

# UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI CATANIA

## FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Medicina Interna e Specialistica, Endocrinologia

---

Dottorato di Ricerca in Endocrinologia:  
Basi molecolari dell'azione ormonale, XXII° Ciclo  
Coordinatore: Prof. Riccardo Vigneri

---

**Dott.ssa Eugenia Tiziana Maniscalchi**

### **Alterazione secretoria nel diabete mellito: Ruolo dell' $\alpha$ cellula pancreatica**

TESI DI DOTTORATO

Relatore:

Chiar.mo Prof. Francesco Purrello

---

**ANNO ACCADEMICO 2009-2010**

## *Indice*

### **Introduzione**

Isola pancreatica	1
Meccanismo di secrezione	6
Differenze e analogia tra alfa e beta-cellule	10
Descrizione del funzionamento di beta ed alfa cellule pancreatiche	11
Beta cellule	11
Alfa cellule	18
Ruolo dell'insulina sull'alfa cellula	25
Segnale insulinico	26
Lavori di riferimento	28
Scopo dello studio	33

### **Parte Sperimentale** 35

#### **Lavoro sperimentale**

Effetto del palmitato sulla fosforilazione del recettore insulinico e sul segnale intracellulari in una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche ( $\alpha$ -TC1 clone 6)	36
---	----

#### **Materiali e metodi**

Linea cellule $\alpha$ -TC1 e condizioni di coltura	41
Preparazione del palmitato	42

Stimolazione con insulina	43
Secrezione di glucagone	44
Preparazione dei lisati cellulari	44
Immunoprecipitazione e Western blot	46
Estrazione quantificazione dell'mRNA ed analisi dell'espressione genica	47
Analisi densitometrica	48
Analisi statistica	49

## Risultati

Effetto del palmitato sulla secrezione di glucagone	50
Effetto del palmitato sulla fosforilazione del recettore insulinico e sul segnale IRS-1/PI3-K/AKT	51
Fosforilazione del recettore insulinico	51
Fosforilazione del substrato del recettore insulinico (IRS-1)	53
Attivazione di PI3 Kinase (p85 alpha)	54
Attivazione di AKT	55
Effetto del palmitato sul segnale di MAPK	57
Attivazione di IRS-2	57
La fosforilazione del recettore dell'IGF-1 e la via di MAPK	58
Effetto del palmitato sull'espressione genica e proteica di Pax6 e Glucagone	61

<b>Discussioni</b>	<b>66</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>72</b>

## ***Introduzione***

Il diabete mellito tipo 2 è una patologia caratterizzata da insulino-resistenza e alterazione della funzione dell'isola pancreatica. Inoltre, per la corretta regolazione dei livelli glicemici riveste un ruolo importante anche il bilancio dei livelli plasmatici di insulina e glucagone. L'azione di questi due ormoni a livello dei tessuti bersaglio regola il corretto utilizzo e il metabolismo non solo del glucosio ma anche degli altri nutrienti. Se per anni la beta-cellula pancreatica ha ricoperto un ruolo da protagonista per la comprensione dei meccanismi patogenetici di questa patologia, oggi è necessario esaminare più attentamente il ruolo dell'alfa-cellula e degli altri ormoni prodotti dall'isola pancreatica, poiché la loro azione a livello di fegato, muscolo e tessuto adiposo, potrebbe spiegare meglio alcuni aspetti ancora poco noti di questa patologia.

### **Isola pancreatica**

L'isola pancreatica è un organo centrale per la comprensione della patogenesi del diabete mellito. All'interno del pancreas esocrino dell'uomo sono presenti circa 2 milioni di isole, che rappresentano ognuna un organo endocrino indipendente, capace di riversare il

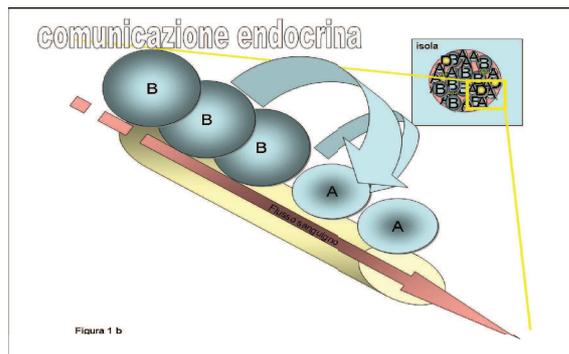
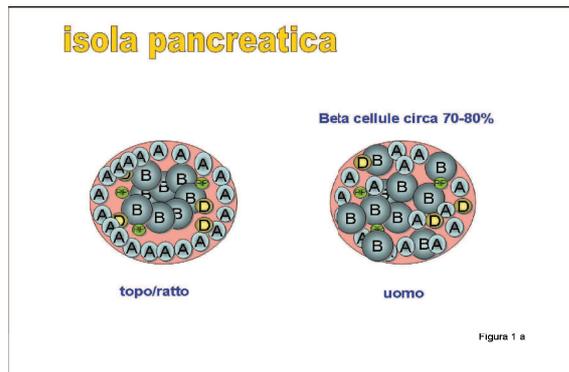
prodotto della secrezione direttamente nel circolo generale. Le cellule che comprendono l'isola pancreatica sono le alfa, le beta, le delta e le PP. Ogni famiglia cellulare produce un ormone diverso. Per anni solo le beta cellule e l'ormone da queste prodotto, l'insulina, sono state al centro dell'attenzione per la comprensione della fisiologia del diabete. Tuttavia, all'interno dell'isola, oltre alle beta cellule, che costituiscono la quota più rappresentata (circa il 60-70% nell'uomo), sono presenti anche le alfa cellule (circa il 25% della quota totale) che producono glucagone, le cellule delta (circa il 10% del totale) che producono somatostatina, e le cellule PP (meno dell'1%) che producono il polipeptide pancreatico. Benché l'esistenza di un ormone con caratteristiche opposte all'insulina fosse stata ipotizzata nel 1921, epoca in cui Banting e Best eseguivano i loro primi esperimenti su cani resi diabetici, solo nel 1948 Sutherland e Duve notarono che all'interno delle isole pancreatiche erano presenti le alfa cellule in grado di produrre glucagone, un ormone capace di indurre iperglicemia. Era quindi già noto il fatto che questo organo, l'isola pancreatica, fosse deputato non solo alla produzione di insulina, ma che anche gli altri componenti in qualche modo fossero indispensabili per la normale

omeostasi della glicemia. Nel 1975, Unger e Orci, per primi, postularono l'ipotesi bi-ormonale, secondo la quale le alfa cellule e le beta cellule, tramite la loro interazione sinergica, influenzavano e regolavano i normali livelli di glucosio nel sangue. Questa affascinante ipotesi negli anni successivi è stata in parte trascurata; negli ultimi anni un certo interesse è stato rivolto verso le alfa cellule.

Nelle varie specie animali le quattro popolazioni cellulari all'interno dell'isola pancreatica presentano una distribuzione anatomica differente. Se nelle isole dei roditori è possibile riconoscere un core centrale di beta cellule e un mantello periferico di cellule non beta, nell'uomo le cellule alfa, beta delta e PP sono allineate lungo i vasi sanguigni senza preciso ordine (Fig.1a). Questa differente distribuzione potrebbe essere responsabile di un differente comportamento endocrino di questo organo; infatti, se nei roditori è possibile immaginare un effetto endocrino tra le cellule beta e le non beta (fig.1b), nell'uomo, oltre all'effetto endocrino mediato dal flusso ematico, potrebbero esistere anche effetti paracrini che renderebbero il sistema più complesso (fig. 1c). Negli ultimi anni, inoltre è stato evidenziato come le interazioni cellula-

cellula all'interno dell'isola rivestono un ruolo importante per la secrezione totale dei polipeptidi provenienti dall'isola e studi praticati in isole intere, o in isole disperse in singole cellule, mostrano profili secretori differenti, in particolare per quanto riguarda la secrezione di glucagone.

Nella normale fisiologia la secrezione di glucagone rappresenta il più importante evento che si verifica in corso di ipoglicemia. Livelli troppo bassi di glucosio infatti potrebbero rappresentare un pericolo per il sistema nervoso, poiché il cervello non è in grado di sintetizzare glucosio, né di depositarlo in grandi quantità, per questo in condizioni fisiologiche l'azione delle alfa cellule si oppone a questa condizione. Quando i livelli di insulina determinano repentini abbassamenti della glicemia nel circolo sistemico, il glucagone e l'epinefrina vengono stimolati e la loro secrezione crea un nuovo equilibrio della glicemia. Il glucagone determina a livello epatico glicogenolisi e gluconeogenesi; l'epinefrina aumenta il rilascio epatico di glucosio e rallenta l'utilizzazione dello stesso da parte del muscolo e del tessuto adiposo.



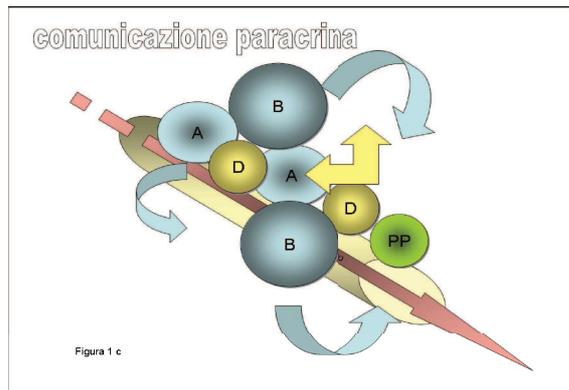


Figura 1

Organizzazione anatomica dell'isola pancreatica.

L'isola pancreatica è composta da differenti popolazioni cellulari. La distribuzione delle diverse tipologie cellulari varia da specie a specie. Nei roditori le beta cellule sono presenti al centro dell'isola e le alfa cellule prevalentemente in periferia; nell'uomo le alfa e le beta cellule sono distribuite senza un ordine preciso (fig.1a). Questa differente distribuzione potrebbe determinare una differente tipologia di comunicazione tra cellula e cellula. Se nei roditori è possibile ipotizzare una comunicazione di tipo esclusivamente endocrino (fig.1b), nell'uomo oltre al controllo endocrino esiste sicuramente un controllo di tipo paracrino (fig.1c).

### **Meccanismo di secrezione**

È noto che la secrezione insulinica rappresenta un fenomeno dinamico; la secrezione dell'ormone avviene in maniera pulsante e multifasica. Continuamente la beta cellula produce insulina con variazioni minime e continue che si potenziano in risposta ad un pasto. Studi in vitro, ma anche in vivo con l'utilizzo di carico endovenoso di glucosio, hanno mostrato la presenza di almeno due fasi della secrezione: la prima fase, o fase acuta che avviene nei primi 5-10 minuti dallo stimolo acuto, e la seconda fase o fase tardiva più prolungata nel tempo. Alcuni studi hanno evidenziato anche una terza fase della secrezione insulinica, che compare dopo 3-4 ore di stimolazione con glucosio, e che consiste in una riduzione della capacità secretoria di oltre il 50% rispetto ai valori massimali (desensibilizzazione o refrattarietà). Questa cinetica della secrezione, presente in soggetti normali, risulta alterata nel diabete mellito. Negli ultimi anni è emerso che la fase precoce è di fondamentale importanza per la normale omeostasi glucidica, e le sue alterazioni sono tipicamente associate al diabete mellito tipo 2, o comunque a condizioni di alterata tolleranza glucidica. Tuttavia i meccanismi che regolano queste fasi della secrezione insulinica

sono ancora poco definiti. Molte sono le ipotesi, anche se non esiste una spiegazione univoca che possa permettere di interpretare tali fenomeni. I meccanismi che regolano la secrezione insulinica sono molteplici e ognuno dei punti del processo sembra un possibile nodo chiave. Da quando la beta cellula entra in contatto con il glucosio, o con altri stimolanti, vengono attivati una serie di processi metabolici che esitano nell'esocitosi del granulo secretorio. Se si considera il glucosio, lo stimolante fisiologico, dall'interazione di questo con il suo trasportatore, il GLUT-2, si attivano alcune tappe enzimatiche regolate dalla glucochinasi o dall'esochinasi, che tramite il metabolismo non ossidativo, conducono al mitocondrio. Qui tramite il metabolismo ossidativo viene prodotto ATP; il rapporto ATP/ADP determina la chiusura dei canali del potassio ATP-dipendenti, l'attivazione dei canali per il calcio e, infine, l'esocitosi del granulo secretorio (fig. 2). Il *pool* di granuli secretori presenti in ogni singola beta-cellula non sembra essere un fattore limitante. Infatti, ogni beta-cellula possiede un numero di granuli che difficilmente può esaurire. Tuttavia, non tutti i granuli presenti in una beta-cellula potrebbero essere rilasciati allo stesso momento. È necessario prima un processo di maturazione

che sembra essere indispensabile per il processo di esocitosi. Sono stati identificati almeno tre *pool* differenti di granuli all'interno di ogni beta-cellula: un *pool* stabile che rappresenta il comparto maggiore con oltre l'80% dei granuli; un *pool* di granuli ancorati e un *pool* di granuli rapidamente rilasciabili, che rispetto a quelli ancorati hanno subito un passaggio ulteriore di capacitazione che lo rende in grado di fondersi con la membrana plasmatica e di rilasciare il contenuto ormonale all'esterno (fig. 3). Il processo di capacitazione dei granuli è complesso e le vie non sono del tutto note. Esistono tuttavia evidenze a supporto di alterazioni a tali livelli; sono infatti note mutazioni a carico di proteine e molecole di ancoraggio che renderebbero meno efficaci i processi di fusione del granulo alla membrana e quindi di rilascio dell'insulina.

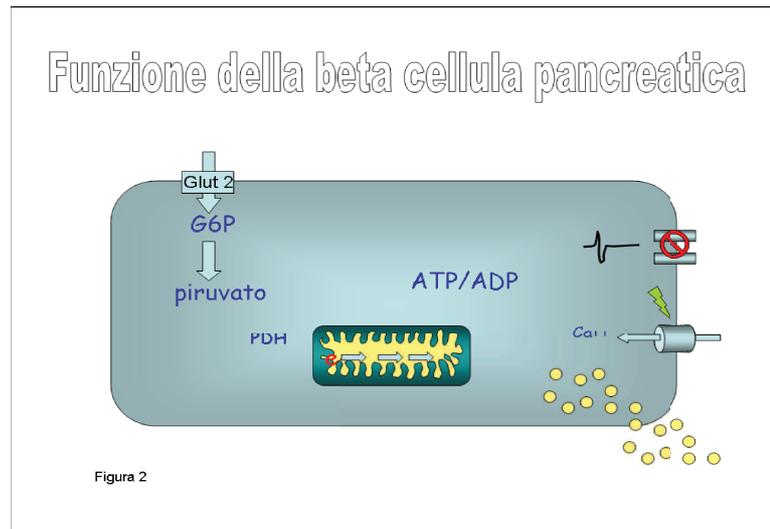


Figura 2

Rappresentazione del processo di secrezione insulinica.

