D et al. **Detailed transcriptome atlas of the pancreatic beta cell.** *BMC Med Genomics*, 2009.
29. Nica AC, Ongen H, Irminger JC et al. **Cell-type, allelic, and genetic signatures in the human pancreatic beta cell transcriptome.** *Genome Res*, 2013.
30. Ortis F, Naamane N, Flamez D et al. **Cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary beta-cells.** *Diabetes*, 2010.
31. Eizirik DL, Sammeth M, Bouckennooghe T et al. **The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines.** *PLoS Genet*, 2012.
32. Ku GM, Kim H, Vaughn IW et al. **Research resource: RNA-Seq reveals unique features of the pancreatic β -cell transcriptome.** *Mol Endocrinol*, 2012.
33. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. **Central nervous system control of food intake.** *Nature*, 2000.
34. Todd JA, Walker NM, Cooper JD et al. **Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes.** *Nat Genet*, 2007.
35. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P et al. **Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes.** *Nat Genet*, 2009.
36. Klein D, Misawa R, Bravo-Egana V et al. **MicroRNA expression in alpha and beta cells of human pancreatic islets.** *PLoS One*, 2013.
37. Guttman M, Amit I, Garber M et al. **Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals.** *Nature*, 2009.
38. Djebali S, Davis CA, Merkel A et al. **Landscape of transcription in human cells.** *Nature*, 2012.

39. Moran I, Akerman I, van de Bunt M et al. **Human β cell transcriptome analysis uncovers lncRNAs that are tissue-specific, dynamically regulated, and abnormally expressed in type 2 diabetes.** *Cell Metab*, 2012.
40. Esguerra JL, Eliasson L. **Functional implications of long non-coding RNAs in the pancreatic islets of Langerhans.** *Front Genet*, 2014.
41. Pullen TJ, Rutter GA. **Roles of lncRNAs in pancreatic beta cell identity and diabetes susceptibility.** *Front Genet*, 2014.
42. Kameswaran V, Kaestner KH. **The Missing lnc(RNA) between the pancreatic β -cell and diabetes.** *Front Genet*, 2014.
43. Ahmed M, Forsberg J, Bergsten P. **Protein profiling of human pancreatic islets by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.** *J Proteome Res*, 2005.
44. Nyblom HK, Thorn K, Ahmed M, Bergsten P. **Mitochondrial protein patterns correlating with impaired insulin secretion from INS-1E cells exposed to elevated glucose concentrations.** *Proteomics*, 2006.
45. Coppola A, Tomasello L, Pizzolanti G et al. **In vitro phenotypic, genomic and proteomic characterization of a cytokine-resistant murine β -TC3 cell line.** *PLoS One*, 2012.
46. Lindskog C, Korsgren O, Pontén F, Eriksson JW, Johansson L, Danielsson A. **Novel pancreatic beta cell-specific proteins: antibody-based proteomics for identification of new biomarker candidates.** *J Proteomics*, 2012.
47. Massa O, Alessio M, Russo L et al. **Serological Proteome Analysis (SERPA) as a tool for the identification of new candidate autoantigens in type 1 diabetes.** *J Proteomics*, 2013.
48. Stützer I, Esterházy D, Stoffel M. **The pancreatic beta cell surface proteome.** *Diabetologia*, 2012.
49. Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA. **Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice.** *Diabetes*, 2005.
50. Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA. **Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors.** *Dev Cell*, 2007.
51. Meier JJ, Butler AE, Saisho Y et al. **Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans.** *Diabetes*, 2008.
52. Cnop M, Hughes SJ, Igoillo-Esteve M et al. **The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modelling of lipofuscin accumulation.** *Diabetes*, 2010.
53. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL et al. **p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential.** *Nature*, 2006.
54. Kulkarni RN, Mizrahi EB, Ocana AG, Stewart AF. **Human β -cell proliferation and intracellular signalling: driving in the dark without a road map.** *Diabetes*, 2012.
55. Fiaschi-Taesch N, Bigatel TA, Sicari B et al. **Survey of the human pancreatic beta-cell G1/S proteome reveals a potential therapeutic role for cdk-6 and cyclin D1 in enhancing human beta-cell replication and function in vivo.** *Diabetes*, 2009.
56. Fiaschi-Taesch NM, Kleinberger JW, Salim FG et al. **Human pancreatic β -cell G1/S molecule cell cycle atlas.** *Diabetes*, 2013.
57. Fiaschi-Taesch NM, Kleinberger JW, Salim FG et al. **Cytoplasmic-nuclear trafficking of G1/S cell cycle molecules and adult human β -cell replication: a revised model of human β -cell G1/S control.** *Diabetes*, 2013.
58. Ammendrup A, Maillard A, Nielsen K et al. **The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic beta-cells.** *Diabetes*, 2000.

59. Lenzen S. **Oxidative stress: the vulnerable beta-cell.** *Biochem Soc Trans*, 2008.
60. Karlsten AE, Ronn SG, Lindberg K et al. **Suppressor of cytokine signalling 3 SOCS-3 protects beta-cells against interleukin-1 beta - and interferon-gamma-mediated toxicity.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001.
61. **IDF Diabetes Atlas, 6th ed.** International Diabetes Federation, 2013.
62. Noble JA, Valdes AM. **Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes.** *Curr Diab Rep*, 2011.
63. Lambert AP, Gillespie KM, Thomson G et al. **Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom.** *J Clin Endocrinol Metab*, 2004.
64. Todd JA. **Etiology of type 1 diabetes.** *Immunity*, 2010.
65. Santin I, Eizirik DL. **Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and β -cell apoptosis.** *Diabetes Obes Metab*, 2013.
66. Stankov K, Benc D, Draskovic D. **Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1.** *Pediatrics*, 2013.
67. Rakyan VK, Beyan H, Down TA et al. **Identification of type 1 diabetes-associated DNA methylation variable positions that precede disease diagnosis.** *PLoS Genet*, 2011.
68. Miao F, Chen Z, Zhang L et al. **Profiles of epigenetic histone post-translational modifications at type 1 diabetes susceptible genes.** *J Biol Chem*, 2012.
69. Roep BO, Peakman M. **Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity.** *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012.
70. Szablewski L. **Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis.** *Int Immunopharmacol*, 2014.
71. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. **The role of inflammation in insulitis and beta-cell loss in type 1 diabetes.** *Nat Rev Endocrinol*, 2009.
72. Randow F, MacMicking JD, James LC. **Cellular Self-Defense: How Cell-Autonomous Immunity Protects Against Pathogens.** *Science*, 2013.
73. Grieco FA, Sebastiani G, Spagnuolo I, Patti A, Dotta F. **Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: how viral infections modulate beta cell function.** *Clin Exp Immunol*, 2012.
74. Ylipaasto P, Kutlu B, Rasilainen S et al. **Global profiling of coxsackievirus- and cytokine-induced gene expression in human pancreatic islets.** *Diabetologia*, 2005.
75. Velloso LA, Eizirik DL, Cnop M. **Type 2 diabetes mellitus--an autoimmune disease?** *Nat Rev Endocrinol*, 2013.
76. Ellingsgaard H, Ehses JA, Hammar EB et al. **Interleukin-6 regulates pancreatic α -cell mass expansion.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008.
77. Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nielsen JH, Bendixen G, Nerup J. **Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans.** *Allergy*, 1985.
78. Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Dinarello CA, Svenson M, Nielsen JH. **Affinity-purified human interleukin 1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans.** *Diabetologia*, 1986.
79. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. **A choice of death-the signal transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis.** *Diabetologia*, 2001.
80. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. **Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities.** *Diabetes*, 2005.
81. Gurzov EN, Eizirik DL. **Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of β -cell death and dysfunction.** *Trends Cell Biol*, 2011.

