

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN:
BIOLOGIA, GENETICA UMANA E BIOINFORMATICA:
BASI CELLULARI E MOLECOLARI DEL FENOTIPO
XXV Ciclo
COORDINATORE: PROF. MICHELE PURRELLO

DOTT.SSA FRANCESCA URBANO

**ALTERAZIONI SECRETORIE NEL DIABETE.
OLTRE L'INSULINA:
RUOLO DELLE ALFA CELLULE PANCREATICHE E DELLE L
CELLULE INTESTINALI.**

TESI DI DOTTORATO

Relatore:

Chiar.mo Prof. Francesco Purrello

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

| | |
|--|--------|
| INDICE | |
| INTRODUZIONE | pag.6 |
| ILDIABETE MELLITO | pag.7 |
| Definizione e Classificazione | pag.7 |
| Patogenesi del Diabete Mellito di Tipo 2 (DMT2) | pag.10 |
| Ruolo dell'Asse Incretinico | pag.13 |
| | |
| BIOLOGIA DELL'ISOLA PANCREATICA | pag.16 |
| Cenni anatomici | pag.16 |
| Aspetti Fisiologici di Beta ed Alfa Cellule | pag.19 |
| • Beta-Cellula Pancreatica | pag.19 |
| • Vie del Segnale Insulinico Intracellulare | pag.22 |
| • Alfa-Cellula Pancreatica | pag.24 |
| | |
| LE INCRETINE | pag.30 |
| La Cellula L intestinale | pag.32 |
| Captazione dei Nutrienti | pag.34 |
| Il Sistema Glucosensorio | pag.35 |
| • Chiusura Dei Canali K_{ATP} | |
| Meccanismo Dipendente dal Metabolismo del Glucosio | pag.35 |
| • Attività Dei Trasportatori Sodio-Glucosio | |
| Meccanismo Indipendente dal Metabolismo del Glucosio | pag.36 |
| Effetti del Glp-1 | pag.37 |
| La Terapia basata sulle Incretine | pag.40 |

| | |
|---|---------|
| PROGETTI SCIENTIFICI | pag.42 |
| L'esposizione cronica al GLP-1 incrementa la sintesi ed il rilascio di GLP-1 in una linea di alfa cellule pancreatiche (α -TC1): evidenze di un effetto diretto del GLP-1 sulle alfa-cellule pancreatiche | pag.44 |
| | |
| L'esposizione cronica ad alti livelli di glucosio riduce la secrezione di GLP-1 in una linea di L cellule intestinali (GLUTag): ruolo dell'ATP e della proteina disaccoppiante-2 (UCP-2) | pag.70 |
| | |
| CONCLUSIONI | pag.90 |
| PRODUZIONE SCIENTIFICA | pag. 94 |
| BIBLIOGRAFIA | pag.96 |

INTRODUZIONE

IL DIABETE MELLITO

Definizione e Classificazione

Con il termine di “diabete mellito” si indica un disordine metabolico, ad eziologia multipla, caratterizzato da iperglicemia cronica con alterazioni del metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine, derivante da difetti della secrezione insulinica, dell'azione dell'insulina o di entrambe queste condizioni [1]. Il termine “diabete” deriva dall'etimo greco $\delta\iota\alpha\text{-}\beta\alpha\iota\nu\omega$, “passo attraverso”, ed indica il passaggio del glucosio ematico, per mezzo della filtrazione glomerulare, nella preurina in quantità decisamente superiori alle capacità riassorbitive tubulari. Solo successivamente è stato aggiunto il termine “mellitus” che in latino ha il significato di “dolce come il miele”, in riferimento all'antica consuetudine di tastare il sapore delle urine dei pazienti diabetici.

Il diabete nel corso della storia moderna è stato variamente classificato; l'età di insorgenza, il tipo di trattamento o le fasi della vita del soggetto hanno rappresentato aspetti classificativi della patologia. Solo dal 1997 (ADA 1997 Diabetes Care) l'American Diabetes Association (ADA) ha riclassificato il diabete mellito in base al meccanismo patogenetico (Tabella 1). Sulla base di questa classificazione ancora attuale [2], le categorie maggiori sono il Diabete Mellito di tipo 1 e quello di tipo 2. Il 5% della popolazione dei soggetti diabetici è affetta da Diabete mellito di tipo 1 (DMT1), caratterizzato dalla distruzione delle β cellule pancreatiche per fenomeni autoimmunitari e dal conseguente deficit insulinico; la distruzione può essere su base autoimmune (1A) o con caratteristiche meno note definite idiopatiche (1B). Il 90% circa della popolazione dei soggetti diabetici è invece affetta da Diabete mellito di

tipo 2 (DMT2), contraddistinto principalmente da difetti di azione dell'insulina a livello dei tessuti bersaglio (insulino-resistenza) che conducono ad un progressivo deficit secretorio di insulina nel tempo. Risulta tuttavia evidente come questa classificazione, seppur corretta nella divisione etiopatogenetica, presenta limiti e imprecisioni. Come in ogni categoria di patologie esistono sempre sottogruppi di pazienti poco classificabili e con caratteristiche eterogenee. Negli ultimi anni infatti vengono riconosciuti sottogruppi di pazienti con diabete di tipo 2 che presentano anche caratteristiche del diabete di tipo 1 e viceversa. Queste sottoclassi vengono riconosciute come categorie indipendenti (es. diabete LADA o NIRAD) e permettono programmi terapeutici differenziati e personalizzati.

Oltre al diabete di tipo 1 e di tipo 2, altre forme di diabete sono note e riconosciute come differenti dalle forme “classiche”. Tra queste per esempio il diabete gestazionale (DMG) che interessa una fase precisa della vita riproduttiva della donna e coinvolge dall'1 al 14% di tutte le gravidanze [3]. Questa forma di diabete in genere regredisce al termine della stessa gravidanza.

Esistono altre specifiche tipologie di diabete dovute a diverse cause, ad esempio difetti della funzione cellulare o dell'attività insulinica su base genetica, malattie del pancreas esocrino (come la fibrosi cistica) e danni indotti da farmaci o sostanze chimiche (come nelle terapie dell'AIDS o a seguito di trapianti d'organo).

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

Tabella 1 - Classificazione eziologica del diabete mellito (American Diabetes Association, Standards of medical care in Diabetes – 2013)

Patogenesi del Diabete Mellito di Tipo 2 (DMT2)

I fattori che tradizionalmente sono riconosciuti come essenziali nella patogenesi del diabete mellito di tipo 2 sono il deficit della secrezione insulinica e l'insulino-resistenza; da questi due derivano essenzialmente l'eccessiva produzione epatica di glucosio e le alterazioni nel metabolismo dei lipidi [4-6]. Oggi è noto che la regolazione della concentrazione plasmatica di glucosio nell'uomo, indice della sua disponibilità cellulare, è un meccanismo estremamente complesso, finemente regolato da molteplici ormoni e neurotrasmettitori. Particolare importanza rivestono i due principali ormoni prodotti rispettivamente da beta e alfa cellule pancreatiche: insulina, ad attività ipoglicemizzante e glucagone, ad attività iperglicemizzante. L'equilibrio fra le azioni di queste due sostanze consente il mantenimento di adeguati valori di glucosio plasmatico ed una ottimale regolazione metabolica dell'intero organismo [7].