La beta cellula, dopo l'esposizione al glucosio, avvia una serie di processi che culminano con la secrezione dei granuli di insulina.

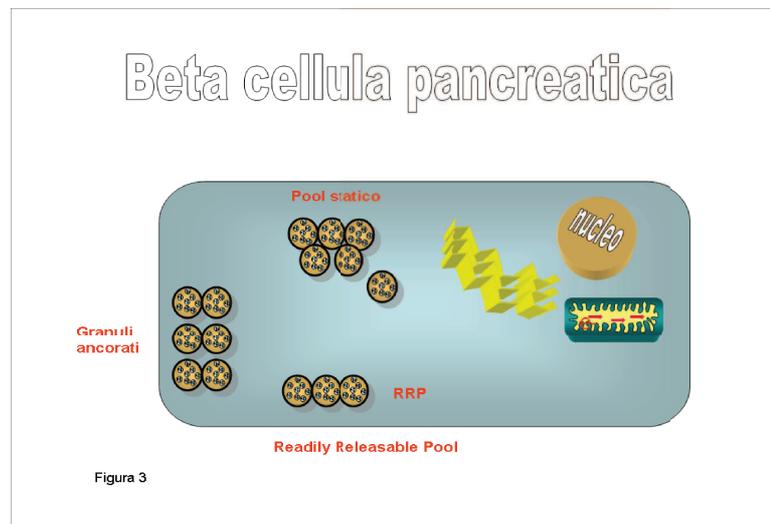


Figura 3

Distribuzione intracellulare dei granuli di insulina nella beta cellula.

Ogni beta cellula pancreatica possiede circa 10.000 granuli secretori. Questi granuli prima dell'esocitosi necessitano di una serie di processi maturativi. All'interno di ogni beta cellula è possibile riconoscere tre differenti gruppi di granuli: granuli di riserva o pool statico; granuli ancorati; granuli maturi (RRP, *readily releasable pool*).

### **Differenze e analogia tra alfa e beta-cellule**

Per quanto riguarda le alfa cellule, sembra che anche questa popolazione condivida alcuni apparati tipici della beta cellula. Alcuni di questi sembrano essere quasi sovrapponibili, altri hanno peculiarità tipiche di questo sistema cellulare.

Esperimenti di patch-clamp in alfa-cellule isolate di varie specie animali hanno mostrato come, a differenza delle beta cellule, le alfa cellule mostrino un potenziale di membrana spontaneo. Questa attività elettrica spontanea è stata anche dimostrata in alfa cellule presenti sulla superficie di isole di Langerhans ancora intatte. Sulla superficie cellulare delle alfa cellule sono stati riscontrati differenti canali ionici in grado di influenzare l'attività elettrica di queste cellule. Esistono almeno quattro differenti tipi di canali per il potassio, almeno quattro tipologie di canali per il calcio voltaggio-dipendenti, canali per il sodio, per il cloro e per alcuni neurotrasmettitori quali il GABA.

Sembra tuttavia che il comportamento di questi canali sia differente se studiato in alfa cellule isolate o all'interno di un'isola pancreatiche.

Per quanto riguarda i canali per il potassio ATP-dipendenti, essi sembrano condividere numerose peculiarità funzionali con le beta cellule, ma anche con molti altri tessuti dell'organismo. Tuttavia seppure non sembri esistere una differenza in termini di densità per unità di superficie tra beta e alfa cellule, il loro comportamento risulta essere diverso. Nelle alfa cellule, i canali per il potassio ATP-dipendenti sembrano essere molto più sensibili all'ATP. Questa differente sensibilità indica che sono necessarie concentrazioni di ATP molto basse per attivare la chiusura di questi canali, rispetto alle beta cellule.

### **Descrizione del funzionamento di beta ed alfa cellule pancreatiche**

#### **Beta cellule**

La beta-cellula pancreatica rappresenta il tipo cellulare maggiormente presente all'interno dell'isola pancreatica. Nell'uomo su circa due milioni di isole pancreatiche di Langerhans, l'80% della massa totale è rappresentato da beta cellule. Le beta cellule pancreatiche rilasciano insulina in risposta a vari stimoli fisiologici o farmacologici, allo scopo di mantenere i livelli di

glucosio nel sangue entro un intervallo di normalità necessario per la sopravvivenza dell'organismo. L'ormone prodotto dalle beta-cellule pancreatiche è l'insulina, peptide costituito da due catene aminoacidiche di 21 e 30 amoniacidi, rispettivamente chiamate A e B. Queste due proteine sono legate tra loro da due ponti di solfuro che conferiscono la struttura terziaria della proteina. L'insulina viene prodotta all'interno della beta cellula come precursore immaturo. Prima del rilascio in circolo subisce almeno due processi di clivaggio passando attraverso il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi. Una volta rilasciata in circolo, la sua emivita sarà di circa 6 minuti, poi verrà degradata ed eliminata a livello epatico, renale e in quota minore anche da altri tessuti per opera di insulinas. A livello dei tessuti bersaglio, si lega a specifici recettori, composti da due sub-unità (alfa e beta), appartenenti alla famiglia dei recettori peptidici di membrana. È noto tuttavia che l'insulina esplica anche effetti di tipo mitogenico e proliferativo tramite l'interazione con recettori non specifici, quali il recettore per l'IGF-1, l'IGF-2 e altri ancora.

Come già citato, l'insulina dopo la sintesi e le prime modificazioni conformazionali, viene immagazzinata dentro specifici granuli

secretori. All'interno dei granuli si trova prevalentemente insulina matura e C-peptide o peptide di connessione, derivante dal clivaggio della pro-insulina. Questo peptide verrà rilasciato poi in circolo in quantità equimolari con l'insulina. All'interno del granulo inoltre sono presenti zinco, calcio, magnesio, nonché altri ioni, volti a mantenere un pH ottimale; è noto infatti che uno dei processi di liberazione dell'insulina è rappresentato dall'acidificazione del contenuto del granulo a opera di alcuni canali esclusivi della membrana del granulo stesso. Mutazioni a livello di queste pompe determinano l'impossibilità del rilascio dell'ormone, anche in condizioni di perfetta maturazione del granulo. I granuli secretori, infatti, come prima rilevato, costituiscono un *pool* di riserva dell'ormone. Difficilmente il loro contenuto rappresenta un fattore limitante per la secrezione insulinica. Una beta cellula non più in grado di rispondere a stimoli fisiologici ha ancora un numero di granuli consistenti. Tuttavia non è sufficiente la presenza di granuli identificati all'interno della cellula perché possa avvenire la secrezione. Dei tre differenti *pool* di granuli identificati all'interno della beta-cellula, il *pool* stabile, seppur cospicuo, necessita di processi di preparazione e migrazione attraverso il citoscheletro

prima di essere pronto per il rilascio. Questo fenomeno avviene mediante la partecipazione di proteine contrattili, actina e miosina, che determinano migrazione dal centro della cellula verso la regione più prossima alla membrana cellulare. Dopo questo processo di migrazione, i granuli si spostano verso la periferia e danno inizio a dei processi di ancoraggio alla membrana. Qui tramite proteine specifiche (complesso SNARE) si verificano una serie di processi di ancoraggio finemente regolati (fig. 4). Ogni proteina di ancoraggio viene sintetizzata da specifici geni; mutazioni a tali livelli determinano alterazioni del processo. I granuli presenti a questo livello vengono identificati come *pool* dei granuli ancorati. Da questo punto in poi tuttavia, l'acidificazione del contenuto del granulo, l'ingresso del calcio tramite specifici canali, l'interazioni proteina-proteina tra granulo e membrana cellulare determineranno la fusione completa e infine il rilascio del contenuto all'esterno. Come si evince da quanto fin qui descritto, dalla sintesi dell'ormone al suo rilascio sono necessari molte tappe, ognuno dei quali può fermare il processo di maturazione, rendendo inefficace la presenza del granulo. Il processo di esocitosi di un granulo maturo, pronto per la liberazione, necessita di stimoli

provenienti dalla cellula. La beta-cellula con apparato di secrezione funzionante si prepara alla secrezione tramite processi metabolici ed elettrici complessi. I fenomeni metabolici ed elettrici risentono quindi dell'ambiente extracellulare e dei livelli di stimoli fisiologici o farmacologici. Considerando il glucosio, lo stimolante fisiologico, questo tramite le tappe metaboliche intracellulari condiziona la secrezione tramite il suo metabolismo intracellulare. Dopo il trasporto ad opera del GLUT2, e l'azione dell'enzima glucochinasi, il glucosio viene avviato ai processi metabolici di tipo anaerobico che determinano formazione di piruvato. In questa fase il GLUT e la glucochinasi rappresentano una fase limitante. Solo il glucosio trasformato in glucosio-6-fosfato procede verso le fasi successive del metabolismo. Alterazioni di GLUT2 o malfunzionamento della glucochinasi bloccherebbero il processo già all'inizio. Il GLUT-2 e la glucochinasi rappresentano la prima unità glucosensoria. Con la formazione del piruvato è possibile accedere al mitocondrio. All'interno di questo organo, indispensabile per la beta-cellula, si avvia il metabolismo ossidativo del glucosio che esita nella formazione di ATP tramite l'utilizzo dei complessi della catena respiratoria mitocondriale. I complessi proteici della catena

respiratoria mitocondriale svolgono un ruolo importante per la beta-cellule; un loro alterato funzionamento potrebbero bloccare gran parte della secrezione insulinica. Tramite l'azione coordinata dei complessi della catena respiratoria, si attiva un passaggio di elettroni e di protoni che portano alla formazione di ATP partendo da ADP. Il normale utilizzo produce ATP che servirà per le fasi successive della secrezione insulinica; condizioni di iper-impegno della catena determinano produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) che danneggiano le membrane mitocondriali e inducono segnali apoptotici per la cellula. Normalmente infatti la beta cellula ha basso potere antiossidante. In caso di maggiore produzione di radicali liberi, una quota di questi non viene contrastata dall'apparato di eliminazione e ne risulta quindi un maggiore danno alle membrane. La perossidazione delle membrane mitocondriali è alla base dell'avvio di segnali (rilascio del citocromo c, permeabilizzazione della membrana mitocondriale a opera di specifiche proteine) che attivano l'apoptosi. A supporto di tali condizioni di iper-lavoro la beta-cellula può utilizzare maggiormente alcuni sistemi di sicurezza, per esempio le proteine disaccoppianti (UCP), in questo caso la UCP-2, che dissipando

energia sotto forma di calore, permettono di far fronte al fenomeno. Tuttavia questa via alternativa condiziona la produzione di ATP e quindi la secrezione insulinica. Questi processi avvengono per esempio in caso di esposizione cronica a iperglicemia o ad acidi grassi liberi.

Dalla produzione di ATP, o meglio dall'aumento dei livelli intracellulari del rapporto ATP/ADP, vengono influenzati i canali del potassio ATP-dipendenti. L'aumento del ATP/ADP determina chiusura di questi canali con conseguente variazione del potenziale di membrana tramite l'apertura dei canali per il calcio. I canali del calcio, localizzati sulla membrana plasmatica, al momento della depolarizzazione modificano la loro conformazione spaziale, aprendosi. Il passaggio del calcio costituisce il secondo messaggero capace di accoppiare i segnali elettrici a quelli chimici. L'aumento delle concentrazioni intracellulari di calcio determina esocitosi dei granuli secretori. Va precisato che molti farmaci usati per la terapia del diabete agiscono proprio a questo livello. A livello dei canali per il potassio ATP-dipendente si trovano alcune sub-unità (SUR/Kir) in grado di legare in maniera più o meno stabile molte

sulfoniluree, determinando depolarizzazione della membrana beta cellulare in maniera più o meno indipendente dai livelli di glucosio.

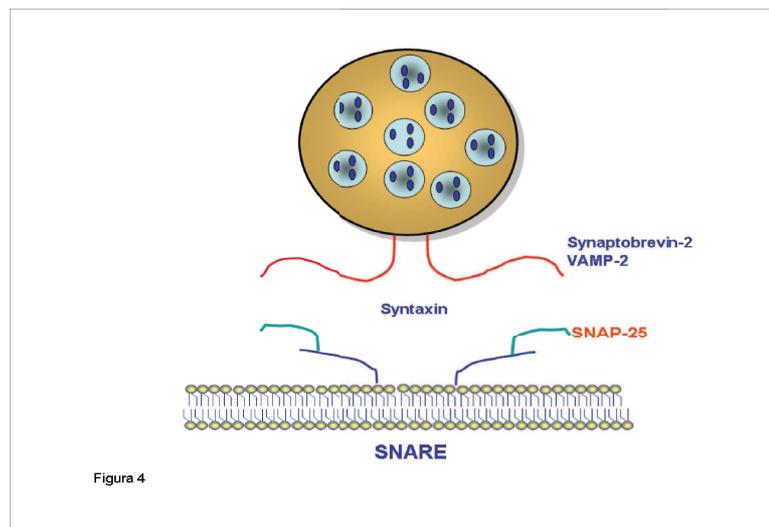


Figura 4

Figura 4

Rappresentazione schematica di un granulo maturo ancorato alla membrana.

Il processo di ancoraggio richiede la presenza di proteine (complesso SNARE); mutazioni a questo livello possono bloccare l'esocitosi del granulo.

## Alfa cellule

La popolazione alfa cellulare all'interno dell'isola pancreatica rappresenta circa il 20% della quota cellulare totale. Le alfa cellule producono glucagone, un peptide di 29 aminoacidi, prodotto come pro-glucagone e processato successivamente in ormone attivo prima della secrezione finale. Fino al 1955 l'esistenza di questo secondo ormone prodotto dall'isola pancreatica era stata solamente

ipotizzata in seguito agli effetti iperglicemizzanti ottenuti in studi effettuati tramite la somministrazione di estratti pancreatici, in particolare da Kimball e Murlin. Questi autori ipotizzavano la presenza di un ormone distinto dall'insulina, in seguito chiamato glucagone, che determinasse iperglicemia transitoria dopo la somministrazione di estratti di insulina. Nel 1957 Straub per primo purificò e ottenne la sequenza di questo ormone, e descrisse la capacità di ripristinare l'effetto ipoglicemizzante ottenuto con l'insulina. Tuttavia a causa delle difficoltà di misurazione e dell'instabilità della molecola, le acquisizioni sono avvenute più avanti nel tempo, dopo l'avvento delle metodiche di dosaggio RIA. Nel corso degli anni è stato riscontrato che gli stimoli che inducono ipoglicemia sono in grado di stimolare la secrezione di glucagone e, inoltre, che quando i livelli di glicemia aumentano, la secrezione di glucagone si riduce.