82. Wang C, Guan Y, Yang J. **Cytokines in the Progression of Pancreatic β -Cell Dysfunction.** *Int J Endocrinol*, 2010.
83. Donath MY, Størling J, Berchtold LA, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. **Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation.** *Endocr Rev*, 2008.
84. Ortis F, Pirot P, Naamane N et al. **Induction of nuclear factor-kappaB and its downstream genes by TNF-alpha and IL-1beta has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells.** *Diabetologia*, 2008.
85. Devin A, Lin Y, Liu ZG. **The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor- induced activation of mitogen-activated protein kinases.** *EMBO Rep*, 2003.
86. Moore F, Naamane N, Colli ML et al. **STAT1 is a master regulator of pancreatic {beta}-cell apoptosis and islet inflammation.** *J Biol Chem*, 2011.
87. Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y et al. **A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells.** *J Biol Chem*, 2001.
88. Heimberg H, Heremans Y, Jobin C et al. **Inhibition of cytokine-induced NF-kB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kB super-repressor prevents β -cell apoptosis.** *Diabetes*, 2001.
89. Giannoukakis N, Rudert WA, Trucco M, Robbins PD. **Protection of human islets from the effects of interleukin-1b by adenoviral gene transfer of an Ikb repressor.** *J Biol Chem*, 2000.
90. Flodström M, Welsh N, Eizirik DL. **Cytokines activate the nuclear factor kappa B (NF-kappa B) and induce nitric oxide production in human pancreatic islets.** *FEBS Lett*, 1996.
91. Vincenz L, Szegezdi E, Jäger R, Holohan C, O'Brien T, Samali A. **Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments (Chapter 12).** ISBN 978-953-307-756-7.
92. Fornoni A, Pileggi A, Molano RD et al. **Inhibition of c-jun N terminal kinase (JNK) improves functional beta cell mass in human islets and leads to AKT and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) phosphorylation.** *Diabetologia*, 2008.
93. Gurzov EN, Ortis F, Cunha DA et al. **Signaling by IL-1beta+IFN-gamma and ER stress converge on DP5/Hrk activation: a novel mechanism for pancreatic beta-cell apoptosis.** *Cell Death Differ*, 2009.
94. Allagnat F, Cunha D, Moore F, Vanderwinden JM, Eizirik DL, Cardozo AK. **Mcl-1 downregulation by pro-inflammatory cytokines and palmitate is an early event contributing to β -cell apoptosis.** *Cell Death Differ*, 2011.
95. Wang M, Crager M, Pugazhenti S. **Modulation of apoptosis pathways by oxidative stress and autophagy in β cells.** *Exp Diabetes Res*, 2012.
96. Størling J, Binzer J, Andersson AK et al. **Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt.** *Diabetologia*, 2005.
97. Grunnet LG, Aikin R, Tonnesen MF et al. **Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells.** *Diabetes*, 2009.
98. Gurzov EN, Germano CM, Cunha DA et al. **p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) activation contributes to pancreatic beta-cell apoptosis induced by proinflammatory cytokines and endoplasmic reticulum stress.** *J Biol Chem*, 2010.
99. Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE. **The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation.** *Cytokine*, 2011.

100. Cassel TN, Nord M. **C/EBP transcription factors in the lung epithelium.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003.
101. Lu M, Seufert J, Habeneri JF. **Pancreatic β -Cell-specific Repression of Insulin Gene Transcription by CCAAT/Enhancer-binding Protein β .** *J Biol Chem*, 1997.
102. Matsuda T, Kido Y, Asahara S et al. **Ablation of C/EBP β alleviates ER stress and pancreatic β cell failure through the GRP78 chaperone in mice.** *J Clin Invest*, 2010.
103. Allagnat F, Fukaya M, Nogueira TC et al. **C/EBP homologous protein contributes to cytokine-induced pro-inflammatory responses and apoptosis in β -cells.** *Cell Death Differ*, 2012.
104. Darville ML, Eizirik DL. **Cytokine Induction of Fas Gene Expression in Insulin-Producing Cells Requires the Transcription Factors NF- κ B and C/EBP.** *Diabetes*, 2001.
105. Moore F, Santin I, Nogueira TC et al. **The transcription factor C/EBP delta has anti-apoptotic and anti-inflammatory roles in pancreatic β cells.** *Plos One*, 2012.
106. Jakobsen JS, Waage J, Rapin N, Bisgaard HC, Larsen FS, Porse BT. **Temporal mapping of CEBPA and CEBPB binding during liver regeneration reveals dynamic occupancy and specific regulatory codes for homeostatic and cell cycle gene batteries.** *Genome Res*, 2013.
107. Umek RM, Friedman AD, McKnight SL. **CCAAT enhancer binding protein: a component of a differentiation switch.** *Science*, 1991.
108. Truong BT, Lee YJ, Lodie TA et al. **CCAAT/Enhancer binding proteins repress the leukemic phenotype of acute myeloid leukemia.** *Blood*, 2003.
109. Johnson PF. **Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors.** *J Cell Sci*, 2005.
110. Gery S, Tanosaki S, Bose S, Bose N, Vadgama J, Koeffler HP. **Down-regulation and growth inhibitory role of C/EBP α in breast cancer.** *Clin Cancer Res*, 2005.
111. Wang GL, Shi X, Salisbury E, Timchenko NA. **Regulation of apoptotic and growth inhibitory activities of C/EBP α in different cell lines.** *Exp Cell Res*, 2008.
112. Pal P, Lochab S, Kanaujiya J, Sanyal S, Trivedi AK. **Ectopic expression of hC/EBPs in breast tumor cells induces apoptosis.** *Mol Cell Biochem*, 2010.
113. Wang X, Huang G, Mei S, Qian J, Ji J, Zhang J. **Over-expression of C/EBP- α induces apoptosis in cultured rat hepatic stellate cells depending on p53 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ .** *Biochem Biophys Res Commun*, 2009.
114. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J et al. **A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion.** *Nature*, 2004.
115. Poy MN, Hausser J, Trajkovski M et al. **miR-375 maintains normal pancreatic α - and β -cell mass.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009.
116. Baroukh N, Ravier MA, Loder MK et al. **MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signalling in pancreatic β -cell lines.** *The Journal of Biological Chemistry*, 2007.
117. Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R. **MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells.** *J Biol Chem*, 2006.
118. Roggli E, Britan A, Gattesco S et al. **Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic β -cells.** *Diabetes*, 2010.