Negli ultimi anni diversi studi hanno dimostrato che esiste un'interazione reciproca tra i due ormoni. Questo aspetto era già stato descritto nel 1975 da Unger R.H. e Orci L. i quali formularono l' "ipotesi bi-ormonale". In questa sottolinearono la criticità del rapporto insulinemia/glucagonemia per la regolazione del metabolismo glucidico a livello epatico ed evidenziarono come l'alterazione di questo equilibrio era responsabile dell'aumentata produzione epatica di glucosio caratteristica del soggetto diabetico [8]. Questa ipotesi tuttavia è stata trascurata per decenni e lo studio del diabete è stato prevalentemente indirizzato verso la comprensione dei meccanismi fisiopatologici della disfunzione beta cellulare. Nell'ultimo decennio la scoperta e lo studio di ormoni prodotti dall'intestino e attivi sull'isola pancreatica ha permesso la riscoperta anche delle altre popolazioni dell'isola

pancreatica e ha rivalutato l'ipotesi "bi-ormonale" di Unger e Orci ed in particolare il ruolo del glucagone nella patogenesi del diabete. Per queste ragioni, la comprensione della patogenesi del DM2 non può prescindere dallo studio delle alterazioni secretorie del glucagone, e di tutte le condizioni che in corso di diabete inducono alterazioni funzionali anche delle alfa cellule pancreatiche. Il diabete costituisce una sindrome complessa, caratterizzata da significative correlazioni tra il substrato genetico dell'individuo e l'esposizione a determinati fattori di rischio ambientale, quali l'obesità, l'elevato apporto calorico e l'inattività fisica [9] (Fig.1)

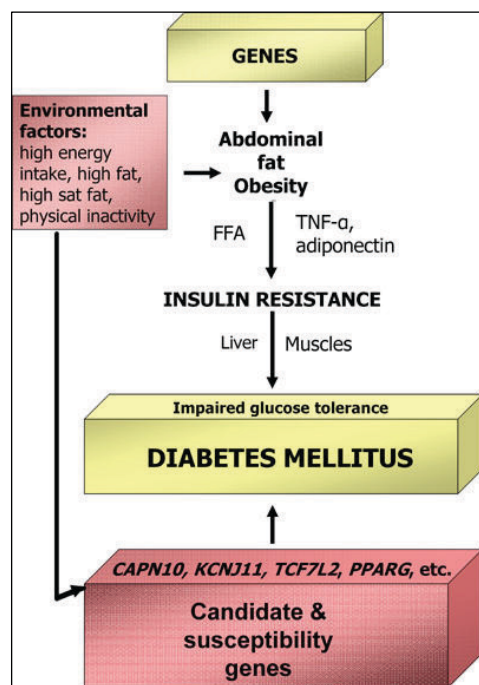


Figura 1 - Interazione tra geni e fattori ambientali nell'insorgenza del DM2 (da Dedoussis GVZ et al. *Rev Diabet Stud.* 2007 Spring;4(1):13-24. Epub 2007 May 10)

L'insulino-resistenza, oltre a rappresentare un difetto molecolare che è determinato da un ridotto effetto dell'azione insulinica a livello periferico sui propri tessuti bersaglio (muscolo, fegato e tessuto adiposo) ha molteplici effetti clinici riscontrabili nei pazienti con questa condizione clinica. Tra questi effetti si sottolineano le alterazioni dell'equilibrio dei carboidrati e dei lipidi a livello dell'organismo. Queste alterazioni sono alla base dello sviluppo delle complicanze vascolari tipiche del paziente con diabete [10].

Nella storia naturale del DM2, la secrezione di insulina compensatoria, attuata dalle beta cellule nel tentativo di controbilanciare l'insulino-resistenza, tenderà progressivamente a non essere adeguata; si osserverà quindi un esaurimento funzionale graduale delle beta cellule che comporterà un deficit di insulina ed il conseguente difficoltoso controllo "fisiologico" della glicemia. La causa di questa graduale disfunzione della beta-cellula non è del tutto nota. Un ruolo importante è indubbiamente svolto dalla lipo e dalla glucotossicità [11].

Queste condizioni sono spesso presenti all'esordio della malattia in molti soggetti, e sono in grado di spiegare molte delle alterazioni funzionali delle isole pancreatiche; dati disponibili in letteratura mettono in evidenza il ruolo di elevati livelli di glucosio e/o acidi grassi (FFA) nella patogenesi del danno che conduce al diabete mellito [12].

La lipo e la glucotossicità potrebbero essere alla base della disfunzione anche delle alfa cellule pancreatiche. Un eccesso di produzione di glucagone da parte delle alfa cellule pancreatiche potrebbe contribuire a sostenere l'iperproduzione epatica di glucosio, riscontrata nei pazienti con diabete, soprattutto a digiuno [13].

Oltre ai fattori suddetti, esiste anche una forte predisposizione genetica. Diversi studi clinici dimostrano che il rischio di sviluppare DMT2 è aumentato quando esiste una storia familiare positiva per la patologia e studi effettuati sui gemelli stimano una concordanza tra il 35% e il 58% nei monozigoti e tra il 17% e il 20% nei dizigoti [14,15].

Ruolo dell'Asse Incretinico

Recentemente sono stati portati alla luce nuovi elementi che sembrano contribuire allo sviluppo del diabete di tipo 2.

Il mondo della ricerca negli ultimi anni ha focalizzato la propria attenzione su nuovi fattori che sembrano giocare un ruolo cruciale nella regolazione glicemica, rivelando in tal modo un quadro molto più complesso di quanto si immaginasse. In particolare, ha riscosso notevole interesse la scoperta del cosiddetto “effetto incretinico”, fenomeno mediante il quale a parità di livelli glicemici raggiunti, un carico orale di glucosio determina una maggiore secrezione insulinica rispetto ad un carico di glucosio praticato per via endovenosa. Tale effetto è principalmente dovuto a due ormoni di origine gastrointestinale, il Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) e il Glucose-dependent Insulinotropic Peptide (GIP), indicati con il termine di “incretine” (Intestin secretion insulin), prodotti rispettivamente dalle cellule L e K dell'intestino. Essi vengono rilasciati in circolo in risposta ad un pasto e risultano capaci di amplificare la secrezione insulinica glucosio-indotta [16]. L'identificazione di tali ormoni, ha fatto riscoprire un ruolo endocrino per l'intestino.

Il ruolo dell'asse incretinico nella patogenesi del diabete è stato dimostrato attraverso dati che documentano la presenza di un ridotto effetto incretinico in soggetti con DMT2 [17,18]. Negli ultimi anni si è dibattuto se il difetto

secretorio e di azione di questi ormoni gastrointestinali sia un difetto geneticamente indotto o derivante dai fattori ambientali ai quali il soggetto con diabete è esposto. Seppur in atto non esistano dati certi, è ampiamente accettato che la perdita della funzionalità dell'asse incretinico sia secondaria all'instaurarsi del diabete e quindi secondaria all'esposizione di fattori ambientali [19]; risulta dunque interessante cercare di capire in quale momento della storia naturale della malattia questo deficit si sviluppi e cosa lo determini con precisione.

Inoltre risulta ancora poco chiaro se il difetto dell'effetto incretinico sia legato ad una carenza di ormone circolante o piuttosto ad una resistenza alla sua azione per difetto recettoriale o post-recettoriale, così come descritto per esempio per l'insulina. In uno studio condotto da Jensen et al. [20], si osserva come l'induzione farmacologica di uno stato di insulino-resistenza in soggetti sani sia capace di determinare un significativo decremento dell'effetto incretinico, mentre la funzione beta-cellulare rimane inalterata; questo lavoro ha dimostrato come la riduzione dell'effetto incretinico sia da ritenersi un fattore acquisito piuttosto che un fattore geneticamente ereditato.