Oggi sono noti gli stimoli in grado di indurre la secrezione di glucagone e le sostanze in grado di inibirne la produzione. Tra questi il glucosio riveste un ruolo importante: l'iperglicemia inibisce la secrezione, l'ipoglicemia la stimola. Tra gli stimolanti vanno citati gli aminoacidi, il piruvato, i polipeptidi

gastrointestinali (GIP, VIP, CCK) e in particolare le catecolamine e tutto quello che riguarda la risposta a stimoli da stress; sembrano invece avere un ruolo inibente la secrezione gli acidi grassi liberi, i corpi chetonici, l'insulina, la somatostatina, il GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*). Tuttavia tutti questi fattori mostrano effetti diversi o addirittura opposti quando presenti in condizioni particolari. Per esempio è stato rilevato che il glucosio inibisce la secrezione di glucagone, quando però alfa cellule dissociate dall'isola intera vengono esposte a elevati livelli di glucosio la loro capacità secretoria appare potenziata. Sembra quindi che, anche per le alfa cellule, così come per le beta, il ruolo endocrino dell'isola pancreatica e delle altre popolazioni cellulari presenti al livello dell'organo possa condizionare il risultato finale di tutta la popolazione cellulare che la compone. Le alfa cellule sembrano possedere molti dei sistemi e degli apparati tipici delle beta cellule. Se si analizza il processo embriogenico che porta alla produzione delle alfa e delle beta cellule, queste due distinte popolazioni condividono fasi differenziative comuni. Addirittura, nelle fasi precoci di differenziazione alcune cellule possono co-esprimere glucagone e insulina nello stesso momento. È probabile che per

questo motivo l'apparato funzionale delle alfa cellule ricalchi in molti punti quello delle beta cellule. Le alfa cellule mature presentano canali di membrana simili alle beta cellule, e più importante ancora sembra essere la presenza di un apparato di granuli molto simili alle beta cellule.

Sulla superficie della alfa cellule sono presenti almeno quattro differenti tipologia di canali per il potassio, almeno quattro differenti tipologie di canali per il calcio e inoltre canali per GABA, per il sodio e per il cloro. Non molto è noto sulla peculiarità di questi canali e soprattutto sulla loro interazione. Tuttavia vi sono evidenze che almeno per alcuni tipi di canali per il potassio, questi siano molti più sensibili ai livelli di ATP intracellulare. Rispetto a quanto è noto per le beta cellule, nelle alfa sembra essere necessario molto meno ATP per attivare i canali del potassio ATP-sensibili. Inoltre anche la loro sensibilità si esaurirebbe con molta più velocità rispetto alle beta cellule. Questa differenza pare essere confermata dal differente potenziale di membrana che nelle beta-cellule è -40mV, mentre nelle alfa cellule il potenziale di attivazione registrato si colloca intorno a -60mV. Probabilmente l'azione coordinata dei molti canali presenti sulla superficie rendono più o

meno polarizzate le rispettive membrane. Per il resto le due popolazioni cellulari condividono in maniera sorprendente molti aspetti del processo secretorio. Anche per le alfa cellule l'ingresso del calcio, spostando il potenziale da -60 a -30 mV determina secrezione di glucagone. Rivedendo l'organizzazione della beta cellula, emerge come anche le alfa possiedono un'unità glucosensoria composta da GLUT e glucochinasi; tuttavia il trasportatore qui presente è l'isoforma 1. Il GLUT-1 a bassa capacità di trasporto rispetto al 2, è in assoluto poco presente sulla membrana rispetto al corrispettivo sulla beta cellula, determina un più basso trasporto di glucosio all'interno della cellula. Questo suggerisce che il trasporto del glucosio per l'alfa cellula non deve essere un fattore limitante per la funzione. Il metabolismo del glucosio sembra essere solamente il 20-40% rispetto alla beta cellula, e di conseguenza la generazione di ATP risulta inferiore. Tuttavia come già detto, i canali per il potassio al contrario risultano molto più sensibili alle perturbazioni dei livelli di ATP. Va precisato inoltre che probabilmente il piruvato che origina dal metabolismo muscolare durante l'esercizio fisico potrebbe contribuire all'aumento della quota metabolica che arriva al

mitocondrio per essere scissa dalla catena respiratoria generando ATP. Ricordiamo, infatti, che il piruvato sembra stimolare la secrezione di glucagone, mentre non ha alcun effetto sulla secrezione insulinica. Come per le beta cellule, anche per le alfa il contenuto di calcio intracellulare sembra indispensabile per l'esocitosi dei granuli. Nelle alfa cellule, dopo la depolarizzazione della membrana il calcio entra rapidamente attraverso canali specifici. I canali per il calcio identificati per l'esocitosi sembrano essere almeno di due tipi; il tipo N, più importante per la secrezione basale o tonica dell'ormone e il tipo L assieme al tipo N per le secrezioni acute. Quando questi canali si chiudono, l'esocitosi si blocca. Inoltre pare che un ruolo importante per l'esocitosi rivestono i livelli di AMPc; questo nucleotide non potenzia la secrezione, ma sembra che velocizzi la mobilizzazione dei granuli, dal comparto del *pool* stabile alla membrana. Tuttavia è stato visto come durante la mobilizzazione dal comparto centrale alla periferia da parte dell'AMPc, i granuli non si spostano casualmente verso la membrana, ma seguono un preciso percorso che li porta in prossimità dei canali del calcio di tipo L. Si potrebbe quindi ipotizzare che i granuli, sinora descritti come dispersi in *pool* stabile

e in pool localizzati in prossimità della membrana, possano essere divisi in granuli posti vicino ai canali del calcio di tipo L (secrezione acuta) e granuli presenti in vicinanza dei canali per il calcio di tipo N (secrezione tonica).

Da quanto qui esposto è quindi possibile immaginare anche un effetto sulle alfa cellule di alcuni farmaci di stimolare la secrezione insulinica. È noto infatti che la tolbutamide e la glibenclamide, tramite l'interazione con i canali del potassio ATP-dipendente, sono in grado di stimolare la secrezione di glucagone almeno nelle alfa cellule isolate. Questo naturalmente può apparire paradossale, tuttavia esistono dati a conferma di questa ipotesi, seppur non tutti univoci. Di certo, anche per questo aspetto, non si può non tenere in considerazione il ruolo dell'isola pancreatica e delle azioni endocrine o paracrine del complesso apparato cellulare; il risultato finale sicuramente risulta da tutte le interazioni cellulari dell'isola e dal prodotto dei vari ormoni che stimolano o inibiscono le cellule vicine.

### **Ruolo dell'insulina sull'alfa cellula**

L'insulina è un ormone secreto dalle cellule  $\beta$  del pancreas endocrino in risposta all'elevata concentrazione di glucosio nel sangue e possiede un effetto inibitorio paracrino sulle cellule alfa. Recenti indagini hanno fornito una certa comprensione del meccanismo con cui l'insulina inibisce la secrezione del glucagone grazie al legame con il suo recettore presente sull'alfa cellula. La trascrizione del recettore insulinico è abbondante nelle  $\alpha$  cellule di ratto e risulta simile ad un altro tessuto target dell'insulina importante come il fegato. I recettori per l'insulina sono espressi anche nelle  $\alpha$ TC6 (linea di glucagonoma di topo) e la secrezione di glucagone diminuisce con l'aggiunta di insulina. L'insulina inibisce temporaneamente l'attività elettrica e la secrezione di glucagone nelle  $\alpha$  cellule isolate di ratto, molto probabilmente grazie all'attivazione del segnale intracellulare che a sua volta innesca l'attivazione dei canali  $K^+$  sensibili all'ATP (canali  $K_{ATP}$ ), culminando nella iperpolarizzazione della membrana. L'insulina è stato riportato attivare i recettori  $GABA_A$  nelle  $\alpha$ -cellule attraverso la via di AKT, ciò determina l'iperpolarizzazione della membrana nelle alfa cellule e la soppressione della secrezione di glucagone. Il

contributo relativo dell'attivazione canali  $K_{ATP}$ , la traslocazione del recettore  $GABA_A$  e l'attivazione dell'inibizione indotta dall'insulina sul rilascio del glucagone non è attualmente chiara.

### **Segnale insulinico**

Il recettore insulinico, appartenente alla famiglia dei recettori di membrana, è una proteina etero-tetramerica formata da due subunità  $\alpha$  extracellulari e due subunità  $\beta$  transmembrana collegate da ponti di-zolfo. L'insulina lega le subunità  $\alpha$  del recettore e stimola l'autofosforilazione dei residui tirosinici della subunità  $\beta$ . Le subunità  $\beta$  attivate determinano la fosforilazione di substrati intracellulari appartenenti classicamente a due vie: metabolica e proliferativa (fig. 5). Alla prima appartengono le proteine della famiglia delle IRS (IRS-1), PI-3-chinasi, AKT, mentre alla via proliferativa appartengono le proteine IRS-2 e quelle della famiglia di MAP-K. Un'alterazione nella trasduzione di questi segnali potrebbe determinare insulino-resistenza e alterazioni dell'attività proliferativa delle cellule. La via di MAPK è normalmente coinvolta nella proliferazione cellulare; studi recenti indicano che MAPK può influenzare l'espressione di PAX6, fattore trascrizionale implicato

nella differenziazione delle alfa cellule e nella trascrizione del gene del glucagone.

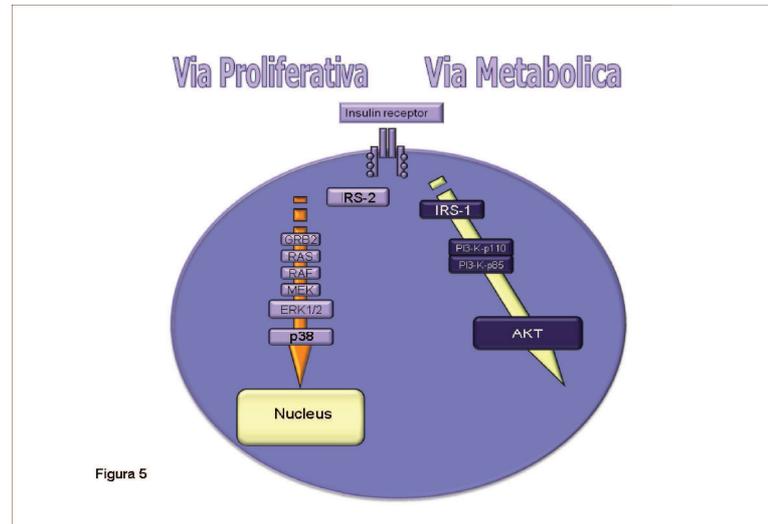


Figura 5

Figura 5  
Rappresentazione grafica del segnale insulinico intracellulare che può essere schematicamente suddiviso in 2 differenti vie: metabolica e proliferativa.

## *Lavori di riferimento*

- 1) [Kulkarni RN](#). The islet beta-cell. *Int J Biochem Cell Biol.* ;36(3):365-71. Review 2004.
- 2) [Best CH](#). The internal secretion of the pancreas. *Can Med Assoc J.* 17;87:1046-51 1962.
- 3) Sutherland EW, de Duve C.: Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of pancreas. *J. Biol. Chem.* 175: 663-674. 1948
- 4) [Unger RH, Orci L.](#): The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet.* 4;1(7897):14-6. 1975
- 5) Lane MA.: The cytological characters of the areas of Langerhans. *Am. J. Anat.* 7: 409-422. 1907
- 6) [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 U S A.* 14;103(7):2334-9. 2006
- 7) [Bonner-Weir S, Orci L.](#): New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes.*31(10):883-9. 1982
- 8) [Orci L, Baetens D, Rufener C, Amherdt M, Ravazzola M, Studer P, Malaisse-Lagae F, Unger RH.](#): Hypertrophy and hyperplasia of somatostatin-containing D-cells in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A;*73(4):1338-42. 1976
- 9) [Rahier J, Goebbels RM, Henquin JC.](#): Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia.* 24(5):366-71. 1983
- 10) [Bolli GB, Fanelli CG.](#): Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 28(3):467-93, v. Review. 1999

- 11) [Lang DA, Matthews DR, Burnett M, Turner RC.](#): Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes*. 30(5):435-9. 1981
- 12) [Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, Frank BH, Galloway JA, Van Cauter E.](#): Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 12;318(19):1231-9. 1988
- 13) [Brunzell JD, Robertson RP, Lerner RL, Hazzard WR, Ensink JW, Bierman EL, Porte D Jr.](#): Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab*. 42(2):222-9. 1976
- 14) [Malaisse WJ.](#): Metabolism of D-glucose anomers in pancreatic islets (review). *Int J Mol Med*. 12(6):911-6. Review. 2003
- 15) [Maechler P, Carobbio S, Rubi B.](#): In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell Biol*.;38(5-6):696-709. Review. 2006
- 16) [Antinozzi PA, Ishihara H, Newgard CB, Wollheim CB.](#): Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: a survey of four fuel secretagogues. *J Biol Chem*.277(14):11746-55. 2002
- 17) [Barg S, Eliasson L, Renström E, Rorsman P.](#): A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca<sup>2+</sup> channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes*;51 Suppl 1:S74-82. Review. 2002
- 18) [Patanè G, Anello M, Piro S, Vigneri R, Purrello F, Rabuazzo AM.](#): Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition. *Diabetes*.;51(9):2749-56. 2002
- 19) [MacDonald PE, De Marinis YZ, Ramracheya R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, Cox R, Eliasson L, Rorsman P.](#): A K<sub>ATP</sub> channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent

- and human islets of Langerhans. *PLoS Biol.* 5(6):e143. 2007
- 20) [Olofsson CS, Collins S, Bengtsson M, Eliasson L, Salehi A, Shimomura K, Tarasov A, Holm C, Ashcroft F, Rorsman P.](#): Long-term exposure to glucose and lipids inhibits glucose-induced insulin secretion downstream of granule fusion with plasma membrane. *Diabetes.* 56(7):1888-97. 2007
  - 21) [Vikman J, Ma X, Hockerman GH, Rorsman P, Eliasson L.](#): Antibody inhibition of synaptosomal protein of 25 kDa (SNAP-25) and syntaxin 1 reduces rapid exocytosis in insulin-secreting cells. *J Mol Endocrinol.* 36(3):503-15. 2006
  - 22) [MacDonald PE, Obermüller S, Vikman J, Galvanovskis J, Rorsman P, Eliasson L.](#): Regulated exocytosis and kiss-and-run of synaptic-like microvesicles in INS-1 and primary rat beta-cells. *Diabetes.* 54(3):736-43. 2005
  - 23) [Kanno T, Rorsman P, Göpel SO.](#): Glucose-dependent regulation of rhythmic action potential firing in pancreatic beta-cells by K(ATP)-channel modulation. *J Physiol.* 1;545(Pt 2):501-7. 2002
  - 24) [Kanno T, Gopel SO, Rorsman P, Wakui M.](#): Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on alpha-, beta- and delta-cells of the pancreatic islet. *Neurosci Res.* ;42(2):79-90. Review. 2002
  - 25) [Göpel SO, Kanno T, Barg S, Rorsman P.](#): Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting -cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol.* 1;528(Pt 3):497-507. 2000
  - 26) [Göpel SO, Kanno T, Barg S, Weng XG, Gromada J, Rorsman P.](#): Regulation of glucagon release in mouse -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na<sup>+</sup> channels. *J Physiol.* 1;528(Pt 3):509-20. 2000
  - 27) [Persaud SJ, Howell SL.](#): The biosynthesis and secretion of insulin. *Williams G. Textbook of diabetes; Blackwell Publishing company* 13: 11-17. 2003
  - 28) [Rutter GA, Hill EV.](#): Insulin vesicle release: walk, kiss, pause ... then

- run. *Physiology* (Bethesda). ;21:189-96. Review. 2006
- 29) [Lang J.](#): Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem.* ;259(1-2):3-17. Review. 1999
- 30) [MacDonald PE, Rorsman P.](#): The ins and outs of secretion from pancreatic beta-cells: control of single-vesicle exo- and endocytosis. *Physiology* (Bethesda). 22:113-21. Review. 2007
- 31) [Rorsman P, Renström E.](#): Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia.*;46(8):1029-45. Epub 2003 Jul 17. Review. 2003
- 32) [Fridlyand LE, Philipson LH.](#): Reactive species, cellular repair and risk factors in the onset of type 2 diabetes mellitus: review and hypothesis. *Curr Diabetes Rev.* 2(2):241-59. Review. 2006
- 33) [Wiederkehr A, Wollheim CB.](#) Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology.* 147(6):2643-9. Review. 2006
- 34) [Dunning BE, Gerich JE.](#): The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev.*28(3):253-83. Review. 2007
- 35) [Gromada J, Franklin I, Wollheim CB.](#): Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev.*;28(1):84-116. Review. 2007
- 36) [Müller WA, Faloona GR, Aguilar-Parada E, Unger RH.](#): Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response to carbohydrate and protein ingestion. *N Engl J Med.* 16;283(3):109-15. 1970
- 37) [Unger RH, Aguilar-Parada E, Müller WA, Eisentraut AM.](#): Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest.* 49(4):837-48. 1970
- 38) [Abdul-Ghani M, DeFronzo RA.](#): Fasting hyperglycemia impairs glucose- but not insulin-mediated suppression of glucagon secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(5):1778-84. 2007
- 39) Vilsbøll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ : Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute

- nearly equally to the incretin effect of meal in healthy subjects. *Regul Pept* 114:115–121. 2003
- 40) Degen BK, Brock B, Juhl BC, Djurhuus CB, Grubert J, Kim D, Han J, Taylor K, Fineman M, Schmitz O.: Effect of Intravenous Infusion of Exenatide (Synthetic Exendin-4) on Glucose-Dependent Insulin Secretion and Counterregulation During Hypoglycemia. *Diabetes* 53: 2397 -2403. 2004
- 41) Unger RH: Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia* 28:574–578. 1985
- 42) Franklin I, Gromada J, Gjnovci A, Theander S, Wollheim CB:  $\beta$ -Cell secretory products activate  $\alpha$ -cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes* 54:1808–1815. 2005
- 43) Kisanuki K, Kishikawa H, Araki E, Shirota T, Uehara M, Isami S, Ura S, Jinnouchi H, Miyamura N, Shichiri M: Expression of insulin receptor on clonal pancreatic  $\alpha$  cells and its possible role for insulin-stimulated negative regulation of glucagon secretion. *Diabetologia* 38:422–429. 1995
- 44) Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, Liu S, Wendt A, Deng S, Ebina Y, Wheeler MB, Braun M, Wang Q: Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABA<sub>A</sub> receptor system. *Cell Metab* 3:47–58. 2006

## ***Scopo dello studio***

Lo scopo dello studio è stato quello di analizzare l'effetto dell'esposizione cronica ad elevati livelli di acidi grassi liberi sulla funzione alfa cellulare, al fine di identificare se iperfemia cronica possa determinare insulino-resistenza specifica nelle  $\alpha$  cellule.

In alfa cellule pancreatiche murine in coltura continua ( $\alpha$ -TC1 clone 6) esposte cronicamente (48 h) a palmitato (0.5 mmol/L per 48 h) è stata valutata la secrezione di glucagone, la funzione del recettore insulinico ed il suo segnale intracellulare.

Il razionale di questo studio nasce dall'evidenza clinica che in pazienti con diabete di tipo 2, in condizioni di iperglicemia, i livelli di glucagone risultano inappropriatamente elevati. E' possibile quindi ipotizzare in questi soggetti un malfunzionamento delle alfa cellule pancreatiche. Infatti la secrezione di glucagone fisiologicamente dovrebbe essere inibita dall'iperglicemia e dall'aumento dei livelli di insulina. In questi soggetti invece è possibile immaginare alfa cellule irresponsive al glucosio e/o all'insulina.

Questa parte di studio è stata focalizzata sui meccanismi che possono determinare insulino-resistenza. Gli acidi grassi liberi è

noto che in altri sistemi cellulari (fegato e muscolo) sono in grado di determinare insulino-resistenza.

Se anche le alfa cellule pancreatiche esposte ad acidi grassi potessero divenire insulino-resistenti, questo potrebbe contribuire a spiegare alcuni aspetti della fisiopatologia del diabete mellito di tipo 2.

## ***Lavoro sperimentale***

### ***Effetto del palmitato sulla fosforilazione del recettore insulinico e sul segnale intracellulari in una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche ( $\alpha$ -TC1clone 6)***

Per capire la fisiopatologia del diabete è importante studiare l'isola pancreatica "in toto" poiché la risposta secretoria ad uno stimolo è il risultato delle comunicazioni tra i diversi tipi cellulari.

Nell'isola pancreatica le cellule beta rappresentano il tipo cellulare predominante (comprendono circa il 70% della popolazione dell'isola) e giocano un ruolo chiave nell'omeostasi dei nutrienti attraverso la secrezione di insulina (1). Le cellule alfa (circa il 20% della popolazione cellulare) rilasciano glucagone, il principale ormone iperglicemizzante, che stimola la produzione di glucosio dal fegato (1). La risposta cellulare dell'isola è influenzata dall'architettura, dalla microcircolazione e dalla continua comunicazione tra le cellule. In particolare l'insulina proveniente dalle vicine cellule beta potrebbe sopprimere la secrezione di glucagone nelle cellule alfa (2-4), inoltre molti studi suggeriscono che le isole richiedono un calo dei livelli di insulina prima di rispondere a una privazione di glucosio attraverso il rilascio di glucagone (5-7).

In condizioni fisiologiche il glucosio e l'insulina regolano la funzione delle cellule alfa: basse concentrazioni di glucosio e insulina stimolano il rilascio di glucagone, mentre l'iper-glicemia e l'iper-insulinemia sopprimono la secrezione di glucagone. Nei pazienti con diabete tipo 2, i livelli di glucagone nel sangue sono inappropriatamente alti sia in condizioni basali sia nella fase postprandiale nonostante gli elevati livelli circolanti di glucosio e insulina e questo rappresenta un fattore chiave nel determinare i livelli di aumento della produzione epatica di glucosio in questi pazienti (3-9). Il meccanismo di questo difetto funzionale non è noto; diverse ipotesi sono state formulate per spiegare il motivo per cui le cellule alfa sono meno sensibili agli effetti inibitori del glucosio e dell'insulina nei pazienti diabetici. Tra le varie spiegazioni è stato ipotizzato che questo difetto potrebbe essere secondario alla tossicità metabolica. È stato dimostrato che elevati livelli di acidi grassi alterano il funzionamento delle cellule beta sia nelle isole di roditori sia in quelle umane (9,10); meno dati sono disponibili per le cellule alfa. È noto che gli acidi grassi incrementano la secrezione di glucagone sia nelle linee cellulari sia nelle isole pancreatiche isolate (11-15); la risposta del glucagone risulta essere mediata dall'ossidazione degli FFA (11) e

dall'aumento dell'ingresso degli ioni  $Ca^{2+}$  attraverso i canali tipo-L

(13). La lunghezza delle catene, la conformazione spaziale e i livelli

degli FFA insaturi influenza la secrezione di glucagone (16).

L'inabilità dell'insulina a sopprimere la secrezione di glucagone

potrebbe essere dovuta ad insulina resistenza a livello delle alfa

cellule (17). La lipotossicità potrebbe in teoria agire sia alterando il

metabolismo del glucosio nelle alfa cellule, sia potrebbe agire

negativamente sul recettore insulinico e sulle vie del segnale

intracellulare. L'insulina agisce sulla secrezione di glucagone

attraverso il legame con il suo specifico recettore di superficie sulle

alfa cellule (10,18,19); un'alterazione nel segnale insulinico

potrebbe compromettere questo effetto. Le alfa cellule sottoposte a

tossicità metabolica potrebbero divenire insulino-resistenti ed

eventualmente non rispondere all'effetto inibitorio di elevati livelli

di insulina.

Lo scopo dello studio, quindi, è stato quello di analizzare la

secrezione di glucagone, la funzione del recettore insulinico ed il

suo segnale intracellulare in una linea cellulare di alfa cellule

pancreatiche murine ( $\alpha$ -TC1 clone 6) esposte cronicamente (48 h) a

palmitato (0.5 mmol/L per 48 h). Noi ipotizziamo che l'insulino-

resistenza insorga dopo l'esposizione a palmitato e per dimostrare

ciò abbiamo trattato queste cellule, alla fine del periodo di esposizione (48 h) con palmitato, con insulina in acuto, al fine di valutare il segnale intracellulare dell'insulina. In particolare abbiamo studiato sia la via metabolica del recettore insulinico (IRS-1, PI3-K, AKT), nota per regolare la sensibilità dei canali  $K_{ATP}$  dipendenti e la secrezione di glucagone nelle alfa cellule (18), sia la via mitogenetica di MAPKinasi, che culmina con l'attivazione di fattori trascrizionali e la trascrizione genica.

## **Lavoro sperimentale**

Effetto del palmitato sulla fosforilazione del recettore  
insulinico e sul segnale intracellulari in una linea  
cellulare di alfa cellule pancreatiche ( $\alpha$ -TC1clone 6)

## ***Materiali e metodi***

Terreni di coltura, anticorpi e reagenti utilizzati per lo studio sono stati ottenuti come di seguito elencato:

- terreno di coltura D-MEM, palmitato, arginina e aprotinina sono stati forniti da Sigma Chemical (St. Louis, MO);
- siero fetale bovino (FBS) da Invitrogen Laboratories (Carlsbad, CA);
- insulina porcina e inibitore PD 98059 da Calbiochem (San Diego, CA);
- MAPK chinasi (MEK) e inibitore UO126 da Promega Corp. (Madison, WI);
- anti IR- $\beta$  totale, recettore anti-IGF-I (IGF-IR)  $\beta$  (C-20), anti-fosfo IRS-1 (Tyr612), anti p-AKT1 (Thr308), anti AKT1 totale (5C10) e anti-PI3K p85  $\alpha$  (Z-8) da Santa Cruz Biotechnology, Inc., (Santa Cruz, CA);
- anticorpo anti-fosfotirosina (anti-PY) (4G10) da UBI (Lake Placid, NY);
- anti IRS-2 totale e anti IRS-1 totale da Millipore Corp., (Billerica, MA),

- anti-fosfo-AKT (Ser473), anti-fosfo-ERK 44/42 (phospho-44/42 MAPK) (Thr202/Tyr204), antitotal ERK 44/42, anti-fosfo-p38 (phospho-p38 MAPK) (Thr180/Tyr182), anti-fosfo-p38MAP chinasi e anticorpo anti-glucagone policlonale da Cell Signaling Technology, (Inc., Boston, MA);
- anti-Pax6 monoclonale da R&D Systems (Minneapolis, MN).

### **Linea cellulare $\alpha$ -TC1 e condizioni di coltura**

La linea cellulare utilizzata, alphaTC1 (clone 6), gentilmente fornita dal dott. S. Efrat, è una linea di alfa cellule pancreatiche clonate da una linea di alphaTC1, derivate da un adenoma indotto su topi trans-genici infettati con virus SV40 sotto il controllo del promotore del gene del pro-glucagone di ratto. Anche se la linea cellulare  $\alpha$ -TC1 produce glucagone e notevoli quantità di insulina e di mRNA preproinsulina, le linee clonali (clone 6 e clone 9) sono altamente differenziate e producono glucagone ma non insulina o mRNA preproinsulina.

Il clone 6, da noi utilizzato per gli esperimenti, mostra un fenotipo più differenziato rispetto al clone 9 ed inoltre esprime più alti livelli di glucagone (19,20).

Le cellule sono state utilizzate a passaggio 30-45 e fatte crescere in terreno D-MEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium (modificato appositamente e contenente 16.7mmol/L di glucosio e 1.5g/L di bicarbonato di sodio) supplementato con 10% di FBS, 1% di L-glutamina e 1% di Penicillina/Streptomicina; sotto controllo atmosferico: 95% di umidità e 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C.

Le cellule sono state tripsinizzate due volte la settimana.

### **Preparazione del palmitato**

La soluzione di palmitato è stata preparata come descritto da Zhou H. (16, 21, 22). Il palmitato è stato preparato miscelando e riscaldando concentrazioni uguali di NaOH e palmitato in acqua distillata per ottenere una concentrazione finale di 500 mmol/L. Questa soluzione è stata diluita con il 5% di BSA (priva di acidi grassi) per ottenere una concentrazione di 50mmol/L. La soluzione stock è stata filtrata, aliquotata e conservata a -20°C. La soluzione di palmitato è stata preparata fresca prima di ogni esperimento, effettuando una diluizione 1:100 a partire dallo stock madre.