119. Lovis P, Roggli E, Laybutt DR et al. **Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction.** *Diabetes*, 2008.
120. Chen H, Lan HY, Roukos DH, Cho WC. **Application of microRNAs in diabetes mellitus.** *J Endocrinol*, 2014.
121. El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. **miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells.** *Diabetes*, 2008.
122. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J et al. **MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity.** *Nature*, 2011.
123. Farr RJ, Joglekar MV, Taylor CJ, Hardikar AA. **Circulating non-coding RNAs as biomarkers of beta cell death in diabetes.** *Pediatr Endocrinol Rev*, 2013.
124. Guay C, Regazzi R. **Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus.** *Nat Rev Endocrinol*, 2013.
125. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I et al. **Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes.** *Circ Res*, 2010.
126. Lynn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, McManus MT, Harfe BD, German MS. **MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse.** *Diabetes*, 2007.
127. Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. **Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development.** *PLoS Biol*, 2007.
128. Li X. **MiR-375, a microRNA related to diabetes.** *Gene*, 2014.
129. Seymour PA, Sander M. **Historical perspective: beginnings of the beta-cell: current perspectives in beta-cell development.** *Diabetes*, 2011.
130. Habener JF, Stanojevic V. **Alpha cells come of age.** *Trends Endocrinol Metab*, 2013.
131. Burke ZD, Shen CN, Ralphs KL, Tosh D. **Characterization of liver function in transdifferentiated hepatocytes.** *J Cell Physiol*, 2006.
132. Ber I, Shternhall K, Perl S et al. **Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation.** *J Biol Chem*, 2003.
133. Davis FP, Eddy SR. **Transcription factors that convert adult cell identity are differentially polycomb repressed.** *Plos One*, 2013.
134. Nozaki Ji, Kubota H, Yoshida H et al. **The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic beta cells.** *Genes Cells*, 2004.
135. Kaspi H, Pasvolsky R, Hornstein E. **Could microRNAs contribute to the maintenance of β cell identity?** *Trends Endocrinol Metabol*, 2014.
136. Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. **Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure.** *Cell*, 2012.
137. Guo S, Dai C, Guo M et al. **Inactivation of specific β cell transcription factors in type 2 diabetes.** *J Clin Invest*, 2013.
138. Weir GC, Aguayo-Mazzucato C, Bonne-Weir S. **β -cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it?** *Islets*, 2013.
139. Schuit F, Van Lommel L, Granvik M et al. **β -cell-specific gene repression: a mechanism to protect against inappropriate or maladjusted insulin secretion?** *Diabetes*, 2012.
140. Quintens R, Hendrickx N, Lemaire K, Schuit F. **Why expression of some genes is disallowed in beta-cells.** *Biochem Soc Trans*, 2008.
141. Sekine N, Cirulli V, Regazzi R et al. **Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing.** *J Biol Chem*, 1994.

142. Pullen TJ, Khan AM, Barton G, Butcher SA, Sun G, Rutter GA. **Identification of genes selectively disallowed in the pancreatic islet.** *Islets*, 2010.
143. Thorrez L, Laudadio I, Van Deun K et al. **Tissue-specific disallowance of housekeeping genes: the other face of cell differentiation.** *Genome Res*, 2011.
144. Marselli L, Thorne J, Dahiya S et al. **Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes.** *PLoS One*, 2010.
145. Pullen TJ, Rutter GA. **When less is more: the forbidden fruits of gene repression in the adult β -cell.** *Diabetes Obes Metab*, 2013.
146. Pullen TJ, da Silva Xavier G, Kelsey G, Rutter GA. **miR-29a and miR-29b contribute to pancreatic {beta}-cell specific silencing of Monocarboxylate Transporter 1 (Mct1/slc16a1).** *Mol Cell Biol*, 2011.
147. Yi P, Park JS, Melton DA. **Betatrophin: a hormone that controls pancreatic β cell proliferation.** *Cell*, 2013.
148. Chen H, Gu X, Su IH et al. **Polycomb protein Ezh2 regulates pancreatic beta-cell Ink4a/Arf expression and regeneration in diabetes mellitus.** *Genes Dev*, 2009.
149. Vetere A, Choudhary A, Burns SM, Wagner BK. **Targeting the pancreatic β -cell to treat diabetes.** *Nat Rev Drug Discov*, 2014.
150. Shen J, Cheng Y, Han Q, Mu Y, Han W. **Generating insulin-producing cells for diabetic therapy: existing strategies and new development.** *Ageing Res Rev*, 2013.
151. Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M et al. **Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro.** *Cell*, 2014.
152. Pagliuca FW, Melton DA. **How to make a functional β -cell.** *Development*, 2013.
153. Skelin M, Rupnik M, Cencic A. **Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research.** *ALTEX*, 2010.
154. Efrat S. **Genetically engineered pancreatic beta-cell lines for cell therapy of diabetes.** *Ann N Y Acad Sci*, 1999.
155. 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 tumor.** *Diabetes*, 1990.
156. Wang H, Maechler P, Ritz-Laser B et al. **Pdx1 level defines pancreatic gene expression pattern and cell lineage differentiation.** *J Biol Chem*, 2001.
157. Hansen JB, Tonnesen MF, Madsen AN et al. **Divalent metal transporter 1 regulates iron-mediated ROS and pancreatic β cell fate in response to cytokines.** *Cell Metab*, 2012.
158. Kim SM, Lee EJ, Jung HS et al. **Co-Culture of α TC-6 Cells and β TC-1 Cells: Morphology and Function.** *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2014.
159. 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.
160. Di Pietro C, Ragusa M, Barbagallo D et al. **The apoptotic machinery as a biological complex system: analysis of its omics and evolution, identification of candidate genes for fourteen major types of cancer, and experimental validation in CML and neuroblastoma.** *BMC Med Genomics*, 2009.
161. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol*, 2002.
162. Ragusa M, Statello L, Maugeri M et al. **Specific alterations of the microRNA transcriptome and global network structure in colorectal cancer after treatment with MAPK/ERK inhibitors.** *J Mol Med (Berl)*, 2012.