Tuttavia sembra che anche la predisposizione genetica possa in parte essere correlata con l'alterata azione delle incretine nei pazienti diabetici. I polimorfismi del gene TCF7L2 sembrano contribuire allo sviluppo del DMT2 ed alcune varianti polimorfiche di questo gene sono state associate ad un ridotto effetto incretinico nei soggetti con diabete.

La scoperta degli ormoni incretinici, la loro capacità di influenzare la funzione dell'isola pancreatica, di migliorare la secrezione insulinica e la sopravvivenza della beta cellula, hanno apportato nuove conoscenze nel campo del diabete e hanno ampliato i confini della cura del diabete mellito. Oggi, rispetto al

passato, disponiamo di più ampi confini culturali e di nuove prospettive di ricerca. Questi ormoni inoltre rappresentano nuove armi terapeutiche per la cura del diabete mellito.

BIOLOGIA DELL'ISOLA PANCREATICA

Cenni Anatomici

Il pancreas è una ghiandola a struttura polilobulata ed è costituita da due componenti: una porzione esocrina, costituita da cellule acinose deputate alla sintesi di enzimi digestivi che, tramite un sistema di condotti, si svuotano a livello dell'intestino tenue; ed una porzione endocrina, composta da circa un milione di "Isole di Langherans", ammassi cellulari (diametro: 100 μm) di forma tondeggianti, che appaiono come aggregati cellulari in mezzo al parenchima esocrino. Le isole non possiedono vasi linfatici ma sono percorse da un fitto plesso di capillari fenestrati in cui riversano i loro ormoni; inoltre possiedono una ricca innervazione e quasi tutte le cellule sono a contatto con almeno un capillare ematico [21].

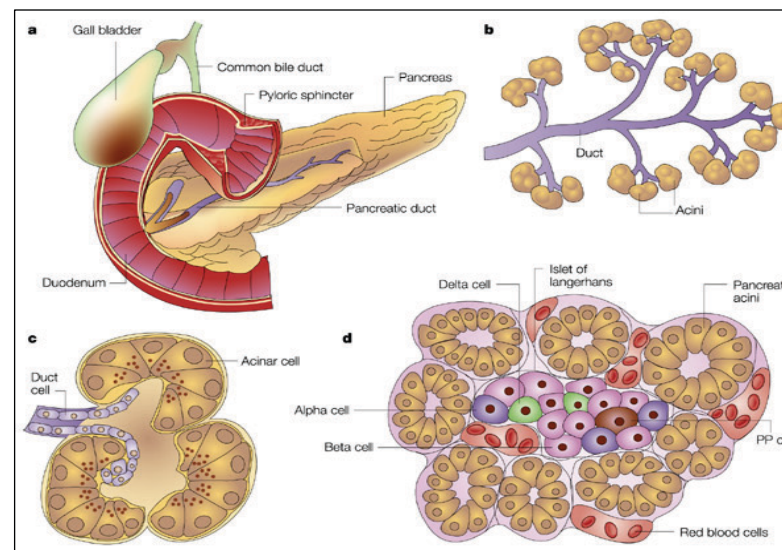


Figura 2 – Il pancreas a) immagine in toto della ghiandola, b, c) porzione esocrina composta da ghiandole tubulo acinose a secrezione sierosa, d) porzione endocrina, isola di Langherans circondata da acini esocrini (da Bardeesy N, DePinho RA. Nature reviews Cancer 2002, 2(12):897-909).

Ogni **Isola di Langherans** rappresenta un organo endocrino indipendente, capace di riversare il prodotto della secrezione (ormone) direttamente nel circolo generale (Fig. 3); ogni isola è costituita da almeno cinque diverse tipologie di cellule endocrine, ciascuna delle quali secerne ormoni che contribuiscono alla regolazione generale del metabolismo energetico ed in particolare del glucosio. I principali fenotipi cellulari comprendono:

Beta-cellule, secernenti insulina, che rappresentano il 70-80% delle cellule delle isole pancreatiche nell'uomo;

Alfa-cellule, produttori glucagone, che rappresentano il 20% del totale delle cellule;

Cellule Delta e PP, secernenti rispettivamente somatostatina e polipeptide pancreatico, costituiscono nel complesso solo l'1% della struttura delle isole;

Cellule Epsilon, produttori grelina [22].

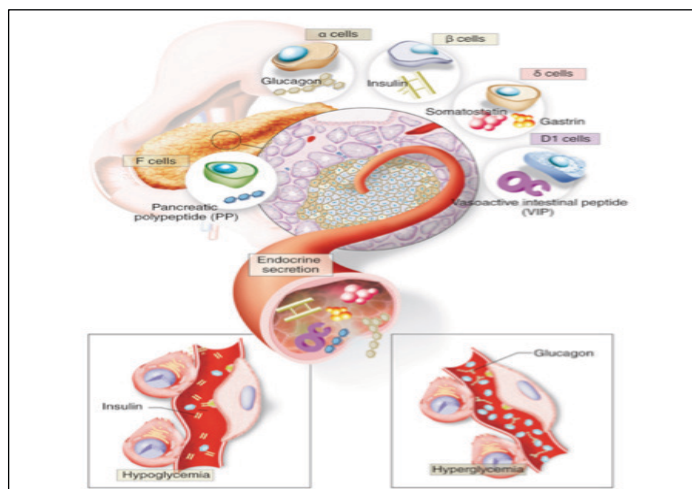


Figura 3 - Immagine rappresentativa isola pancreatiche e secrezione (da www.ec-europe.com)

Studi recenti hanno dimostrato che nelle isole umane queste cellule sono disperse, quindi non presentano la tipica disposizione ordinata che è stata individuata invece nelle isole dei roditori, nelle quali si distingue una “distribuzione a rosetta” caratterizzata da un core centrale formato da beta-cellule e un mantello costituito da alfa- e delta-cellule. Nelle isole umane le cellule invece si dispongono in prossimità dei vasi sanguigni senza un ordine preciso[23]. Ciascuna isola è rifornita da una ricca rete vascolare così da poter percepire in maniera molto precisa i cambiamenti del circostante ambiente arterioso e l'entità del flusso ematico. Questa differente distribuzione potrebbe comportare una differente modalità di funzionamento e di comunicazione tra cellula e cellula; se nei roditori è possibile immaginare un'azione endocrina tra cellule beta e non-beta, nell'uomo, oltre all'effetto endocrino, potrebbero esistere anche effetti paracrini o merocrini, che renderebbero il sistema più complesso [24]. Negli ultimi anni, inoltre, è stato dimostrato come le interazioni cellula-cellula all'interno dell'isola rivestano un ruolo importante per la secrezione generale dei polipeptidi provenienti dall'isola stessa e studi effettuati su isole intere o su singole cellule disperse mostrano profili secretori differenti, in particolare riguardo alla secrezione di glucagone [25]. Allo stesso modo, anche l'innervazione risulta particolarmente rappresentata, in particolare quella di pertinenza del sistema vegetativo: sono stati individuati diversi tipi di cellule sensibili all'azione dei neurotrasmettitori, quali acetilcolina, catecolamine e GABA [26].