### **Stimolazione con insulina**

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

Sono stati condotti alcuni esperimenti per testare il ruolo di MAPK nella regolazione dell'espressione di PAX6 e del glucagone, a tale scopo sono stati testati due inibitori specifici di MEK, UO126 (23) e PD 98059 (24), somministrati a una concentrazione rispettivamente di 25  $\mu$ mol/L or 50  $\mu$ mol/L durante le ultime 24 ore di crescita.

### **Secrezione di glucagone**

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

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

### **Preparazione dei lisati cellulari**

Dopo un periodo di incubazione di 48 ore con palmitato le cellule sono state lavate due volte con PBS (pH 7.4), incubate con terreno privo di FBS per 24 ore e successivamente stimolate per 5 minuti con insulina a diverse concentrazioni ( $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  M). La stimolazione con insulina è stata bloccata con due lavaggi in PBS freddo (pH 7.4) ed una volta eliminato l'eccesso di liquido, è stato

Dottorato di ricerca in Scienze Endocrinologiche; Basi molecolari dell'azione Ormonale. Dr.ssa Maniscalchi Eugenia Tiziana **Maniscalchi Eugenia Tiziana**

*Materiali e Metodi*

aggiunto Buffer di lisi freddo (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxycholate, 0,1 % sodio dodecil solfato [SDS], 50 mM Tris [pH 7,4], 10 mM sodio pirofosfato, 100 mM NAF, 2 mM PMSF, 2 mM Fluoruro di sodio, 1 mg di pepstatina per ml, 1 mg di aprotinina per ml, 1 mg di leupeptin per ml). Le cellule sono state raccolte e centrifugate a 10,000 x g per 10 minuti a 4°C. La quantificazione del contenuto proteico dei lisati è stato ottenuto tramite metodica colorimetrica Bradford (25).

### **Immunoprecipitazione e Western blot**

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

L'immunoprecipitazione è stata condotta incubando il complesso proteico G/A-Sepharose per 2 ore a 4°C, sotto costante rotazione, con 4 µg di anticorpi diretti contro specifiche proteine di interesse (IR, IGF-1R, IRS-1 or IRS-2). Successivamente, effettuati 3 lavaggi in PBS, il complesso G/A-Sepharose/anticorpo formatosi è stato incubato per 2 ore a 4°C con 500 µg di lisato proteico e sottoposto a rotazione continua. L'immunoprecipitato ottenuto è stato eluito in gel di acrilammide, trasferito su membrana di nitrocellulosa, incubato prima con specifici anticorpi (anti-IR, IGF-1, IRS-1 o IRS-2) e successivamente con anti-phosphotyrosine (anti-PY) per determinare lo stato di attivazione. La stessa metodica è stata applicata per la co-immunoprecipitazione utilizzando come secondo anticorpo l'anti-PI3K p85 $\alpha$ .

I Western blots sono stati effettuati come descritto precedentemente (26).

Brevemente, dopo normalizzazione con metodica Bradford, le proteine sono state eluite in gel di acrilammide, trasferite su membrane di nitrocellulosa ed una volta incubate con specifici

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

### **Estrazione, quantificazione dell'mRNA ed analisi dell'espressione genica**

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

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

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

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

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

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

### *Analisi densitometrica*

L'analisi densitometrica dei Western Blot è stata effettuata tramite software *ImageJ* v.1.41 (free download at <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>), i dati così ottenuti sono stati analizzati utilizzando Graphpad Prism v.4.0 (Statcom, Germany).

### **Analisi statistica**

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

## ***Risultati***

### ***Effetto del palmitato sulla secrezione di glucagone***

L'analisi dei livelli di glucagone, al termine dell'incubazione con KREB buffer, rilevava un aumento della secrezione nelle cellule pre-esposte a palmitato rispetto alle cellule di controllo ( $2770 \pm 17$  vs  $2020 \pm 15$  pg/mg proteine;  $p < 0.05$ ) [fig 6A].

Al fine di evidenziare l'effetto dell'insulina sulla secrezione di glucagone, abbiamo misurato i livelli di tale ormone dopo stimolazione con insulina  $10^{-9}$  M in presenza e assenza di palmitato 0.5mmol/L.

I risultati hanno messo in evidenza che l'insulina inibiva significativamente la secrezione di glucagone nelle cellule di controllo, mentre lo stesso effetto non era riscontrabile nelle cellule pre-esposte a palmitato (fig. 6B). Ulteriori esperimenti condotti con Arginina (10mmol/L) hanno evidenziato un aumento significativo della secrezione di glucagone sia nel controllo che nelle cellule pre-esposte a palmitato (fig. 6B).

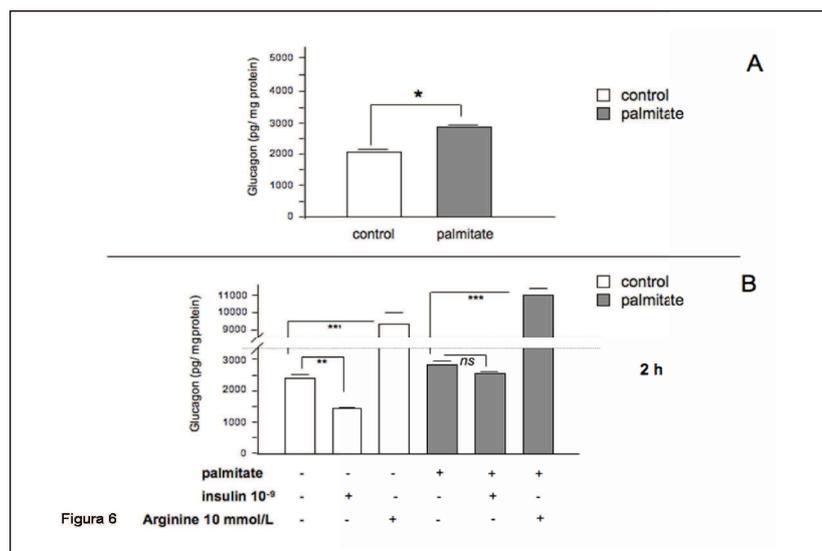


Figura 6

**Secrezione di glucagone:**

Secrezione di glucagone nelle cellule di controllo  $\alpha$ -TC1 e nelle cellule preposte a palmitato.

(pannello A): livelli di glucagone nel mezzo DME, alla fine del periodo di cultura, in cellule in coltura in presenza o in assenza (controllo) del palmitato (0,5 mmol / L). I dati sono media  $\pm$  SE, n = 5; p \* <0.05 vs controllo; (pannello B): livelli di glucagone misurato di nuovo nelle stesse cellule, dopo lavaggi in PBS, 24 ore di siero-deprivazione e poi coltivate per 2 ore in KRB (glucosio 16,7 mmol / L) in presenza o assenza di palmitato ( 0,5 mmol / L) e / o insulina 10<sup>-9</sup> M o Arginina 10 mmol / L. I dati sono media  $\pm$  SE, n = 5; \*\* p <0.01, \*\*\* p <0,001, ns = non significativo.

**Effetto del palmitato sulla fosforilazione del recettore insulinico e sul segnale IRS-1/PI3-K/AKT**

**Fosforilazione del recettore insulinico**

Esperimenti preliminari, sulla fosforilazione del recettore insulinico, sono stati condotti al fine di determinare il tempo di esposizione ad insulina; le cellule  $\alpha$ -TC1 clone 6 sono state trattate con insulina (10<sup>-9</sup> M) per 1, 5, 10 e 20 minuti. L'effetto massimo di

fosforilazione del recettore è stato evidenziato a 5 minuti (fig. 7).

Questo tempo è stato usato per gli esperimenti successivi.

Dopo aver coltivato per 48 ore le  $\alpha$ -TC1 clone 6 in presenza o assenza di palmitato 0.5mmol/L e stimolato con insulina, abbiamo effettuato le specifiche immunoprecipitazioni per IR. Gli esperimenti hanno mostrato un effetto dose-risposta nel gruppo di controllo (da 2.4 a 38 unità arbitrarie (AU) [fig. 8]); lo stesso effetto non era riscontrabile nel gruppo di cellule pre-esposte a palmitato; solo ad elevate dosi di insulina ( $10^{-8}$  M) la fosforilazione del recettore risultava essere debolmente incrementata (fig. 8).

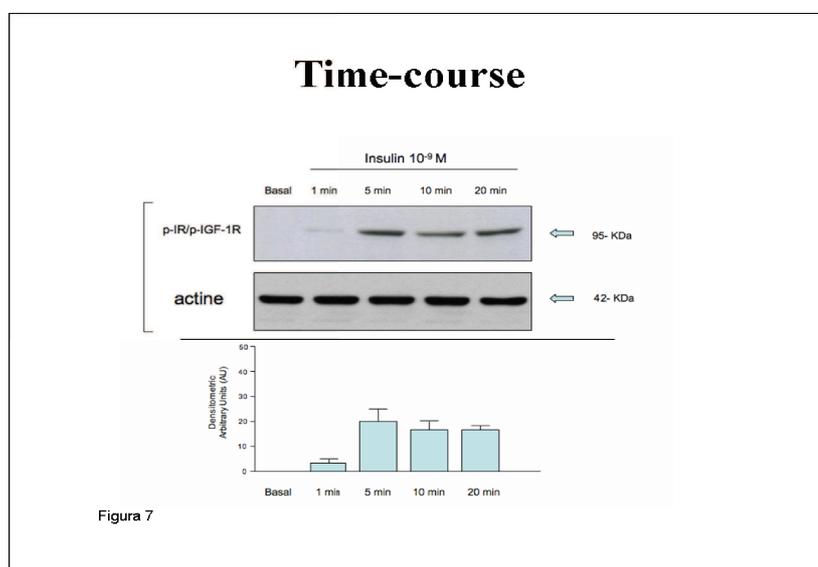


Figura 7

**Time course della fosforilazione del recettore insulinico.**

Al fine di valutare l'attivazione del recettore insulinico le cellule sono state stimulate con insulina  $10^{-9}$  M per differenti tempi (1, 5, 10, 20 minuti).

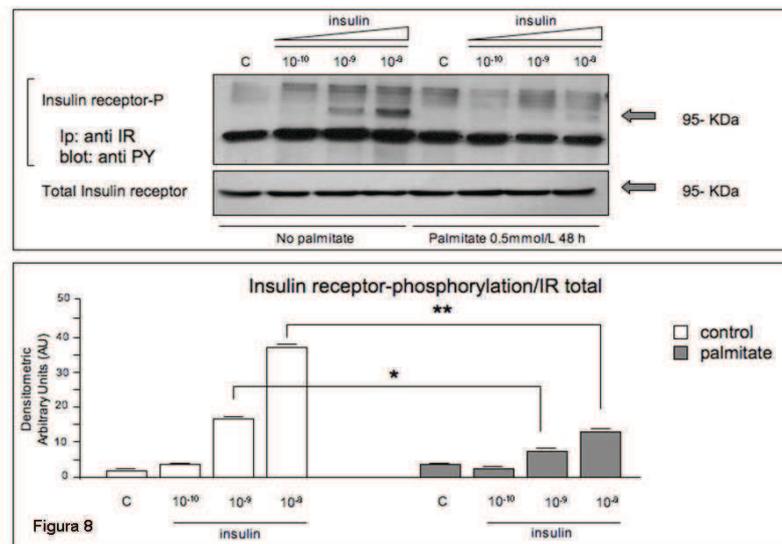


Figura 8

**Analisi Western blot per la fosforilazione del recettore dell'insulina (immunoprecipitazione):**

Le cellule sono state cresciute in presenza o in assenza (controllo) del palmitato (0,5 mmol / L) per 48 ore e poi, dopo siero-deprivazione, sono state stimulate con insulina (stimolazione acuta) da 10<sup>-10</sup> a 10<sup>-8</sup> M. I lisati sono stati trattati con anticorpo anti recettore insulinico totale (IR, 4 µg per 2 ore a 4° C) prima (basale [C]) e dopo stimolazione con insulina (10<sup>-10</sup> a 10<sup>-8</sup> M).

C , 10<sup>-10</sup> 10<sup>-9</sup> 10<sup>-8</sup> indicano i gruppi di controllo e i gruppi esposti ad insulina. Gli immunoprecipitati sono stati sottoposti a SDS-PAGE e poi blottati per anti PY. Il pannello superiore mostra blots rappresentativi della proteina P-IR e IR totale. Il pannello inferiore del grafico mostra la media ± SE dei dati acquisiti da 5 esperimenti separati. \* P <0.05, \*\* p <0.001 vs gruppo di controllo.

**Fosforilazione del substrato del recettore insulinico (IRS-1)**

IRS-1 è tra i primi substrati intracellulari del recettore insulinico ad essere attivato dopo il legame dell'insulina con il suo recettore. Nei nostri esperimenti abbiamo misurato la fosforilazione di IRS-1 in tirosina 612, sito cruciale per l'attivazione di IRS-1 e la trasmissione del suo segnale a livello intracellulare (27,28).

L'insulina attivava IRS-1 (Tyr 612) nelle cellule di controllo in maniera dose-dipendente, con un effetto significativo già a  $10^{-10}$  M e massimo a  $10^{-9}$  M (fig. 9). Nelle cellule pre-esposte a palmitato sono stati ottenuti risultati simili a quelli evidenziati per la fosforilazione del recettore insulinico; l'insulina, a basse dosi, non era in grado di attivare IRS-1 mentre a dosi elevate ( $10^{-8}$  M) IRS-1 risultava attivato (fig. 9).

### Attivazione di PI3 Kinase (p85 alpha)

Il legame di IRS-1 fosforilato con il dominio *src* homology 2 (SH2) della subunità p85 alpha del fosfatidil-inositolo 3-Kinase (PI3-Kinase), attiva la PI3-Kinase (29,30).

Una specifica co-immunoprecipitazione di IRS-1 e una successiva incubazione con l'anticorpo anti-PI3-K85 $\alpha$  mostrava un'attivazione dose-dipendente nelle cellule di controllo (fig. 9), mentre nelle cellule pre-esposte a palmitato solo ad elevati livelli di insulina ( $10^{-8}$  M) veniva osservata l'attivazione della kinasi (fig. 9).