163. Hsu SD, Lin FM, Wu WY et al. **miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions.** *Nucleic Acids Res*, 2011.
164. Yang JH, Li JH, Shao P, Zhou H, Chen YQ, Qu LH. **starBase: a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data.** *Nucleic Acids Res*, 2011.
165. Cartharius K, Frech K, Grote K et al. **MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites.** *Bioinformatics*, 2005.
166. Adler P, Kolde R, Kull M et al. **Mining for coexpression across hundreds of datasets using novel rank aggregation and visualization methods.** *Genome Biol*, 2009.
167. Gao J, Ade AS, Tarcea VG et al. **Integrating and annotating the interactome using the MiMI plugin for cytoscape.** *Bioinformatics*, 2009.
168. Shannon P, Markiel A, Ozier O et al. **Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.** *Genome Res*, 2003.
169. Maere S, Heymans K, Kuiper M. **BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks.** *Bioinformatics*, 2005.
170. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. **Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.** *Nucleic Acids Res*, 2009.
171. Zhang HM, Chen H, Liu W et al. **AnimalTFDB: a comprehensive animal transcription factor database.** *Nucleic Acids Res*, 2012.
172. Lee C, Huang CH. **LASAGNA: a novel algorithm for transcription factor binding site alignment.** *BMC Bioinformatics*, 2013.
173. Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. **ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes.** *Nucleic Acids Res*, 2004.
174. Cole SW, Yan W, Galic Z, Arevalo J, Zack JA. **Expression-based monitoring of transcription factor activity: the TELiS database.** *Bioinformatics*, 2005.
175. Lynn DJ, Winsor GL, Chan C et al. **InnateDB: facilitating systems-level analyses of the mammalian innate immune response.** *Mol Syst Biol*, 2008.
176. Lin CY, Chin CH, Wu HH, Chen SH, Ho CW, Ko MT. **Hubba: hub objects analyzer--a framework of interactome hubs identification for network biology.** *Nucleic Acids Res*, 2008.
177. Smyth GK. **Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments.** *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004.
178. Jeanmougin M, de Reynies A, Marisa L, Paccard C, Nuel G, Guedj M. **Should we abandon the t-test in the analysis of gene expression microarray data: a comparison of variance modeling strategies.** *PLoS One*, 2010.
179. Eppig JT, Blake JA, Bult CJ et al. **The Mouse Genome Database (MGD): comprehensive resource for genetics and genomics of the laboratory mouse.** *Nucleic Acids Res*, 2012.
180. Leone V, D'Angelo D, Ferraro A et al. **A TSH-CREB1-microRNA loop is required for thyroid cell growth.** *Mol Endocrinol*, 2011.
181. Mor E, Cabilly Y, Goldshmit Y et al. **Species-specific microRNA roles elucidated following astrocyte activation.** *Nucleic Acids Res*, 2011.
182. Pan YZ, Gao W, Yu AM. **MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting.** *Drug Metab Dispos*, 2009.

183. Robson JE, Eaton SA, Underhill P, Williams D, Peters J. **MicroRNAs 296 and 298 are imprinted and part of the GNAS/Gnas cluster and miR-296 targets IKBKE and Tmed9.** *RNA*, 2012.
184. Artner I, Le Lay J, Hang Y et al. **MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells.** *Diabetes*, 2006.
185. Baui Y, Liao H, Liu T. **MiR-296-3p regulates cell growth and multi-drug resistance of human glioblastoma by targeting ether-à-go-go (EAG1).** *Eur J Cancer*, 2013.
186. Liu X, Chen Q, Yan J et al. **MiRNA-296-3p-ICAM-1 axis promotes metastasis of prostate cancer by possible enhancing survival of natural killer cell-resistant circulating tumour cells.** *Cell Death Dis*, 2013.
187. Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. **Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription.** *RNA*, 2009.
188. Rosero S, Bravo-Egana V, Jiang Z et al. **MicroRNA signature of the human developing pancreas.** *BMC Genomics*, 2010.
189. Cantaluppi V, Biancone L, Figliolini F et al. **Microvesicles derived from endothelial progenitor cells enhance neoangiogenesis of human pancreatic islets.** *Cell Transplant*, 2012.
190. Figliolini F, Cantaluppi V, De Lena M et al. **Isolation, characterization and potential role in beta cell-endothelium cross-talk of extracellular vesicles released from human pancreatic islets.** *PLoS One*, 2014.
191. Boissonneault V, Plante I, Rivest S, Provost P. **MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1.** *J Biol Chem*, 2009.
192. Deng Y, Hou D, Tian M, Li W, Feng X. **β -amyloid peptide deposition and expression of related miRNAs in the cerebellum of a mouse model of Alzheimer's disease.** *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2014.
193. Bai HZ, Pollman MJ, Inishi Y, Gibbons GH. **Regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. Modulation of bad by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway.** *Circ Res*, 1999.
194. Chrysis D, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ. **Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner.** *J Neurosci*, 2001.
195. Vincent AM, Feldman EL. **Control of cell survival by IGF signalling pathways.** *Growth Horm IGF Res*, 2002.
196. White MF. **IRS proteins and the common path to diabetes.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002.
197. Lawrence MC, Naziruddin B, Levy MF, Jackson A, McGlynn K. **Calcineurin/nuclear factor of activated T cells and MAPK signalling induce TNF- α gene expression in pancreatic islet endocrine cells.** *J Biol Chem*, 2011.
198. Malka D, Vasseur S, Bödeker H et al. **Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein I activation.** *Gastroenterology*, 2000.
199. Paz-Priel I, Friedman A. **C/EBP α dysregulation in AML and ALL.** *Crit Rev Oncog*, 2011.
200. Ren W, Guo J, Jiang F et al. **CCAAT/enhancer-binding protein α is a crucial regulator of human fat mass and obesity associated gene transcription and expression.** *Biomed Res Int*, 2014.

201. Shi GZ, Yuan Y, Jiang GJ et al. **PRAF3 induces apoptosis and inhibits migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma.** *BMC Cancer*, 2012.
202. Vento MT, Zazzu V, Loffreda A et al. **Praf2 is a novel Bcl-xL/Bcl-2 interacting protein with the ability to modulate survival of cancer cells.** *PLoS One*, 2010.
203. Li CP, Zhu YJ, Chen R et al. **Functional polymorphisms of JWA gene are associated with risk of bladder cancer.** *J Toxicol Environ Health A*, 2007.
204. Wu X, Chen H, Gao Q et al. **Downregulation of JWA promotes tumor invasion and predicts poor prognosis in human hepato-cellular carcinoma.** *Mol Carcinog*, 2014.
205. Wu YY, Ma TL, Ge ZJ et al. **JWA gene regulates PANC-1 pancreatic cancer cell behaviors through MEK-ERK1/2 of the MAPK signalling pathway.** *Oncology Letters*, 2014.
206. Lo KA, Bauchmann MK, Baumann AP et al. **Genome wide profiling of H3K56 acetylation and transcription factor binding sites in human adipocytes.** *PLoS One*, 2011.
207. Wang D, Paz-Priel I, Friedman AD. **NF-kappa B p50 regulates C/EBP alpha expression and inflammatory cytokine-induced neutrophil production.** *J Immunol*, 2009.
208. Thomas F, Wu J, Contreras JL et al. **A tripartite anoikis-like mechanism causes early isolated islet apoptosis.** *Surgery*, 2001.
209. Ou D, Metzger DL, Wang X, Huang J, Pozzilli P, Tingle AJ. **TNF-related apoptosis-inducing ligand death pathway-mediated human beta-cell destruction.** *Diabetologia*, 2002.
210. Kahraman S, Dirice E, Altunbas HA, Sanlioğlu AD. **Proliferative effect of sTRAIL on mouse pancreatic beta cells.** *JOP*, 2014.
211. Vaccarezza M, Delbello G, Zauli G. **A role of the TRAIL-TRAIL receptor system in the pathogenesis of diabetes.** *Acta Biomed*, 2007.
212. Zhao Y, Scott NA, Fynch S et al. **Autoreactive T cells induce necrosis and not BCL-2-regulated or death receptor-mediated apoptosis or RIPK3-dependent necroptosis of transplanted islets in a mouse model of type 1 diabetes.** *Diabetologia*, 2014.