Aspetti Fisiologici di Beta ed Alfa cellule

Beta-cellula pancreatica

Come accennato in precedenza, le cellule beta rappresentano circa il 70-80% del totale delle cellule insulari. Esse secernono insulina allo scopo di mantenere i livelli di glucosio nel sangue entro intervalli di normalità necessari per la sopravvivenza dell'organismo.

La normale funzione beta-cellulare dipende essenzialmente dall'integrità dei meccanismi che regolano la sintesi ed il rilascio dell'insulina, nonché dalla massa complessiva delle cellule β .

L'insulina è un ormone di natura proteica, costituito da due catene polipeptidiche: la catena A di 21 aminoacidi e catena B di 30 aminoacidi. Queste catene sono legate da due ponti disolfuro, che determinano la tipica struttura terziaria della proteina.

Il regolatore più importante della secrezione insulinica è il glucosio, anche se numerosi altri nutrienti, così come vari ormoni, neurotrasmettitori e farmaci possono influenzarne il rilascio. La beta cellula perfettamente funzionante secerne il suo prodotto tramite processi metabolici ed elettrici complessi. Classicamente si ritiene che il glucosio, dopo essere stato internalizzato dalla cellula β per opera di specifici gluco-trasportatori (GLUT2), subisca una fosforilazione da parte della glucochinasi che in tal modo determina l'innesco della cascata glicolitica (Fig. 4). Il piruvato che ne deriva entrerà nel mitocondrio e, attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici ed il conseguente ingresso nella catena respiratoria mitocondriale, condurrà alla produzione di ATP. L'aumento del rapporto ATP/ADP indurrà la chiusura, a livello della membrana cellulare, dei canali del potassio ATP-dipendenti (K_{ATP}), con conseguente depolarizzazione della membrana, apertura dei canali del Ca^{2+}

voltage-dipendenti ed ingresso di ioni Ca^{2+} nella cellula. Il calcio a sua volta attiverà la macchina di esocitosi della beta-cellula promuovendo la secrezione dell'ormone dai granuli in cui è contenuto [27].

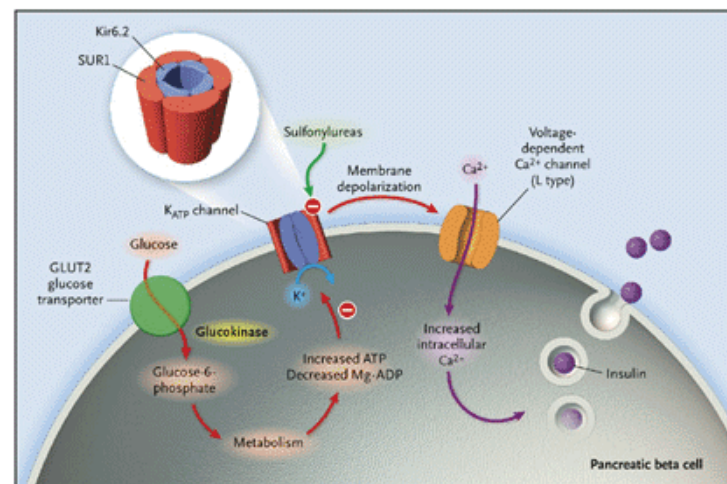


Figura 4 – Rappresentazione schematica della secrezione insulinica (da Gloyn AL et al, N Engl J Med. 2004 Apr 29;350(18):1838-49)

La secrezione dell'insulina classicamente presenta due fasi: una più precoce che avviene nei primi 5-10 minuti dopo lo stimolo glucidico ed una più tardiva e più prolungata [28]. Una volta rilasciato in circolo, l'emivita dell'ormone è di circa 6 minuti, poi viene degradato ed eliminato a livello epatico, renale e in quota minore anche da altri tessuti per opera di particolari enzimi detti insulinasasi [29].

A livello dei tessuti bersaglio l'insulina si lega a specifici recettori composti da due subunità (alfa e beta) appartenenti alla famiglia dei recettori peptidici di membrana. È noto, tuttavia, che l'insulina esplica anche effetti di tipo

mitogeno tramite l'interazione con recettori non specifici, quali i recettori per IGF-1, per IGF-2 [30].

La beta cellula pancreatica può divenire disfunzionale in seguito a svariati stimoli sia fisiologici che patologici.

Stimolatori fisiologici, come il glucosio e gli acidi grassi liberi, in alcune circostanze possono danneggiare la funzione e la vitalità delle beta cellule pancreatiche; questi stimoli quando prolungati possono determinare disfunzione e morte delle beta cellule [31]. E' stato dimostrato che il danno beta cellulare indotto dal glucosio o dagli acidi grassi liberi avviene prevalentemente per apoptosi cellulare; questo danno è preceduto da periodi in cui la beta cellula risulta disfunzionante. Queste iniziali disfunzioni, in parte reversibili, hanno origine con alterazioni mitocondriali o nella produzione di ATP (Referenza Fast Reversibility Anello, Diabetologia).

I complessi proteici della catena respiratoria costituiscono un passaggio critico, oltre che per la normale funzione secretoria della beta cellula anche per la sua vitalità [32]; condizioni di iper-impegno della catena mitocondriale respiratoria determinano un'eccessiva produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), che danneggiano le membrane mitocondriali e inducono segnali pro-apoptotici per la cellula [33].

Normalmente, infatti, la beta cellula presenta basso potere antiossidante. In caso di maggiore produzione di ROS una parte di questi non viene neutralizzata dagli appositi sistemi di difesa causando danno alle membrane mitocondriali; la perossidazione di queste ultime è alla base dell'avvio di segnali (rilascio del citocromo c e permeabilizzazione della membrana mitocondriale ad opera di specifiche proteine) che attivano l'apoptosi. A sostegno di tali condizioni di iper-lavoro, la beta cellula può utilizzare alcuni

sistemi di sicurezza, per esempio le proteine disaccoppianti (UCP), in particolare in questo caso la UCP-2, che, dissipando il gradiente elettrico trans-membrana e liberando energia sotto forma di calore, permettono di far fronte al fenomeno [34]; tuttavia, questa via alternativa condiziona la produzione di ATP e quindi la secrezione insulinica. Questi processi avvengono, per esempio, in caso di esposizione cronica ad iperglicemia o ad elevate concentrazioni di acidi grassi liberi.

Vie del segnale insulinico intracellulare

Il recettore insulinico, appartenente alla famiglia dei recettori di membrana, è una proteina etero-tetramerica formata da due subunità alfa e da due subunità beta, collegate tra loro da ponti disolfuro (Fig.5). L'insulina lega le subunità alfa, che sono extracellulari, e stimola l'autofosforilazione dei residui tirosinici delle subunità beta che sono invece transmembrana; le subunità beta attivate determinano la fosforilazione di substrati intracellulari [35] appartenenti classicamente a due vie: la via metabolica e la via proliferativa (Fig.5). Nella prima, la fosforilazione di IRS-1 (substrato del recettore dell'insulina) stimola l'attivazione di PI3K che successivamente attiva una cascata intracellulare volta alla translocazione, sulla membrana dei tessuti bersaglio, del trasportatore GLUT4 ed alla stimolazione dell'assorbimento del glucosio.

Oltre a promuovere l'immagazzinamento del glucosio, l'insulina inibisce la produzione e il rilascio di glucosio dal fegato bloccando la gluconeogenesi e la glicogenolisi. L'insulina controlla direttamente l'attività di un insieme di enzimi metabolici attraverso la fosforilazione e la defosforilazione e regola anche l'espressione di geni che codificano enzimi epatici coinvolti nella gluconeogenesi.