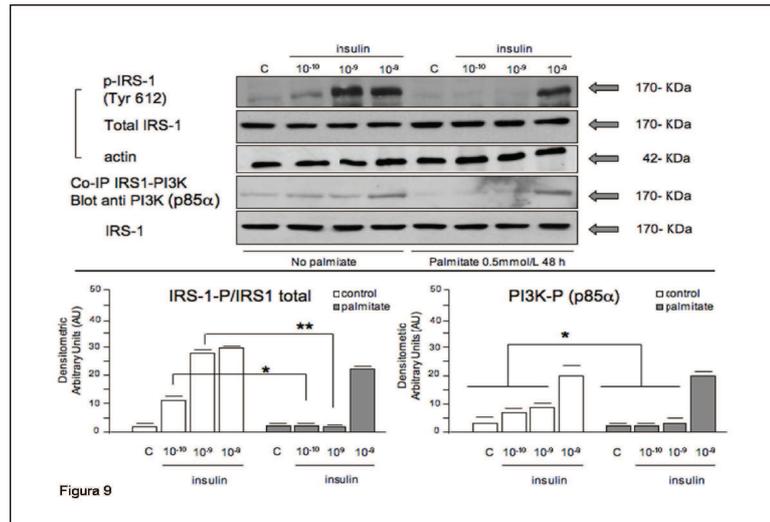


Figura 9

**Analisi Western blot per la fosforilazione di IRS-1 (Tyr 612) e ) e co-immunoprecipitazione di PI3-K (P85):**

Analisi di Western blot per IRS-1 P (Tyr 612), IRS-1 totale, actina e per PI3-K (P85) e IRS-1. I lisati di cellule  $\alpha$ -TC1 coltivate in presenza o in assenza (controllo) del palmitato (0,5 mmol / L) per 48 ore e poi, dopo affamamento sono stati stimolati con insulina (stimolazione acuta) da 10<sup>-10</sup> a 10<sup>-8</sup> M. Il pannello superiore mostra due esperimenti rappresentativi per IRS-1 P (Tyr 612) e per la PI3-K (P85). Il pannello inferiore mostra media  $\pm$  SE dell'analisi densitometrica di 5 diversi esperimenti; \* p <0.05, \*\* p <0,001 vs gruppi di controllo.

**Attivazione di AKT**

L'attivazione di AKT è regolata da 2 distinti siti di attivazione in Thr308 e Ser473. Il primo sito ad essere fosforilato è la Thr308 ad opera di PDK-1 e successivamente la fosforilazione della Ser473 permette la totale attivazione di AKT. Questi due eventi di fosforilazione sono spesso utilizzati come indicatori dell'attivazione della via di IRS-1/PI3K/Akt (31,32). Nelle cellule  $\alpha$ -TC1 sono stati analizzati entrambi i siti di attivazione. Nei gruppi di controllo la

stimolazione con insulina evidenziava un effetto dose-dipendente (fig. 10), mentre nelle cellule pre-esposte a palmitato l'insulina non determinava un aumento della fosforilazione di AKT né in Thr308 né in Ser473 (fig. 10).

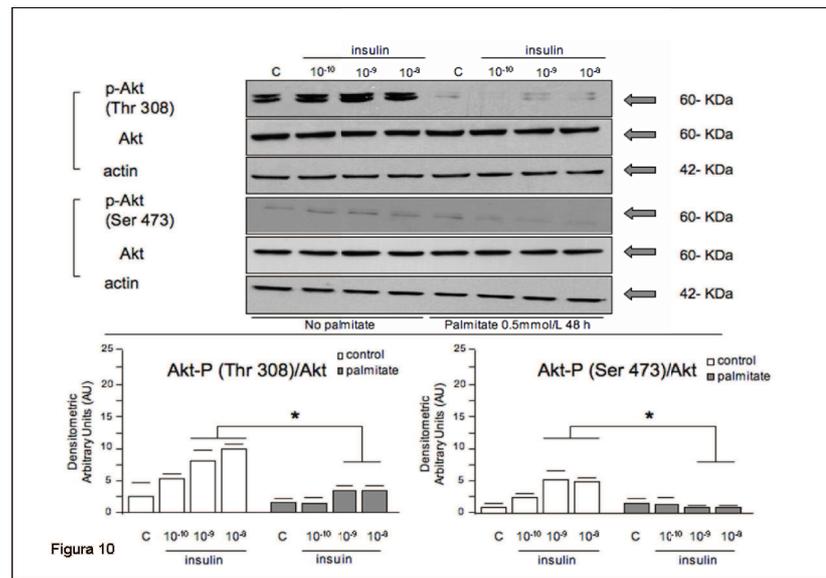


Figura 10

**Analisi Western blot per la fosforilazione di Akt a (Ser 473) e (Thr 308):**

Esperimento rappresentativo di Akt (Ser 473), Akt totale, actina e della fosforilazione di Akt (Thr 308), Akt totale, actina. I lisati di cellule  $\alpha$ -TC1 coltivate in presenza o in assenza (controllo) del palmitato (0,5 mmol / L) per 48 ore e stimolati con insulina (stimolazione acuta) da 10<sup>-10</sup> a 10<sup>-8</sup> M.

Il pannello superiore mostra un esperimento rappresentativo. Il pannello inferiore mostra media  $\pm$  SE dell'analisi densitometrica da 5 diversi esperimenti, \* p < 0.05 vs gruppi di controllo.

### **Effetto del palmitato sul segnale di MAPK**

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

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

### **Attivazione di IRS-2 (Insulin Receptor Substrate 2)**

Per lo studio della via mitogenica sono stati condotti esperimenti a partire dall'analisi di IRS-2. A tal fine sono state condotte delle specifiche immunoprecipitazioni con IRS-2 totale e successiva incubazione con anti-fosfotirosina (anti-PY). I dati mostravano un aumento di espressione di IRS-2 attivo nel gruppo pre-trattato con palmitato, già in condizioni basali (cioè in assenza di stimolazione con insulina) rispetto alle cellule di controllo ( $25.6 \pm 4$  gruppo pre-esposto a palmitato vs.  $10.6 \pm 3$  AU;  $n = 5$ ;  $p < 0.01$  nel gruppo di controllo). In entrambi i gruppi le esposizioni acute con insulina non incrementavano significativamente la fosforilazione di IRS-2; in particolare i valori di fosforilazione sono inversamente proporzionali all'aumento della concentrazione di insulina (Fig.11).

### Fosforilazione del recettore dell'IGF-1 e la via di MAPK

Per studiare il segnale proliferativo abbiamo analizzato la via intracellulare di MAPK, in particolare la fosforilazione di ERK 44/42 e p38. Nelle cellule  $\alpha$ -TC1 pre-trattate con palmitato, la fosforilazione basale (cioè in assenza di insulina) era significativamente più alta rispetto alle cellule non esposte al palmitato ( $p < 0.05$ ); la stimolazione acuta con insulina per 5 minuti determinava un leggero incremento dell'attivazione di ERK 44/42 (p-Erk 44/42) nel gruppo di controllo (Fig.11). Nelle cellule pre-trattate con il palmitato, l'insulina a basse concentrazioni ( $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  M) aumentava la fosforilazione della proteina, mentre ad alte concentrazioni ( $10^{-8}$  M) la fosforilazione diminuiva. Per comprendere meglio questo meccanismo abbiamo aumentato il tempo di stimolazione con insulina da 5 a 10 minuti in entrambi i gruppi (controllo e palmitato). I risultati mostravano che dopo 10 minuti di esposizione ad insulina, nelle cellule di controllo le stimolazioni con insulina aumentavano la fosforilazione, mentre nelle cellule pre-trattate con palmitato si evidenziava ancora una significativa attivazione sia nel basale sia dopo stimolazione con insulina ( $p < 0.01$ ) (Fig. 12).

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

Gli esperimenti mostravano che, il basale delle cellule pre-trattate con palmitato presentava un'attivazione significativamente più alta rispetto alle cellule non trattate con palmitato ( $20.4 \pm 2$  nel gruppo pre-esposto a palmitato vs.  $8.3 \pm 2$  AU nel gruppo di controllo;  $n=5$ ;  $p < 0.05$ ); questa attivazione perdurava anche nelle cellule stimulate con insulina  $10^{-10}$  M ( $28.2 \pm 7$  nel gruppo pre-esposto vs.  $4.2 \pm 4$  AU nel gruppo di controllo;  $n = 5$ ;  $p < 0.01$ ) ed era in accordo con i dati osservati con ERK-P (fig. 11). Abbiamo infine analizzato il segnale a valle di ERK esaminando la fosforilazione di MAPKp38. L'attivazione di MAPKp38 risultava significativamente più alta nelle colture con palmitato rispetto alle cellule di controllo ( $23.5 \pm 2$  nel gruppo pre-esposto vs.  $6.2 \pm 1.5$  AU nel gruppo di controllo;  $p < 0.01$ ); mentre in entrambi i gruppi le stimolazioni in acuto con insulina non determinavano un significativo incremento di P-p38 (fig.11).

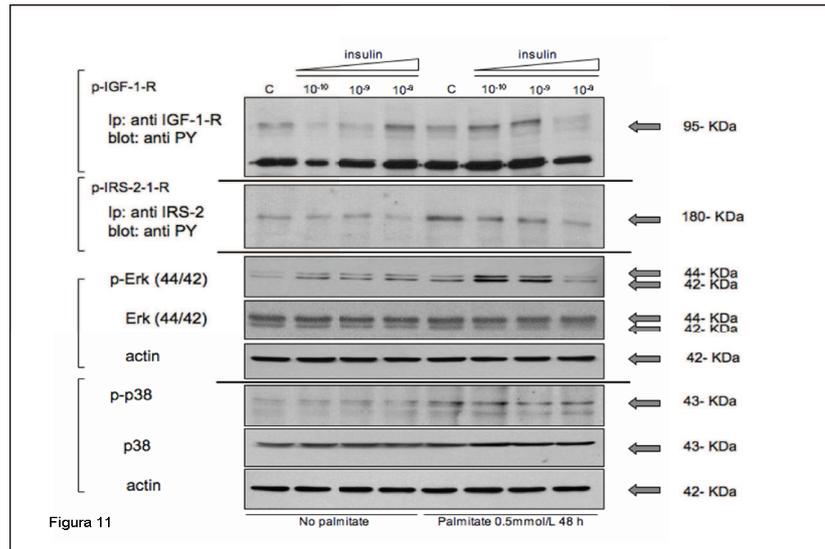


Figura 11

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

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

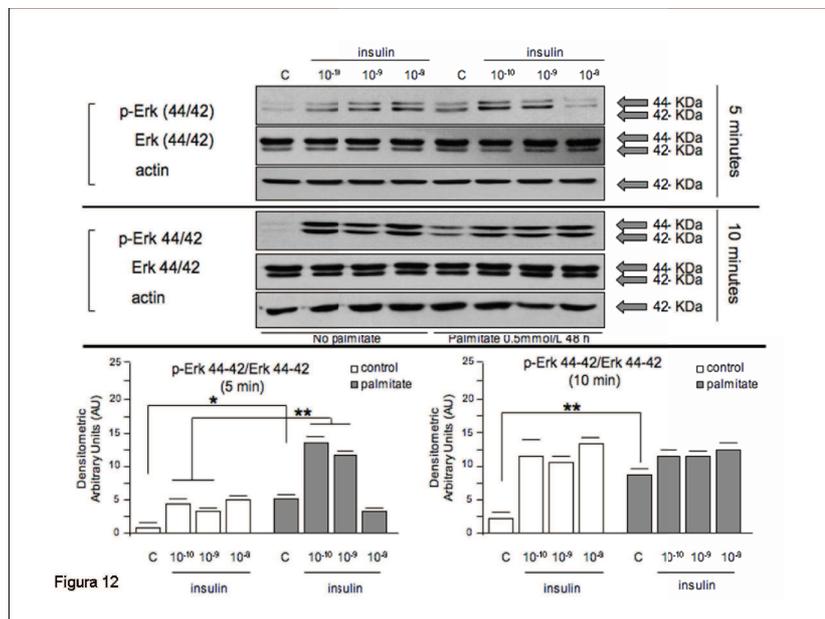


Figura 12

**Analisi Western blot per Erk 44-42-P**

La figura mostra alcuni esperimenti rappresentativi per Erk 44-42-P (con Erk 44/42 totale e actina), esposti ad insulina per 5 e 10 minuti.

Il pannello inferiore mostra media  $\pm$  ES di 5 differenti esperimenti.

**Effetto del palmitato sull'espressione genica e proteica di Pax6 e Glucagone**

La via di MAPK è in grado di regolare alcuni fattori trascrizionali, come Pax6, richiesti durante lo sviluppo ontogenetico di alcuni organi, incluso il pancreas e le alfa cellule (33,34). Basandoci su tali evidenze abbiamo analizzato l'espressione di Pax6 tramite Real-Time PCR e Western blot al fine di studiare l'effetto di MAPK su questo fattore di trascrizione.

L'espressione del gene Pax6 era significativamente incrementata nelle colture con palmitato rispetto al controllo ( $p < 0.001$  a 24 h;  $p < 0.05$  a 48h) (fig. 13A), dati confermati anche a livello proteico ( $29.2 \pm 3$  nel gruppo pre-esposto vs.  $3.6 \pm 1$  AU nel gruppo di controllo;  $p < 0.01$ ) (fig. 13B). Poiché Pax6 è un fattore trascrizionale che regola la trascrizione del gene del glucagone, abbiamo misurato i livelli di espressione genica e proteica del Glucagone. L'espressione genica del glucagone risultava significativamente incrementata nelle cellule pre-trattate con palmitato ( $p < 0.001$  a 24 h;  $p < 0.05$  a 48h) (fig. 13A), tale dato è stato confermato anche a livello proteico ( $2.2 \pm 1$  AU nelle cellule  $\alpha$ -TC1 di controllo,  $23.4 \pm 2$  AU ( $n=5$ ;  $p < 0.01$ ) nelle cellule pre-esposte a FFA) (fig. 13B).

Per verificare se veramente MAPK era in grado di controllare Pax6, abbiamo bloccato la via di MAPK con specifici inibitori di MEK. Abbiamo utilizzato uno specifico inibitore della via di MAPK, UO126, in grado di inibire selettivamente MEK. Come atteso UO126 inibiva la fosforilazione sia di Erk 44/42 sia di p38 (fig. 14). Una volta dimostrata l'efficienza di tale inibitore abbiamo analizzato l'espressione proteica di Pax6 e Glucagone. I dati mostravano una riduzione dell'espressione di entrambe le proteine nelle cellule trattate con FFA (fig. 14). Per validare ulteriormente i dati abbiamo utilizzato un secondo inibitore delle MAPKs, PD98059, che ha confermato ulteriormente i dati ottenuti in precedenza. L'inibizione della fosforilazione di Erk 44/42 determinava una diminuzione della fosforilazione di p38 e della trascrizione della proteina del glucagone sia in condizioni basali sia sotto stimolazione con insulina (5 minuti a concentrazione di  $10^{-9}$  M) (fig. 15). L'utilizzo degli inibitori UO126 e PD98059 non influenzava il segnale insulinico da IR-P/IRS-1P/AKT-P né la vitalità cellulare (dati non mostrati).