MATERIALE SUPPLEMENTARE

List of genes assayed in custom TLDA			
Akt1	Stat5b	Rela	Atf3
Bad	Birc2	Relb	Nos2
Bak1	Birc3	Apaf1	Ddit3
Bax	Birc5	Casp9	Bnip3l
Bbc3	Fadd	Cycs	Lrdd
Bcl2	Il1r1	Diablo	Jak2
Bcl2l1	Tnfrsf1a	Birc4	Jak3
Foxo3a	Tnfrsf10b	Dffa	Ikbkb
Bcl2l11	Tnfrsf21	Dffb	Irs2
Bcl2l13	Tnfrsf25	Casp3	Ikbkg
Bcl2l2	Ptpn13	Dedd	Tnfaip3
Bcl3	Fas	Casp8	Traf7
Bid	Chuk	Gadd45a	Nfkbib
Bik	Pycard	Trp53	Rel
Mcl1	Tax1bp1	Mdm2	Htra2
Bmf	Traf1	Dapk1	Casp12
Bnip3	Traf4	Pea15a	Dedd2
Pmaip1	Traf2	Map3k14	Mapk14
Casp2	Traf3	Mapk1	Mapk3
Cradd	Traf6	Mapk8	Mapk4
Jak1	Nfkb1	Nod1	Mapk8ip1
Stat1	Nfkb2	Cebpa	Actb
Stat3	Nfkb1a	Ern1	Hprt1
Stat5a	Gadd45b	18S	Tuba1a

Tabella Supplementare 1. Lista dei geni analizzati in TLDA. In nero sono indicati i geni precedentemente identificati come geni *core* nel programma apoptotico (*AM genes*, *Apoptotic Machinery genes*) [160]; in rosso i geni precedentemente non inclusi nella lista dei geni AM e coinvolti in *pathway* apoptotiche cellule-specifiche (da *literature mining*); in blu i geni *house-keeping*.

DE miRNA	Average fold change (α TC1-6 Cyt vs α TC1-6 Ctrl 24H)	Unadj. p-value	Adj. p-value (Benjamini-Hochberg)	Average fold change (α TC1-6 Cyt vs α TC1-6 Ctrl 48H)	Unadj. p-value	Adj. p-value (Benjamini-Hochberg)
mmu-miR-146a	8.18	7.75E-04	1.88E-01	14.9	1.37E-05	5.22E-03
mmu-miR-203	3.92	9.85E-04	1.88E-01	6.03	3.71E-04	3.53E-02
mmu-miR-298-5p	-2.19	5.13E-02	9.75E-01	-7.5	5.73E-04	4.36E-02
mmu-miR-296-3p	-4.63	1.25E-02	9.75E-01	-4.76	1.33E-03	8.48E-02
mmu-miR-125b-5p	2.53	4.02E-02	9.75E-01	2.79	7.04E-03	1.51E-01
mmu-miR-21	1.12	7.08E-01	9.75E-01	2.02	5.68E-03	1.51E-01
mmu-miR-361	-1.12	6.08E-01	9.75E-01	-2.46	3.56E-03	1.51E-01
mmu-miR-409-3p	-1.43	4.31E-01	9.75E-01	-2.23	4.57E-03	1.51E-01
mmu-miR-369-5p	-1.45	3.15E-01	9.75E-01	-2.14	2.86E-02	2.87E-01
mmu-miR-155	2.34	1.51E-01	9.75E-01	2.35	3.28E-02	3.08E-01
mmu-miR-34a	2.02	5.06E-02	9.75E-01	2.29	3.43E-02	3.11E-01
mmu-miR-134	-2.1	2.47E-01	9.75E-01	-2.02	3.94E-02	3.33E-01
mmu-miR-190	-2.58	4.31E-02	9.75E-01	-1.25	2.64E-01	6.32E-01
mmu-miR-142-3p	5.02	4.76E-02	9.75E-01	2.61	3.81E-01	6.68E-01
mmu-miR-149	-1.91	2.44E-02	9.93E-01	-3.68	1.20E-03	6.63E-02
mmu-miR-191*	-2.25	2.56E-02	9.93E-01	-3.07	1.31E-03	6.63E-02
mmu-miR-411*	-2.88	1.21E-01	9.93E-01	-3.44	5.85E-04	6.63E-02
mmu-miR-700	-2.03	6.70E-02	9.93E-01	-2.64	1.54E-03	6.63E-02
mmu-let-7a*	-1.56	1.58E-01	9.93E-01	-3.09	7.18E-03	1.31E-01
mmu-miR-130b*	-1.49	1.55E-01	9.93E-01	-2.01	7.26E-03	1.31E-01
mmu-miR-15b*	-1.36	1.76E-01	9.93E-01	-1.71	2.75E-02	3.09E-01
mmu-miR-494	-1.01	8.91E-01	9.98E-01	-2.01	1.12E-02	1.78E-01

Tabella Supplementare 2. microRNA differenzialmente espresso (DE) nelle cellule α TC1-6 dopo 24 e 48 ore di trattamento con citochine. In grassetto i microRNA significativamente DE (*adjusted p-values* < 0.05. *Limma Test, Benjamini-Hochberg correction*). I microRNA sono rappresentati in ordine decrescente di *adjusted-p-value* (dal più significativo al meno significativo).

Gene Symbol	Accession number	Gene Name	miRNA	Source
Bap1	NM_027088.2	Brcal-associated protein 1	mmu-miR-298-5p	miRanda
Bcl2	NM_009741.3, NM_177410.2	B cell leukemia/lymphoma 2	mmu-miR-296-3p (indirect, via CREB1)	[180]
Ccna2	NM_009828.2	Cyclin A2	mmu-miR-296-3p (indirect, via CREB1)	[180]
Gnas	All transcriptional variants (except NM_019690.2, NM_201617.1)	guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating complex locus	mmu-miR-296-3p	miRanda
Igf1r	NM_010513.2	Igf1r insulin-like growth factor I receptor	mmu-miR-296-3p, mmu-miR-298-5p	miRanda
Irs2	NM_001081212.1	Insulin receptor substrate 2	mmu-miR-296-3p (indirect, via CREB1)	[180]
JunB	NM_008416.3	Jun-B oncogene	mmu-miR-296-3p	[180]
Mapk4	NM_172632.2	Mitogen-activated protein kinase 4	mmu-miR-298-5p	miRanda
Nr4a2	NM_001139509.1, NM_013613.2	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	mmu-miR-296-3p (indirect, via CREB1)	[180]
Pea15a	NM_011063	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15A	mmu-miR-296-3p, mmu-miR-298-5p	[181]
Tnf	NM_013693.2	Tumor necrosis factor	mmu-miR-298-5p	[181]
Vdr	NM_009504.4	Vitamin D receptor	mmu-miR-298-5p	[182]
Zbtb20	NM_019778.2	zinc finger and BTB domain containing 20	mmu-miR-296-3p	miRanda

Tabella Supplementare 3. *Targets* predetti e validati del miR-296-3p e del miR-298-5p.