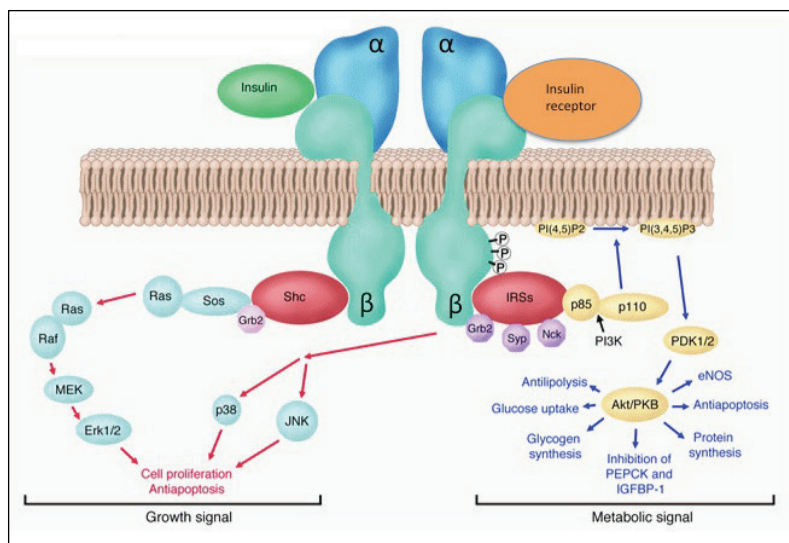


Figura 5 – Il recettore insulinico e le pathways ad esso correlate (modificato da Greet Van den Berghe J. Clin. Invest. 114:1187-1195 (2004))

Nella via proliferativa o mitogena la fosforilazione di IRS-2 porta, tramite vari passaggi intermedi, all'attivazione della via di RAS che coinvolge la via delle MAPK, fondamentali nel regolare l'espressione di geni coinvolti nella crescita, proliferazione e differenziamento cellulari (come Pax6, del quale si parlerà più avanti) [36].

Un'alterazione nella trasduzione di questi segnali potrebbe determinare insulino-resistenza ed alterazioni dell'attività proliferativa delle cellule.

Alfa-cellula pancreatica

Le alfa cellule costituiscono il 20% circa delle cellule dell'isola di Langerhans e sono deputate alla produzione del glucagone, un peptide costituito da 29 aminoacidi, cruciale per la regolazione dell'omeostasi glucidica.

La scoperta di tale peptide si deve a Marlin e collaboratori che nel 1923 ipotizzarono la presenza di un ormone diverso dall'insulina, in seguito chiamato glucagone, capace di determinare iperglicemia transitoria dopo la somministrazione di insulina [37].

Nel 1959, grazie all'avvento delle metodiche di dosaggio RIA, Unger et al. [38-40] ottennero informazioni più approfondite sulla fisiologia del glucagone e sul suo ruolo in alcune patologie e disordini metabolici.

Nel corso degli anni è stato riscontrato che gli stimoli determinanti ipoglicemia sono in grado di stimolare la secrezione di glucagone e che l'iperglicemia provoca la riduzione della secrezione di glucagone.

In condizioni fisiologiche, il glucagone viene rilasciato nel torrente ematico in risposta all'ipoglicemia per contrastare l'azione dell'insulina nei tessuti periferici (prevalentemente nel fegato) e funziona come contro-regolatore per il ripristino della normoglicemia. Esso promuove la gluconeogenesi epatica, la glicogenolisi e, contemporaneamente, inibisce la glicolisi e la glicogenesi [41,42].

Il glucagone presenta un'azione esattamente opposta a quella dell'insulina, contrastandone gli effetti in particolare a livello epatico, allo scopo di ripristinare lo stato di normoglicemia ed assicurando al contempo un adeguato apporto energetico ai tessuti nei periodi interprandiali.

Il glucagone è processato a partire dal suo precursore, il proglucagone. Il gene del proglucagone è espresso nelle alfa cellule, nelle L cellule intestinali e in

alcuni neuroni; esso codifica una molecola di 180 aminoacidi il cui differente processamento porta alla produzione di diversi ormoni, inclusi glucagone, glicentina, oxiomodulina, GLP-1 e GLP-2 [43]. L'espressione di ognuno di questi ormoni è condizionata dalla diversa tipologia dell'enzima pro-ormone convertasi (PC) il quale, a seconda della sua natura, taglia il proglucagone in differenti siti [44]. La presenza massiccia di PC2 nell'alfa cellula porta ad una produzione predominante di glucagone [45,46]; contrariamente, nelle L-cellule intestinali e nel cervello la presenza predominante di PC1/3 permette la produzione del GLP-1, del GLP-2, della glicentina e dell'oxiomodulina [47].

La secrezione di glucagone viene stimolata principalmente dall'ipoglicemia e dagli aminoacidi, ma anche dall'acetilcolina, dalle catecolamine, dai glucocorticoidi e da alcuni ormoni gastrointestinali, quali il Glucose-dependent Insulinotropic Peptide (GIP) e la colecistochinina (CCK). Sembrano esercitare invece un ruolo inibente gli acidi grassi liberi, i corpi chetonici, l'insulina, la somatostatina, il GLP-1 (glucagon-like peptide-1) e naturalmente l'iperglicemia [48].

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, ma quando 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 dell'organo possa condizionare il risultato finale di secrezione.

Le alfa cellule pancreatiche sembrano possedere molti dei sistemi ed apparati tipici delle beta cellule. Se si analizza il processo embriogenico che porta alla

formazione delle alfa e delle beta cellule, queste due distinte popolazioni condividono fasi differenziative comuni; addirittura, nelle fasi più precoci di differenziazione alcune cellule possono co-esprimere glucagone ed insulina. È probabile che per questo motivo l'apparato funzionale delle alfa cellule ricalchi in molti punti quello delle beta: le alfa cellule mature presentano canali di membrana ed anche un'apparato dei granuli simili a quelli delle beta cellule. Sulla superficie delle alfa cellule sono presenti canali per il potassio, per il calcio, per il sodio, per il cloro e canali per il GABA [49], così come nelle cellule beta. Non molto è noto sulla peculiarità di questi canali e soprattutto sulla loro interazione; tuttavia vi sono evidenze che almeno alcuni tipi di canali per il potassio siano molti più sensibili ai livelli intracellulari di ATP [50].

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 di membrana da -60mV a -30mV , determina la secrezione di glucagone. Rivedendo l'organizzazione della beta cellula emerge come anche le alfa possedano un'unità glucosensoria composta da GLUT ed esochinasi; tuttavia, il trasportatore qui presente è l'isoforma 1 (Fig. 6), che ha una più alta affinità per il substrato e minore capacità di trasporto rispetto al GLUT2 ed è in assoluto poco rappresentato sulla membrana cellulare rispetto al corrispettivo sulla beta cellula, determinando quindi un più basso trasporto di glucosio all'interno della cellula. Questo suggerisce che il trasporto del glucosio per l'alfa cellula non debba essere un fattore limitante per la sua funzione.