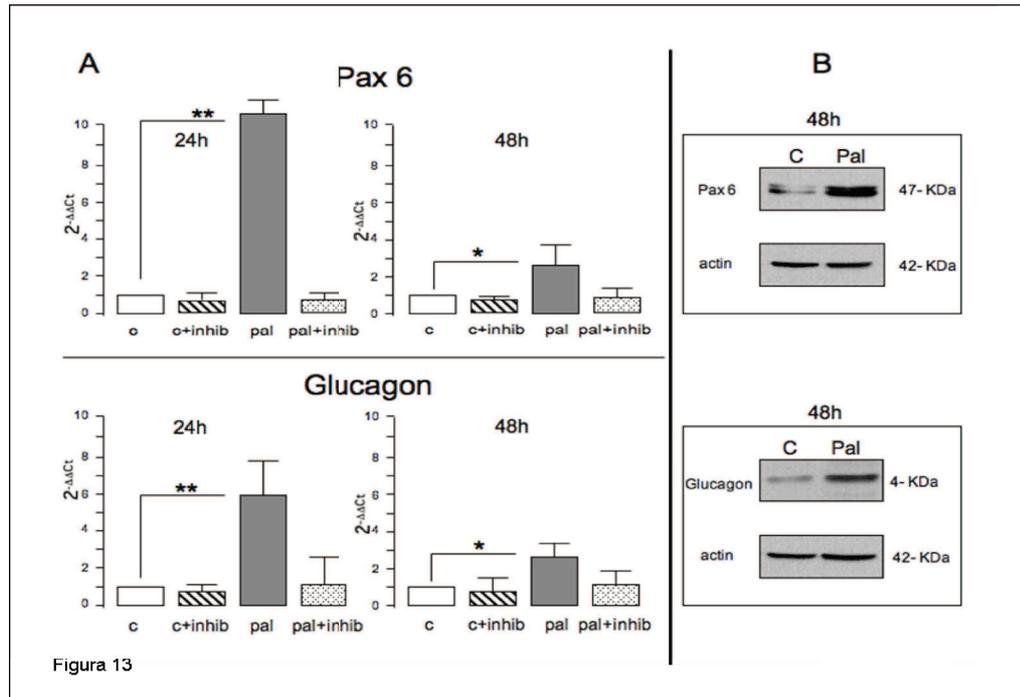


Figura 13

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

(A) I grafici mostrano media  $\pm$  SE di 5 esperimenti diversi per l'espressione genica pax6 e glucagone dopo 24 (a sinistra) o 48 h (parte destra) di esposizione palmitato.

"C" indica i gruppi coltivati in assenza di palmitato, "Pal" indica i gruppi cresciuti in presenza di palmitato 0,5 mmol / L per 24 o 48 h.

"C + Inhib" e "+ pal Inhib" indicano i gruppi che hanno ricevuto inibitore di

MEK (UO126) 25 $\mu$ mol / L, con o senza pre-esposizione a palmitato. \* p < 0.05, \*\* p < 0.001 vs controllo.

(B) La figura mostra esperimenti rappresentativi per l'espressione della proteina di Pax 6 e glucagone nelle cellule di controllo e in cellule pre-esposte palmitato (48 h). La parte superiore mostra Pax 6 e l'espressione di actina in gruppi di controllo ed esposti a palmitato. La parte inferiore mostra l'espressione di glucagone e la normalizzazione per actina.

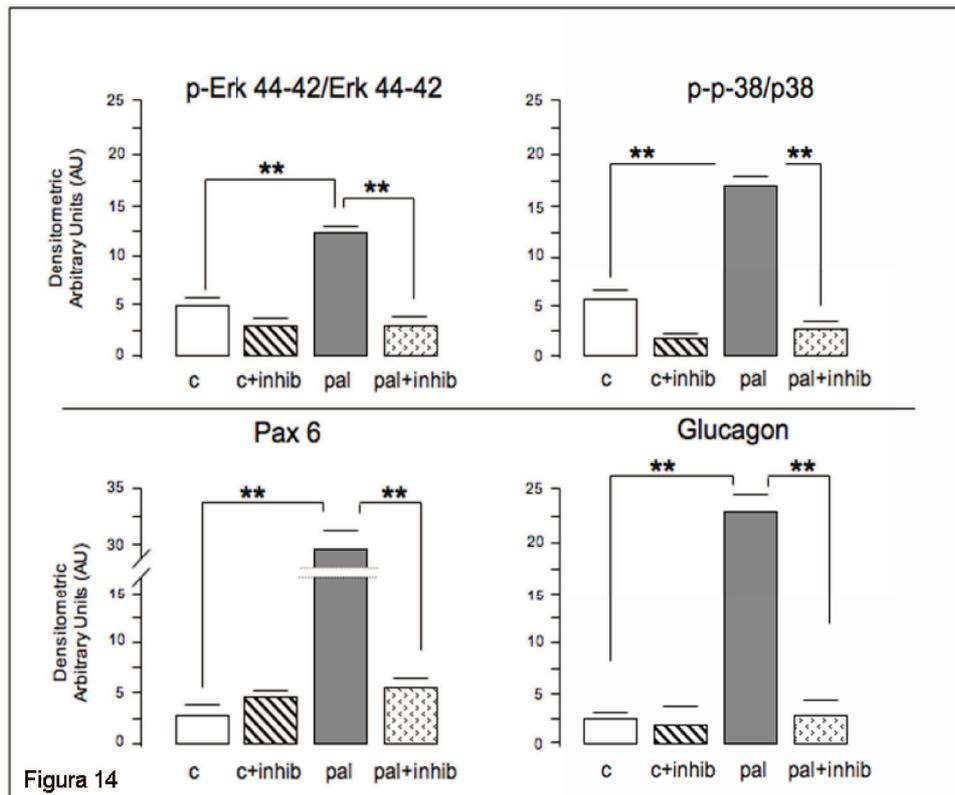


Figura 14

**analisi Western blot della fosforilazione di Erk 44/42, fosforilazione di MAPK p38, PAX 6 e l'espressione della proteina glucagone, prima e dopo il trattamento con l'inibitore MEK (UO126):**

Rappresentazione grafica per P-Erk 44/42, p38-P, Pax 6 e le espressioni della proteina glucagone, nelle cellule di controllo (c) e nelle cellule pre-esposte a palmitato (pal), in assenza o in presenza di inibitore UO126 (Inhib).

I valori sono la media  $\pm$  SE di 5 esperimenti differenti. \*\* P < 0,01.

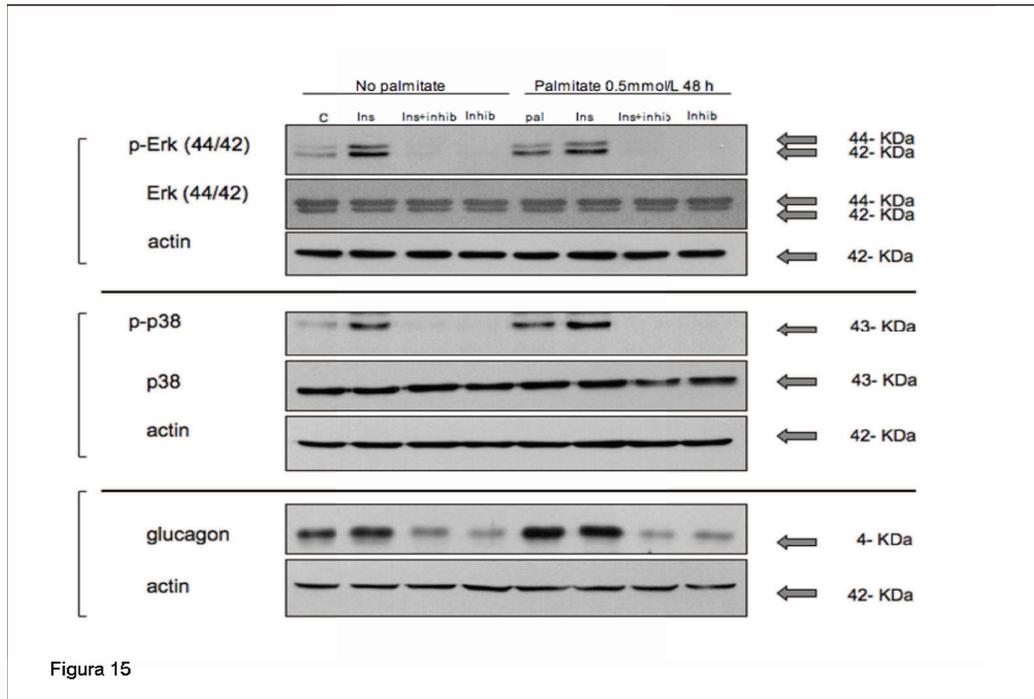


Figura 15

Figura 15

**Analisi Western blot della fosforilazione di Erk 44/42, fosforilazione di MAPK p38 e l'espressione della proteina glucagone, prima e dopo il trattamento con l'inibitore PD 98059:**

La figura mostra alcuni esperimenti rappresentativi per P-Erk 44/42, p38-P, Pax 6 e le espressioni della proteina glucagone, in controllo (c) e nelle cellule pre-esposte a palmitato (pal), in assenza o in presenza di inibitore PD 98059 50 $\mu$ mol/L (inhib) ed in presenza o in assenza di insulina 10<sup>-9</sup> M ("ins" and "ins+inhib").

I valori sono la media  $\pm$  SE di 5 esperimenti differenti. \*\* P <0,01.

## ***Discussioni***

Lo scopo del nostro progetto è stato quello di studiare la secrezione di glucagone ed il segnale insulinico in una linea di alfa cellule pancreatiche murine,  $\alpha$ -TC1, esposte cronicamente (48 h) ad alte concentrazioni di palmitato (0.5 mmol/L). Queste cellule possiedono il vantaggio, rispetto alle isole primarie, di essere una popolazione cellulare omogenea e di essere state utilizzate in precedenza per studiare la secrezione di glucagone e l'espressione genica (16,35-38).

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

Lo studio è stato condotto analizzando, a partire dai recettori IR, la via metabolica e la via proliferativa del segnale insulinico intracellulare; i dati hanno evidenziato una riduzione della fosforilazione di IR, IRS-1, PI3K e Akt nelle cellule pre-trattate con palmitato ed in contrasto un incremento dell'attività intracellulare mitogenica di MAPK, Pax6 e Glucagone.

L'iper-attivazione della via mitogenetica è stata osservata anche in condizioni basali, cioè in assenza di stimolazione insulinica; tale

dato potrebbe essere spiegato con l'attivazione del recettore dell'IGF-1.

Sebbene vi sia un continuo dibattito sui fattori chiave che modulano la secrezione del glucagone è certo che gli ormoni secreti dai componenti dell'isola pancreatica, inclusa l'insulina, giocano probabilmente un ruolo importante (39).

La presenza dei recettori insulinici sull'alfa cellula pancreatica è la loro importanza è stata descritta ampiamente (35,18). L'attivazione del recettore permette la fosforilazione e la conseguente attivazione di diversi substrati molecolari intracellulari, tra questi IRS-1 e IRS-2, che sembrano essere le principali molecole adattatrici implicate sia nel legame con PI3K sia nel segnale intracellulare di MAPK. L'insulina inibisce la secrezione di glucagone probabilmente tramite l'attivazione dei canali  $K^+$  ATP-dipendenti ( $K_{ATP}$ -channel); ciò determina l'iperpolarizzazione della membrana plasmatica ed il blocco della secrezione di glucagone (40). Nelle alfa cellule murine, l'insulina agisce riducendo la sensibilità dei canali  $K^+$ <sub>ATP</sub>, i quali si attivano a concentrazioni più alte di ATP, attraverso un segnale mediato dall'attivazione di PI3K-Akt (phosphatidylinositol 3-kinase) (41,42). Inoltre è stato riportato che nelle cellule alfa, l'insulina attiva i recettori GABA<sub>A</sub> attraverso la via dipendente

dall'AKT Kinase; ciò determina l'iperpolarizzazione e l'inibizione della secrezione di glucagone (43). Anche se non è stato univocamente dimostrato il contributo relativo dei canali  $K_{ATP}$  e dell'attivazione del recettore  $GABA_A$  nell'inibizione del rilascio di glucagone, è probabile che questo effetto sia mediato dalla via PI3K/AKT chinasi.

Pertanto, nelle alfa cellule pancreatiche l'attivazione della via di IR/IRS1/PI3K/AKT potrebbe condurre ad una iperpolarizzazione della membrana cellulare ed una riduzione della secrezione di glucagone (44). Ulteriori dati, a supporto della tesi per cui l'insulina ed il suo recettore regolano il rilascio del glucagone, provengono da studi condotti su modelli animali knock-out per il recettore insulinico a livello delle cellule alfa ( $\alpha$ IRKO). In questo modello in vivo, la mancanza di recettore insulinico nelle alfa cellule è associato ad una iperglucagonemia, intolleranza al glucosio, iperglicemia durante i pasti ed elevata secrezione di glucagone in risposta alla stimolazione con L-arginina (45,46). Nel nostro modello, abbiamo dimostrato che l'esposizione a palmitato inibisce la fosforilazione di IR, IRS-1, PI3K e AKT e che questi effetti sono associati con un incremento della secrezione di glucagone. Noi abbiamo ipotizzato che l'esposizione a palmitato induce insulino-

resistenza della via di IR, IRS-1, PI3K e AKT ed attraverso questo meccanismo si potrebbe incrementare la secrezione di glucagone.

Questo studio risulta particolarmente interessante perché la stimolazione con palmitato nelle  $\alpha$ -TC1 ha evidenziato un significativo aumento dell'attività della via intracellulare di MAPK rispetto al controllo, anche in assenza di stimolazione insulinica.