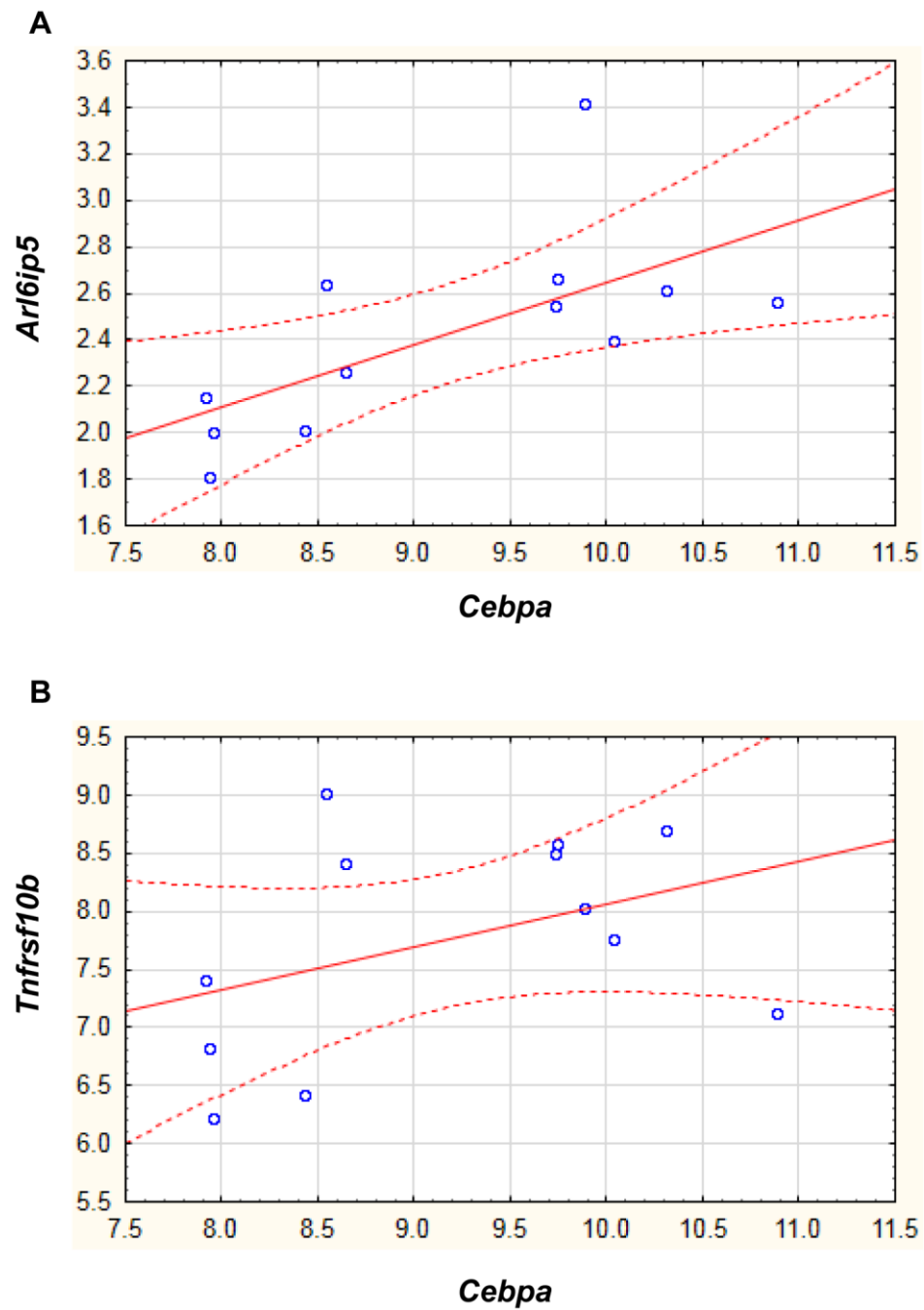
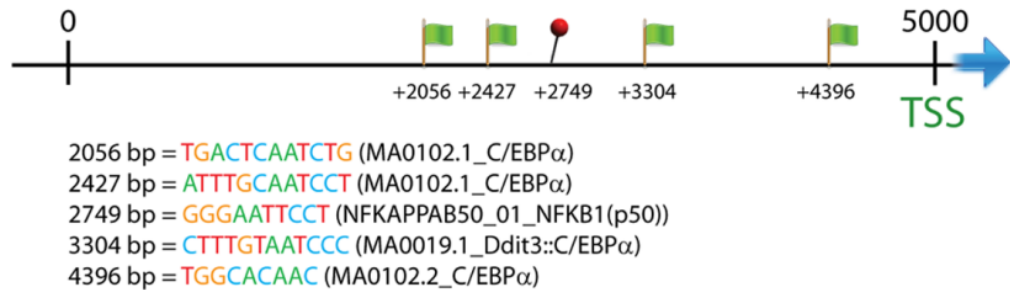


Figura Supplementare 1. Scatter plot della correlazione tra (A) l'espressione dell'mRNA di *Cebpa* (x-axis) e dell'mRNA di *Arl6ip5* (y-axis) (B) l'espressione dell'mRNA di *Cebpa* (x-axis) e dell'mRNA *Tnfrsf10b* (y-axis) in cellule β TC1 (vedi testo per ulteriori dettagli).

A**C/EBP α -Arl6ip5 Binding Sites**

Chr6: 97,205,792-97,210,791 [+Strand]

**B****C/EBP α -Tnfrsf10b Binding Sites**

Chr14: 69,767,472-69,784,403 [+Strand]

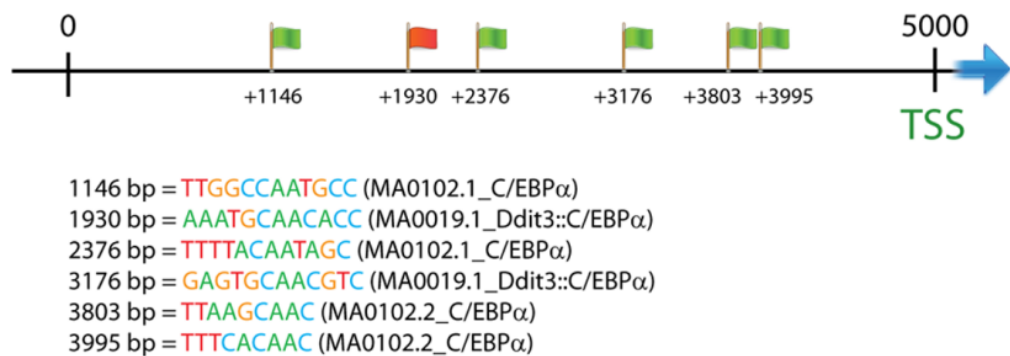


Figura Supplementare 2. TFBS (Transcription Factor Binding Sites) per il fattore di trascrizione CEBPA identificati dal tool LASAGNA in una regione 5 Kbp a monte dei TSS (Transcription Start Site) (A) *Arl6ip5* and (B) *Tnfrsf10b*. Le bandiere verdi indicano i TFBS per CEBPA; il pallino rosso rappresenta un TFBS per NFKB1 2749 bp *upstream* il TSS di *Arl6ip5*; la bandiera rossa indica un TFBS conservato per l'eterodimero DDIT3:CEBPA.