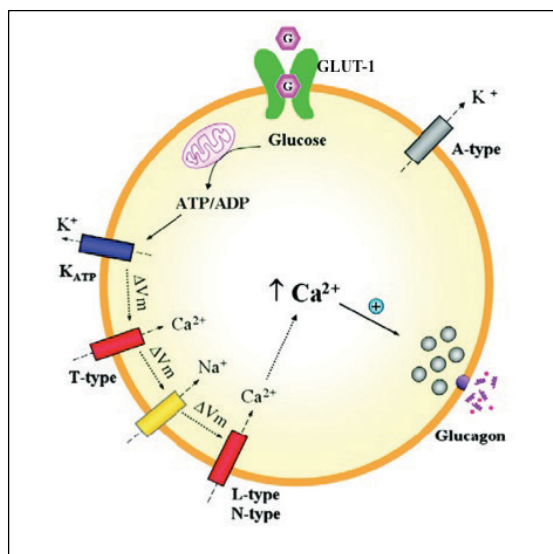


Figura 6 – Modello schematico della secrezione di glucagone (modificato da Quesada I et al. J Endocrinol 2008; 199:5-19)

Il metabolismo del glucosio sembra essere solamente il 20-40% rispetto a quello della beta cellula, e di conseguenza la generazione di ATP risulta inferiore. Tuttavia, come già detto, i canali per il potassio risultano molto più sensibili alle perturbazioni dei livelli di ATP. 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: 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 [50]. Quando questi canali si chiudono l'esocitosi si blocca. Inoltre, pare che un ruolo importante per l'esocitosi rivestano i livelli di cAMP intracellulari: esso non potenzia la secrezione, ma sembra che velocizzi la mobilizzazione dei granuli dal comparto del pool

stabile verso la membrana cellulare. Tuttavia è stato visto che durante la mobilizzazione dal comparto centrale alla periferia da parte dell'cAMP 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 stabili ed in pool localizzati in prossimità della membrana, possano essere divisi in granuli posti vicino ai canali del calcio di tipo L (secrezione acuta) e in granuli presenti in vicinanza dei canali del calcio di tipo N (secrezione tonica).

La secrezione del glucagone è mediata da eventi elettrici di membrana che coinvolgono diversi canali ionici, alla stregua di quanto accade nelle beta-cellule. L'azione del glucagone è relativamente complessa e coinvolge la regolazione coordinata di fattori trascrizionali e network di trasduzione del segnale che convergono nel controllo di aminoacidi, lipidi e metabolismo dei carboidrati.

Il recettore del glucagone è accoppiato a proteina di tipo G_s/G_q ed è espresso nel fegato, nelle beta-cellule, nel tessuto adiposo, nel muscolo e nel cervello. Una volta legato il recettore, la proteina G_s attiva l'adenilato ciclasi e questa promuove l'incremento di cAMP, il quale provvederà poi ad attivare la PKA. L'attivazione della proteina G_q, invece, induce l'attivazione della fosfolipasi C, l'up-regolazione dell'inositolo-3,4,5-trifosfato ed il rilascio di calcio dai depositi endocellulari. L'attivazione di PKA e l'aumento di cAMP contribuiscono alla regolazione dell'espressione di molecole atte a modulare il metabolismo dei vari tessuti target secondo le azioni caratteristiche del glucagone per ciascuno di essi [51].

Il rapporto insulina/glucagone è un determinante critico del metabolismo epatico del glucosio per il mantenimento generale della glicemia. Inoltre, si pensa che il glucagone giochi un ruolo importante nello sviluppo dell'isola pancreatica, anche se i meccanismi molecolari alla base di questi effetti durante l'embriogenesi e negli organismi adulti non sono ancora pienamente noti [52-53].

LE INCRETINE

Nell'uomo i livelli plasmatici post-prandiali di insulina sono più elevati dopo un carico orale di glucosio se paragonati ai livelli che vengono raggiunti dopo un carico endovena che riproduca gli stessi livelli di glicemia [54]. Questo fenomeno, conosciuto come “effetto incretinico”, è stimato essere responsabile di circa il 70% della secrezione insulinica dopo un pasto [55] ed è dovuto all'azione di ormoni gastrointestinali, prodotti dall'intestino e rilasciati in circolo dopo un pasto. I pazienti con DMT2 presentano una riduzione dell'effetto incretinico [54]. I meccanismi molecolari responsabili di questa alterazione non sono noti, così come non si conosce se si tratta di alterazioni trasmesse geneticamente o se secondarie a difetti acquisiti. Sebbene l'identificazione di ormoni intestinali, in grado di influenzare i livelli di glucosio nel sangue, risalga al 1932 con l'introduzione della loro definizione come INtestine seCRETion INSulin, risalgono invece al 1978 e al 1987 rispettivamente l'identificazione della “L cellula” intestinale e la scoperta del GLP-1 nell'uomo [56,57]. Nel 2005 è stato possibile disporre di farmaci attivi sull'asse delle incretine: analoghi del GLP-1, agonisti recettoriali, o inibitori dell'enzima DPP-4, responsabile della sua degradazione.

Oggi è noto che l'effetto incretinico è principalmente dovuto a due ormoni, il GLP-1 (glucagon-like peptide-1) ed il GIP (glucose-dependent insulinotropic peptide). Questi ormoni sono secreti in risposta ai nutrienti del pasto e sono in grado di potenziare la secrezione insulinica glucosio-indotta [57].

Il GIP è stato il primo ormone di questa classe ad essere descritto; è un ormone di 42 aminoacidi rilasciato dalle cellule K dell'intestino, localizzate prevalentemente nel duodeno [5].

Il GLP-1 è un prodotto post-traduzionale del gene del proglucagone, prodotto prevalentemente dalle cellule L intestinali. E' noto inoltre che il gene del proglucagone non è espresso solo nelle cellule alfa del pancreas, ma anche nelle cellule L della mucosa intestinale [58], così come in certi neuroni del tronco cerebrale [59]. Tale pro-ormone a livello della cellula alfa viene clivato dalla pro-ormone convertasi 2 (PC2) per la produzione di glucagone, mentre nelle cellule L, viene clivato da PC1/3 rilasciando GLP-1 e GLP-2 [60] (Fig. 7).

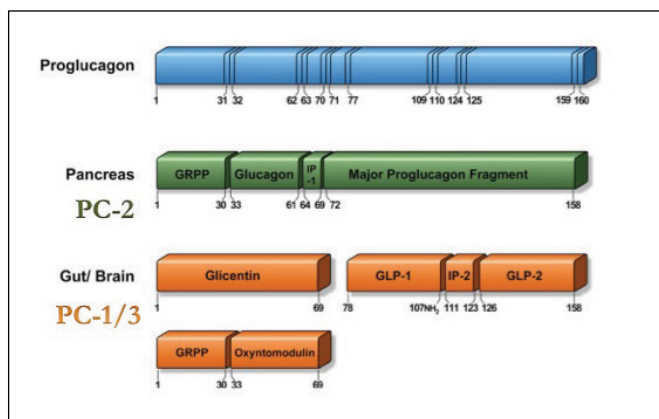


Figura 7 - Processamento del proglucagone ad opera di PC2 e PC1/3 (modificato da Holst JJ-Physiological reviews 2007, 87(4):1409--1439.)

Studi presenti in letteratura mostrano come la perdita dell'effetto incretinico in pazienti affetti da diabete di tipo 2 possa essere secondaria alle alterazioni glicemiche o all'insulino-resistenza presenti in questi pazienti; questo indicherebbe quindi che tale fenomeno possa essere reversibile [61].