Per cercare di capire il motivo di tale attivazione in presenza di insulino-resistenza, abbiamo studiato la fosforilazione di IGF-1. I nostri dati hanno messo in evidenza un elevato livello di attivazione del recettore dell'IGF-1 nelle cellule pre-trattate con palmitato rispetto alle cellule di controllo; questo potrebbe spiegare l'attivazione a livello intracellulare della via di MAPK. La cascata delle MAPK è organizzata in 3 moduli di 3 proteine kinasi dove MAPK kinase kinase (Raf-1) attiva una MAPK kinase (MEK) che successivamente attiva ERK 44/42 e p38 (47,48), che infine trasloca nel nucleo a fosforila diversi substrati nucleari. È noto inoltre come le MAPK, dopo la loro attivazione, permettono la trascrizione di alcuni fattori trascrizionali implicati nella sintesi proteica. In questo lavoro abbiamo studiato 2 kinasi del segnale di MAPK, Erk 44/42 e p38, trovando un aumento dei loro siti attivi nelle colture cellulari pre-trattate con palmitato. Successivamente la

nostra attenzione si è concentrata su Pax6, fattore trascrizionale attivato dalla p38, che regola l'espressione del gene del glucagone. Pax6 è un membro della famiglia dei geni Pax che contengono un dominio homeo-boxes conservato codificante per un dominio di legame al DNA (49); in particolare Pax6 è un fattore trascrizionale coinvolto nel normale sviluppo del sistema nervoso centrale, dell'occhio, del naso e del pancreas. È stata accertata la presenza di Pax6 nel pancreas endocrino (50), ed inoltre esso risulta implicato nello sviluppo delle alfa cellule poiché lega gli elementi enhancer del gene del glucagone (51,52). Nel nostro studio abbiamo dimostrato che nelle colture pre-trattate con palmitato, sia Pax6 sia il glucagone, sono significativamente più espressi rispetto alle cellule di controllo.

Abbiamo, inoltre, approfondito la relazione tra MAPK, l'espressione di Pax6 e del glucagone utilizzando due inibitori specifici di MEK, UO126 e PD 98059 (23). I risultati dimostrano, che tramite il blocco specifico di MAPK si riesce a controllare l'espressione di Pax 6 e del glucagone.

In conclusione i nostri dati indicano che le  $\alpha$ -TC1 clone 6, una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche, coltivate per 48 ore in presenza di acidi grassi ad alte concentrazioni di palmitato (0.5

mmol/l) mostrano insulino-resistenza (IRS-1, PI3K e Akt) che normalmente controlla la secrezione di glucagone. Al contrario la via proliferativa (IRS-2/MAPK) risulta attivata anche in assenza di insulina. Tale attivazione avviene probabilmente tramite il coinvolgimento del recettore dell'IGF-1. Attraverso MAPK si assiste ad un incremento dell'espressione di Pax6 e del glucagone. Queste cellule, come evidenziano i risultati ottenuti, sono insulino-resistenti e presentano elevati livelli di secrezione di glucagone. Nei pazienti con diabete mellito tipo 2 la concentrazione plasmatica di glucagone è impropriamente alta negli stati post-prandiali. Il funzionamento di questo meccanismo d'azione non è noto. Questi risultati supportano l'ipotesi che l'esposizione cronica ad acidi grassi potrebbe contribuire all'alterazione della regolazione del rilascio di glucagone. Così, sebbene questi risultati sono stati ottenuti con cellule immortalizzate, essi supportano la possibilità che le alfa cellule pancreatiche potrebbero aggiungersi alla lista di tessuti insulino-resistenti, rendendo ancora più complesso la relazione tra insulino-resistenza e alterazione della funzione dell'isola pancreatica.

## **Bibliografia**

1. **Baetens D, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Orci L** 1979 Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of langerhans. *Science* 206:1323–1325
2. **Wendt A, Birnir B, Buschard K, Gromada J, Salehi A, Sewing S, Rorsman P, Braun M** 2004 Glucose inhibition of glucagon secretion from  $\alpha$ -cells is mediated by GABA released from neighboring  $\alpha$ -cells. *Diabetes* 53:1038–1045
3. **Rorsman P, Berggren PO, Bokvist K, Ericson H, Møller H, Ostenson CG, Smith PA** 1989 Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABA<sub>A</sub>-receptor chloride channels. *Nature* 341:233–236
4. **Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera PL, Wollheim CB** 2003 Islet  $\alpha$ -cell secretion determines glucagon release from neighbouring  $\alpha$ -cells. *Nat Cell Biol* 5:330–335
5. **Hope KM, Tran PO, Zhou H, Oseid E, Leroy E, Robertson RP** 2004 Regulation of  $\alpha$ -cell function by the  $\beta$ -cell in isolated human and rat islets deprived of glucose: the “switch-off” hypothesis. *Diabetes* 53: 1488–1495
6. **Zhou H, Tran PO, Yang S, Zhang T, LeRoy E, Oseid E, Robertson RP** 2004 Regulation of  $\alpha$ -cell function by the  $\beta$ -cell during hypoglycemia in Wistar rats: the “switch-off” hypothesis. *Diabetes* 53: 1482–1487
7. **Raju B, Cryer PE** 2005 Loss of the decrement in intrainlet insulin plausibly explains loss of the glucagon response to hypoglycemia in insulin-deficient diabetes: documentation of the intrainlet insulin hypothesis in humans. *Diabetes* 54:757–764
8. **Unger RH, Orci L** 1975 The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet* 1:14–16

9. **Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY** 2001 Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on  $\beta$ -cell turnover and function. *Diabetes* 50:69–76
10. **Kharroubi I, Ladrière L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL** 2004 Free fatty acids and cytokines induce pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor- $\kappa$ B and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145:5087–5096
11. **Hong J, Jeppesen PB, Nordestoft I, Hermansen K** 2007 Fatty acid-induced effect on glucagon secretion is mediated via fatty acid oxidation. *Diabetes Metab Res Rev* 23:202–210
12. **Bollheimer LC, Landauer HC, Troll S, Schweimer J, Wrede CE, Schöneringer J, Büttner R** 2004 Stimulatory short-term effects of free fatty acids on glucagon secretion at low to normal glucose concentrations. *Metabolism* 53:1443–1448
13. **Olofsson CS, Salehi A, Göpel SO, Holm C, Rorsman P** 2004 Palmitate stimulation of glucagon secretion in mouse pancreatic  $\beta$ -cells results from activation of L-type calcium channels and elevation of cytoplasmic calcium. *Diabetes* 53:2836–2843
14. **Collins SC, Salehi A, Eliasson L, Olofsson CS, Rorsman P** 2008 Long-term exposure of mouse pancreatic islets to oleate or palmitate results in reduced glucose-induced somatostatin and oversecretion of glucagon. *Diabetologia* 51:1689–1693
15. **Wrede CE, Büttner R, Wobser H, Ottinger I, Bollheimer LC** 2007 Systematic analysis of the insulinotropic and glucagonotropic potency of saturated and monounsaturated fatty acid mixtures in rat pancreatic islets. *Horm Metab Res* 39:482–488
16. **Hong J, Abudula R, Chen J, Jeppesen PB, Dyrskog SE, Xiao J, Colombo M, Hermansen K** 2005 The short-term effect of fatty acids on

glucagon secretion is influenced by their chain length, spatial configuration, and degree of unsaturation: studies in vitro. *Metabolism* 54:1329–1336

17. **Hong J, Jeppesen PB, Hermansen K** 2009 Effects of elevated fatty acid and glucose concentrations on pancreatic islet function in vitro. *Diabetes Obes Metab* 11:397–404

18. **Franklin I, Gromada J, Gjinovci A, Theander S, Wollheim CB** 2005  $\beta$ -Cell secretory products activate  $\beta$ -cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes* 54:1808–1815

19. **Hamaguchi K, Leiter EH** 1990 Comparison of cytokine effects on mouse pancreatic  $\beta$ -cell and  $\alpha$ -cell lines. Viability, secretory function, and MHC antigen expression. *Diabetes* 39:415–425

20. **Hamaguchi K, Utsunomiya N, Takaki R, Yoshimatsu H, Sakata T** 2003 Cellular interaction between mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines: possible contact-dependent inhibition of insulin secretion. *Exp Biol Med (Maywood)* 228:1227–1233

21. **Xiao J, Gregersen S, Kruhøffer M, Pedersen SB, Ørntoft TF, Hermansen K** 2001 The effect of chronic exposure to fatty acids on gene expression in clonal insulin-producing cells: studies using high density oligonucleotide microarray. *Endocrinology* 142:4777–4784

22. **Hong J, Chen L, Jeppesen PB, Nordentoft I, Hermansen K** 2006 Stevioside counteracts the  $\beta$ -cell hypersecretion caused by long-term palmitate exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E416–E422

23. **Schuh K, Pahl A** 2009 Inhibition of the MAP kinase ERK protects from lipopolysaccharide-induced lung injury. *Biochem Pharmacol* 77:1827–1834

24. **Wang H, Wang AX, Liu Z, Barrett EJ** 2008 Insulin signaling stimulates insulin transport by bovine aortic endothelial cells. *Diabetes* 57:540–547

25. **Bradford MM** 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254

26. **Malaguarnera R, Vella V, Pandini G, Sanfilippo M, Pezzino V, Vigneri R, Frasca F** 2008 TAp73 \_ increases p53 tumor suppressor activity in thyroid cancer cells via the inhibition of Mdm2-mediated degradation. *Mol Cancer Res* 6:64–77
27. **Ogawa W, Matozaki T, Kasuga M** 1998 Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling. *Mol Cell Biochem* 182:13–22
28. **White MF** 1998 The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 182:3–11
29. **Lavan BE, Kuhne' MR, Garner CW, Anderson D, Reedijk M, Pawson T, Lienhard GE** 1992 The association of insulin-elicited phosphotyrosine proteins with src homology 2 domains. *J Biol Chem* 267:11631–11636
30. **Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, Yoakim M, Schaffhausen B, Shoelson S, Cantley LC** 1993 Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J Biol Chem* 268:9478–9483
31. **Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M** 1997 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7:776–789
32. **Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM** 2005 Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098–1101
33. **Prasadan K, Daume E, Preuett B, Spilde T, Bhatia A, Kobayashi H, Hembree M, Manna P, Gittes GK** 2002 Glucagon is required for early insulin-positive differentiation in the developing mouse pancreas. *Diabetes* 51:3229–3236
34. **Mikkola I, Bruun JA, Bjorkoy G, Holm T, Johansen T** 1999 Phosphorylation of the transactivation domain of Pax6 by extracellular signal-

regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 274:15115–15126

35. **Kisanuki K, Kishikawa H, Araki E, Shirota T, Uehara M, Isami S, Ura S, Jinnouchi H, Miyamura N, Shichiri M** 1995 Expression of insulin receptor on clonal pancreatic  $\beta$  cells and its possible role for insulin-stimulated negative regulation of glucagon secretion. *Diabetologia* 38:422–429

36. **McGirr R, Ejbick CE, Carter DE, Andrews JD, Nie Y, Friedman TC, Dhanvantari S** 2005 Glucose dependence of the regulated secretory pathway in  $\beta$ TC1–6 cells. *Endocrinology* 146:4514–4523

37. **Mizusawa N, Hasegawa T, Ohigashi I, Tanaka-Kosugi C, Harada N, Itakura M, Yoshimoto K** 2004 Differentiation phenotypes of pancreatic islet  $\beta$ - and  $\delta$ -cells are closely related with homeotic genes and a group of differentially expressed genes. *Gene* 331:53–63

38. **Wang J, Webb G, Cao Y, Steiner DF** 2003 Contrasting patterns of expression of transcription factors in pancreatic  $\beta$  and  $\delta$  cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12660–12665

39. **Gromada J, Franklin I, Wollheim CB** 2007  $\beta$ -Cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* 28:84–116

40. **Rorsman P, Salehi SA, Abdulkader F, Braun M, MacDonald PE** 2008 K(ATP)-channels and glucose-regulated glucagon secretion. *Trends Endocrinol Metab* 19:277–284

41. **Leung YM, Ahmed I, Sheu L, Gao X, Hara M, Tsushima RG, Diamant NE, Gaisano HY** 2006 Insulin regulates islet  $\beta$ -cell function by reducing K(ATP) channel sensitivity to adenosine 5'-triphosphate inhibition. *Endocrinology* 147:2155–2162

42. **Khan FA, Goforth PB, Zhang M, Satin LS** 2001 Insulin activates ATP-sensitive K<sub>v</sub> channels in pancreatic  $\beta$ -cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Diabetes* 50:2192–2198

43. **Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, Liu S, Wendt A, Deng S, Ebina Y, Wheeler MB, Braun M, Wang Q** 2006 Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABA receptor system. *Cell Metab* 3:47–58
44. **Dunning BE, Gerich JE** 2007 The role of  $\beta$ -cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev* 28:253–283
45. **Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J, Liew CW, Shih JL, Ford EL, Herrera PL, Polonsky KS, McGuinness OP, Kulkarni RN** 2009 Insulin signaling in  $\beta$  cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell Metab* 9:350–361
46. **Gromada J, Duttaroy A, Rorsman P** 2009 The insulin receptor talks to glucagon? *Cell Metab* 9:303–305
47. **Robinson MJ, Cobb MH** 1997 Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:180–186
48. **Marshall CJ** 1994 MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 4:82–89
49. **Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van Heyningen V, Hastie ND, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, et al** 1991 Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67:1059–1074
50. **Turque N, Plaza S, Radvanyi F, Carriere C, Saule S** 1994 Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol Endocrinol* 8:929–938
51. **St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P** 1997 Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing  $\beta$ -cells in mouse pancreas. *Nature* 387:406–409
52. **Sander M, Neuber A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS** 1997 Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal

Dottorato di ricerca in Scienze Endocrinologiche: Basi molecolari dell'azione  
Ormonale. Dr.ssa Maniscalchi Eugenia Tiziana **Maniscalchi Eugenia Tiziana**

Bibliografia

transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev*  
11:1662–1673

## Ringraziamenti

Un sentito e doveroso ringraziamento va al Prof. Francesco Purrello per essere stata la mia guida nella realizzazione di questo progetto di ricerca e per avermi trasmesso la passione per la ricerca.

Un doveroso ringraziamento va alla Prof.<sup>ssa</sup> MA Rabuazzo e Dr. S. Piro per la sua continua disponibilità.

Ringrazio il Dott. G. Pandini per gli utili suggerimenti, sia in campo pratico che teorico e per aver cercato di trasferirmi tutte le sue conoscenze con estrema generosità.

Ringrazio con affetto tutti i colleghi la Dott.<sup>ssa</sup> A. Monello, L. Mascali, L. Iacoviello, F. Urbano.

Grazie a tutti i miei parenti e amici che mi hanno appoggiato nei momenti di maggiore difficoltà.

Le persone cui rivolgo un particolare e meritato ringraziamento sono i miei genitori per la pazienza e l'affetto dimostratimi .