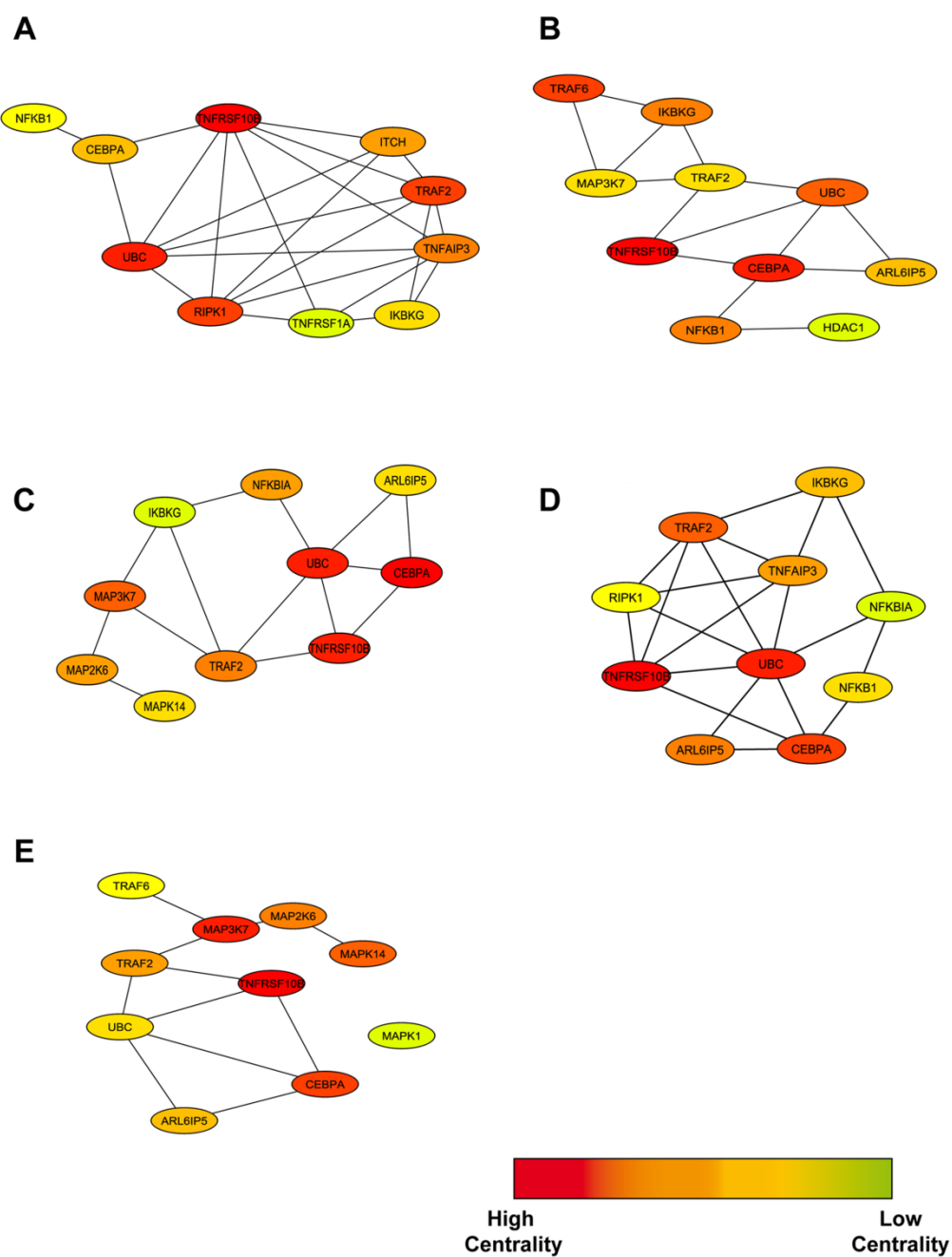


Figura Supplementare 3. Analisi di centralità del *network* mediante il *plug-in* cytoHUBBA.

(A) MCC; (B) Degree; (C) Bottleneck; (D) Closeness; (E) Betweenness.

Gene Ontology (Biological Process)	Benjamini Adjusted p-value (NEG LOG)	Number of Genes in Network
Cell death	27.36	50
MAPKKK cascade	12.68	19
Regulation of cell cycle	8.2	19
Cellular response to stress	8.17	25
Cytokine-mediated signalling pathway	6.14	10
Regulation of neuron apoptosis	5.86	11
JNK cascade	5.58	8
Immune response-activating signal transduction	1.63	5
Positive regulation of immune system process	1.5	9
I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	1.45	4
DNA damage response, signal transduction	1.42	5
Calcium ion homeostasis	1.36	6
Aging	1.34	5
Negative regulation of biosynthetic process	1.29	13
KEGG Pathways	Benjamini Adjusted p-value (NEG LOG)	Number of Genes in Network
MAPK signalling pathway	75.43	84
Pathways in cancer	45.41	68
Apoptosis	27.09	32
Toll-like receptor signalling pathway	25.16	32
Pancreatic cancer	24.22	28
NOD-like receptor signalling pathway	18.94	23
Chemokine signalling pathway	14.88	30
Adipocytokine signalling pathway	10.9	17
Insulin signalling pathway	6.26	17
Type II diabetes mellitus	6.24	11
JAK-STAT signalling pathway	4.38	15
TGF-beta signalling pathway	2.63	9
Cell cycle	3.23	12
Prion diseases	2.56	6
Alzheimer's disease	2.05	12
Wnt signalling pathway	1.74	10

Tabella Supplementare 4. Processi biologici e *pathways* sovrarappresentati all'interno del *network* di risposta alle citochine nelle β cellule pancreatiche. I processi biologici ed le *pathways* da KEGG sono ordinate secondo valori decrescenti di NEG LOG di *adjusted p-value* (Benjamini-Hochberg correction).

Gene symbol	Strand	Genomic coordinates of the gene (Mus musculus, mm10 genome build)	Genomic coordinates of the putative gene promoter (5Kb upstream TSS/111bp downstream TSS)	ECR	TFBS identified within ECR
Cebpa	+	Chr7:35119293-35121931	Chr7:35114293-35119404	Chr7:35116545-35116765	V\$STAT_01 + 158-166 TTACCAGAA 52-60 TTCTGGTAA
Arl6ip5	+	Chr6:97210792-97233315	Chr6:97205792-97210903	Chr6:97208338-97208670	V\$STAT1_02 - 205-212 gGGAAttc 241-248 gGGAAttc; V\$STAT1_01 + 223-243 tctgatTTCCTGTAAActgaat 259-279 tctgacTTCCTGTAAActgagc
Arl6ip5	+	Chr6:97210792-97233315	Chr6:97205792-97210903	Chr6:97208338-97208670	V\$STAT3_02 - 205-212 gGGAAttc 241-248 gGGAAttc; V\$STAT3_01 + 223-243 tctgATTTCCTGTAACTGaat 259-279 tctgACTTCCTGTAACTGagc
Arl6ip5	+	Chr6:97210792-97233315	Chr6:97205792-97210903	Chr6:97208338-97208670	V\$NFKB_Q6_01 + 200-215 gcttcGGGAATTCTCt 236-251 ccctgGGGAATTCTCt; V\$NFKAPPAB65_01 + 204-213 cGGGAATTCC 240-249 gGGGAATTCC; V\$NFKAPPAB50_01 + 205-214 GGGAATTCTCCT 241-250 GGGAATTCTCT
Arl6ip5	+	Chr6:97210792-97233315	Chr6:97205792-97210903	Chr6:97208338-97208670	V\$STAT6_02 + 226-233 gatTTCct 262-269 gacTTCct
Arl6ip5	+	Chr6:97210792-97233315	Chr6:97205792-97210903	Chr6:97210292-97210452	V\$CHOP_01 - 50-62 gaaaATTGCACgc 69-81 gggaATTGCAttc
Traf2	-	Chr2:25546894-25517982	Chr2:25551894-25546783	Chr2:25549530-25549738	V\$AP1_01 + 87-99 gggTGAGTCActg 116-128 gagTGAGTCAccc; V\$AP1_01 - 87-99 gggTGAGTCActg 116-128 gagTGAGTCAccc;