Negli ultimi anni, Knop e collaboratori hanno dimostrato come in soggetti sani, non predisposti al DMT2, un'alterazione dell'effetto incretinico poteva essere osservata sottoponendo questi pazienti ad un breve periodo di ridotta

tolleranza al glucosio o anche ricreando uno stato di insulino-resistenza [62,63]. Secondo queste evidenze quindi la perdita di funzione delle cellule L intestinali potrebbe essere secondaria a perturbazioni ambientali. Queste evidenze pongono quindi le basi per lo studio delle L cellule intestinali come possibili target terapeutici e come componenti importanti nella patogenesi del DMT2.

La cellula L intestinale

Le L cellule sono dislocate lungo le pareti dell'epitelio intestinale con una densità crescente verso il tratto distale dell'ileo e del colon [64]. La presenza di queste cellule lungo il tubo digerente permette il diretto contatto con i nutrienti del lume intestinale e le colloca come trasduttori dello stimolo chimico degli alimenti con la secrezione ormonale che preparerà l'isola pancreatica all'aumento di substrati energetici [64]. Le cellule L fanno parte di un più ampio sistema entero-endocrino e il loro studio ha permesso di identificare una rete di cellule endocrine presenti nell'intestino che controlla il transito intestinale, la disponibilità energetica e la composizione del cibo. Gli ormoni prodotti dalle cellule endocrine intestinali, comprendenti per esempio la colecistochinina, la serotonina, la secretina, la ghrelina e molti altri, sono alla base di nuovi studi scientifici che mettono al centro la fisiopatologia del diabete e dell'obesità. Queste condizioni cliniche, per anni identificate come patologie legate all'iperalimentazione, possono invece avere la loro base fisiopatologica in disfunzioni endocrine di cellule e ormoni gastrointestinali. Nonostante le cellule endocrine siano state classificate sulla base del rispettivo prodotto ormonale, è ormai evidente che molte cellule sono capaci di

produrre più di un ormone. Le cellule L, in particolare, oltre al ben noto GLP-1 producono glucagon-like-peptide-2 (GLP-2) e peptide YY.

Una volta rilasciato in risposta al pasto, soprattutto se ricco in carboidrati, il GLP-1 esercita diverse azioni a livello pancreatico: stimola la secrezione di insulina in maniera strettamente dipendente dalle concentrazioni di glucosio, risultando quindi incapace di provocare ipoglicemia; inibisce in modo diretto e indiretto la secrezione di glucagone e favorisce i processi di differenziamento dei precursori delle beta-cellule e di proliferazione delle beta-cellule esistenti [65-68]. L'ormone esercita anche una serie di attività a livello extra-pancreatico: rallentamento dello svuotamento gastrico; regolazione dell'appetito; riduzione del peso corporeo, mediata da una riduzione dell'apporto calorico e da effetti diretti e indiretti a livello dell'apparato gastrointestinale e del sistema nervoso centrale; vasodilatazione endotelio-mediata; miglioramento della funzione contrattile cardiaca nella cardiopatia [69-72].

Mentre le cellule L del tratto prossimale dell'intestino sembrano essere maggiormente responsabili dell'effetto incretinico, quelle del tratto distale sembrano invece essere maggiormente correlate agli effetti su appetito e motilità intestinale.

Sulla base della composizione del pasto, l'andamento della secrezione del GLP-1 esibisce un profilo bifasico: una prima fase precoce che si verifica subito dopo l'ingestione di cibo e che perdura per 15-30 minuti, seguita da una fase tardiva persistente per 1-2 ore [73,74]. Sebbene la bassa densità di cellule L nei tratti prossimali dell'intestino abbia fatto inizialmente ipotizzare che la fase precoce della secrezione fosse indirettamente scatenata da segnali nervosi o fattori ormonali, è oggi universalmente riconosciuto che la bassa

percentuale di L cellule presenti a livello del duodeno sia sufficiente per provocare il rilascio precoce di GLP-1 [75].

Captazione dei nutrienti

Le L cellule sono del tipo *open-type*, dotate di lunghi e sottili processi citoplasmatici che protrudono verso il lume intestinale[64] (Fig. 8). Tale particolare morfologia permette loro di entrare in contatto diretto con i nutrienti presenti nel lume intestinale.

Evidenze riguardanti la capacità di tali cellule di essere esse stesse “sensibili” ai nutrienti provengono da molteplici studi condotti principalmente su tre linee cellulari: le GLUTag, le STC-1 di origine murina e NCI-H716 di origine umana.

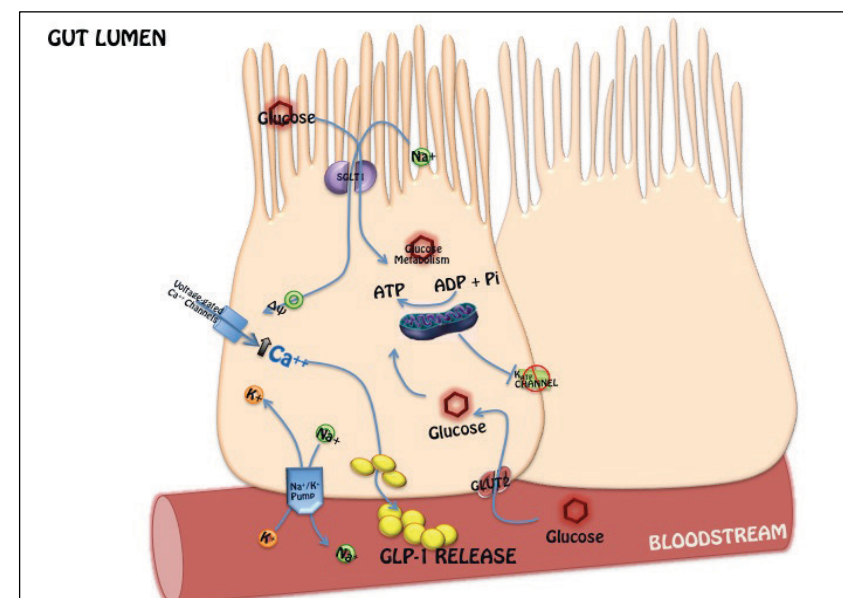


Figura 8 – La L cellula intestinale ed i sistemi glucosensori (modificata da Piro et al. La L cellula intestinale come target di terapia - Il Diabete. vol.24 n.1 2012)

Il sistema glucosensorio

E' ancora oggetto di studio il sistema mediante il quale i glucosidi presenti all'interno del lume intestinale provocano la secrezione di GLP-1 dalle cellule L.

Studi preliminari effettuati sulla linea GLUTag hanno messo in evidenza la capacità del glucosio di provocare eventi elettrofisiologici responsabili del rilascio di GLP-1 previo aumento del Ca^{2+} citoplasmatico [76].

Chiusura Dei Canali K_{ATP}

Meccanismo dipendente dal Metabolismo Del Glucosio

Le L cellule presentano sulla loro membrana canali per il potassio ATP dipendenti (K_{ATP}) che sembra possano rivestire un ruolo importante per la secrezione del GLP-1, così come per l'insulina nelle beta cellule pancreatiche. E' infatti noto come nelle beta cellule il metabolismo glucidico provochi l'incremento delle concentrazioni di ATP e la caduta del MgADP e che questi due fenomeni determinano, nell'ordine, chiusura dei canali K_{ATP}^+ , aumento del Ca^{2+} intracellulare e la stimolazione della secrezione insulinica [77]. Studi condotti su linee di L cellule intestinali hanno evidenziato alti livelli di espressione delle subunità Kir6.2 e SUR1, noti recettori per le sulfoniluree, (classe di farmaci ampiamente utilizzati nella terapia antidiabetica) a livello dei canali K_{ATP}^+ ; attività elettriche funzionali dipendenti dai canali K_{ATP}^+ sono state inoltre rilevate in L cellule provenienti da colture primarie di colon [76,79,80].