					V\$AP1_Q6 + 88-98 ggTGAGTcact 117-127 agtgAGTCAcc; V\$AP1_Q2_01 + 90-101 TGAGTcactgtg 114-125 cagagtgaGTCA
Traf2	-	Chr2:25546894- 25517982	Chr2:25551894- 25546783	Chr2:25549530- 25549738	V\$STAT3_02 + 110-117 ggaTTCCc 88-95 gGGAAtcc
Traf2	-	Chr2:25546894- 25517982	Chr2:25551894- 25546783	Chr2:25549530- 25549738	V\$NFKAPPAB65_01 + 108- 117 gGGGATTCCC 88-97 GGGAATCCCCc
Tnfrsf10b	+	Chr14:69767472- 69784411	Chr14:69762472- 69767583	Chr14:69764099- 69764426	V\$PBX1_02 + 204-218 gaaATCAATAAAcgt 237- 251 caaATCAATAAAcgt; V\$PBX1_01 + 207-215 ATCAATAAa 240-248 ATCAATAAa
Tnfrsf10b	+	Chr14:69767472- 69784411	Chr14:69762472- 69767583	Chr14:69764099- 69764426	V\$CHOP_01 + 304-316 aaaTGCAACacct 326-338 aaaTTCAATagcc
Ubc	-	Chr5:125390017- 125385965	N/D	N/D	N/D

Tabella Supplementare 5. TFBS all'interno di ECR (vedi Materiali e Metodi) identificati nella presunta regione promotore dei 5 nodi più centrali del *network* (vedi testo per ulteriori dettagli). Per ogni matrice TRANSFAC v.10.2 identificante un TFBS, la sequenza e la posizione (relativa al nucleotide +1 della sequenza di topo, all'interno della ECR) è riportata nell'ultima colonna.

<i>Cebpa</i> coexpressed gene symbol	r-value
<i>Fas</i>	0.821728
<i>Ddit3</i>	0.813631
<i>Tnfaip3</i>	0.812523
<i>Mapk4</i>	0.805711
<i>Map3k14</i>	0.801984
<i>Bbc3</i>	0.796712
<i>Dffa</i>	0.794838
<i>Atf3</i>	0.791937
<i>Mdm2</i>	0.789898
<i>Birc3</i>	0.788318
<i>Bid</i>	0.782103
<i>Nfkb2</i>	0.766541
<i>Stat3</i>	0.765168
<i>Dapk1</i>	0.764357
<i>Relb</i>	0.760786
<i>Nfkbib</i>	0.758293
<i>Stat1</i>	0.757471
<i>Traf3</i>	0.757155
<i>Ptpn13</i>	0.737210
<i>Traf2</i>	0.736436
<i>Gadd45a</i>	0.735532
<i>Trp53</i>	0.718020
<i>Lrdd</i>	0.715343
<i>Bak1</i>	0.708224

Tabella Supplementare 6. Geni coespressi con *Cebpa* in β TC1 durante l'intero *time course* sperimentale (24 e 48 ore) (Pearson correlation test, p -value < 0.01, n = 12). I geni sono ordinati secondo valori decrescenti di r .

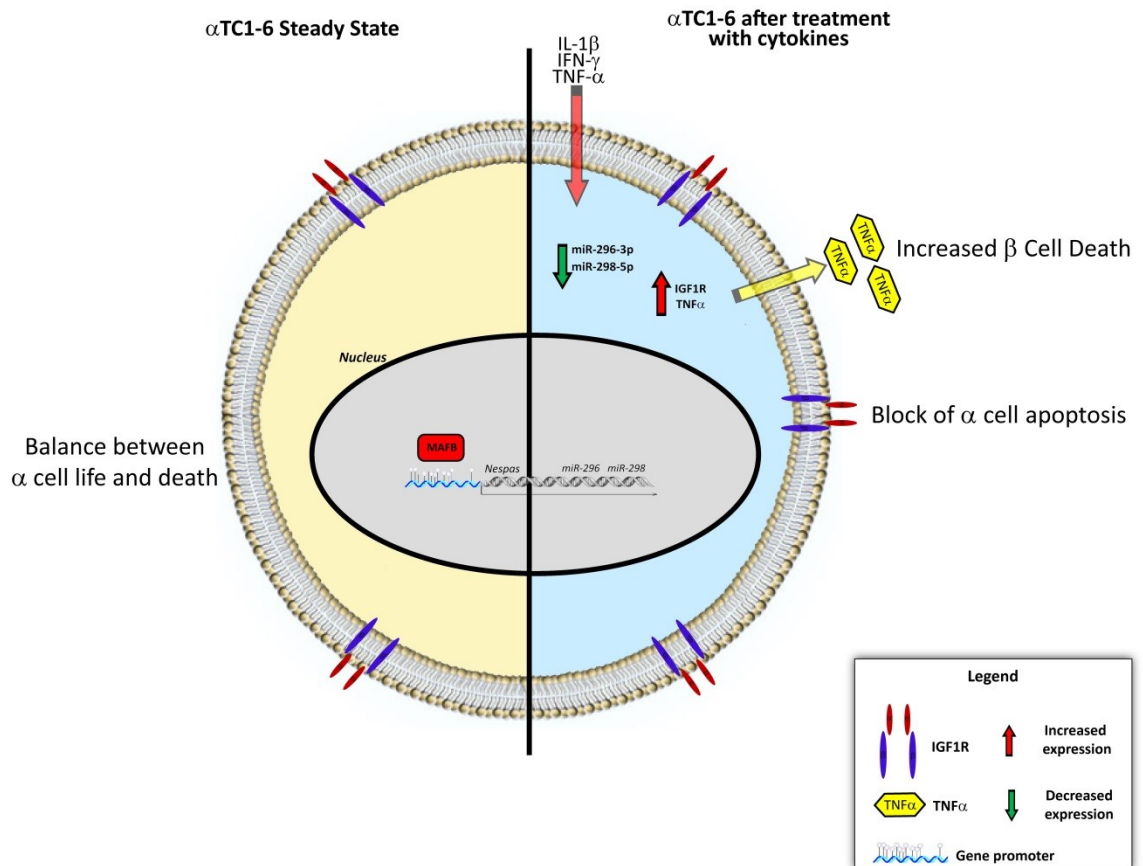


Figura Supplementare 4. Modello d'azione del miR-296-3p e del miR-298-5p in cellule αTC1-6 a *steady state* (parte sinistra della figura) e dopo trattamento con citochine (parte destra della figura).