Analisi immunocitochimiche e di espressione hanno inoltre confermato la presenza di alti livelli di glucochinasi GCK a livello delle L-cellule intestinali.

Sulla base di questi dati è stato evidenziato che la glucochinasi, l'esochinasi tipica delle beta cellule e di vari altri tessuti glucosio-sensibili caratterizzata da una bassa affinità per il proprio substrato, possa pilotare le attività a monte delle vie correlate al metabolismo glucidico all'interno della cellula, come le attività dipendenti dai canali K_{ATP} .

Attività Dei Trasportatori Sodio-Glucosio

Meccanismo Indipendente Dal Metabolismo Del Glucosio

Gribble et al. nel 2003 hanno identificato un nuovo meccanismo responsabile del rilevamento del glucosio da parte delle L cellule. In esperimenti condotti sulla linea cellulare GLUTag gli autori hanno avuto modo di osservare come gli zuccheri siano in grado di innescare una depolarizzazione della membrana con successiva secrezione di GLP-1 mediante l'azione elettrogenica del trasportatore sodio-glucosio, SGLT1 (sodium glucose linked transporter-1)[81].

SGLT1 (Fig. 7) è il principale trasportatore responsabile dell'assorbimento del glucosio dalla superficie luminale dell'epitelio intestinale ed utilizza il gradiente di sodio presente tra l'interno e l'esterno della cellula per spostare Na^+ , secondo gradiente, e glucosio, contro gradiente, all'interno della cellula. L'aumento del sodio intracellulare genera poi una corrente interna sufficiente a provocare una depolarizzazione della membrana e successivo rilascio dell'ormone. [81].

Effetti del GLP-1

L'emivita del GLP-1 attivo in circolo è molto breve, circa 2 minuti, una volta secreto infatti, l'ormone viene rapidamente inattivato ad opera delle Dipeptidil-peptidasi-4 (DPP-IV) [82], serino-proteasi ubiquitarie [83,84] che clivano specificamente il GLP-1 in corrispondenza di un'alanina nell'estremità amino terminale, trasformandolo in GLP-1 (9-37) o GLP-1 (9-36)NH₂ [85].

Come risultato è stato stimato che solo il 10-15% della forma attiva secreta passa nel sistema circolatorio.

Le DPP-IV sono espresse sulle membrane di molte cellule, linfociti, enterociti, fegato, polmoni, e di molti altri tessuti e producono metaboliti derivati dalle molecole originali e la cui funzione residua è in fase di valutazione.

Il GLP-1 ha azioni molteplici; tra i tessuti bersaglio riconosciuti, le beta cellule pancreatiche rappresentano i maggiori determinanti dell'omeostasi glicemica GLP-1 indotta. A livello della beta cellula pancreatica il GLP-1 si lega ad uno specifico recettore di membrana (GLP-1R) composto da sette domini trans-membrana ed accoppiato ad una proteina di tipo Gs (Fig. 9). La stimolazione del recettore per il GLP-1 evoca a livello intracellulare l'aumento dei livelli di AMP ciclico (cAMP), secondo messaggero coinvolto in molte vie di trasduzione intracellulare. A livello della beta cellula pancreatica il cAMP contribuisce alla secrezione insulinica [86]; in molti altri sistemi il suo aumento influenza vie intracellulari coinvolte sia nella sopravvivenza che nel trofismo cellulare. Esistono infatti in letteratura evidenze di effetti positivi riscontrati in vivo su endotelio, miocardio, cellule del sistema nervoso e isole

pancreatiche [87]. Per questi motivi, l'utilizzo del GLP-1 nella terapia clinica (analoghi, agonisti recettoriali, inibitori delle DPP-IV) riveste molta importanza; gli effetti extraglicemici di questo ormone potrebbero infatti contribuire a ridurre il rischio residuo dei pazienti con diabete e migliorare la glicemia non solo dal punto di vista insulino-centrico.

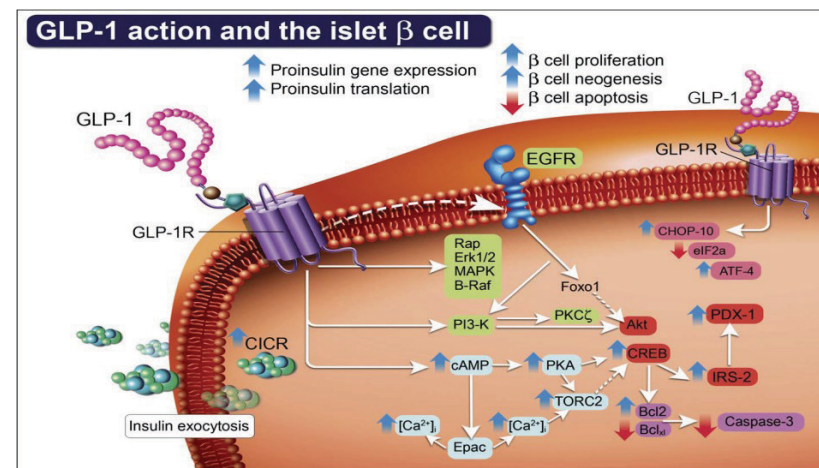


Figura 9 – Pathways della trasduzione del segnale del GLP-1R nelle beta-cellule pancreatiche (da Drucker. The Biology of incretin hormones. Cell Metabolism 2006. 3: 153-165)

Il GLP-1R è espresso anche in altri organi (cervello, tubo digerente, rene, polmoni) e sulle alfa-cellule pancreatiche, sebbene quest'ultimo dato sia attualmente fortemente dibattuto in letteratura. L'innalzamento del cAMP porta all'attivazione di PKA (protein chinasi A), del fattore Epac2 (o CAMP-GEFII) e questo, insieme all'attivazione di altre vie (figura 9) conduce a:

- Chiusura dei canali al K⁺ ATP-dipendenti in sinergia con il glucosio e conseguente depolarizzazione di membrana, apertura dei canali al Ca²⁺ e degranolazione delle vescicole contenenti insulina.

- Stimolazione della proliferazione [68], inibizione dell'apoptosi [88] beta-cellulare e potenziamento della trascrizione del gene dell'insulina [86].
- Inibizione della secrezione di glucagone [89]. Il meccanismo tramite cui questo accade non è stato ancora completamente chiarito. Questo effetto potrebbe essere ricondotto all'azione paracrina (indiretta) dell'insulina, la cui secrezione è stata potenziata dal GLP-1. Tuttavia ciò viene in parte confutato dall'osservazione che soggetti con DMT1, quindi privi di attività beta-cellulare residua, conservando l'effetto inibitorio GLP-1 mediato sulla secrezione di glucagone [90]; ciò suggerirebbe quindi che altri meccanismi siano coinvolti. Come in precedenza accennato, infatti, il GLP-1 aumenta la secrezione di somatostatina che potrebbe svolgere un'azione inibitoria paracrina sull'alfa-cellula [91]. Inoltre, come anche dimostrato in uno dei progetti presentati in questa tesi, sembra che il GLP-1 agisca direttamente sulle alfa-cellule pancreatiche promuovendo, secondo un meccanismo di feedback positivo, la secrezione di GLP-1 [92].

Il GLP-1R è stato identificato anche a livello di altri organi; la tabella 2 riassume i tessuti che esprimono GLP-1R e gli effetti extra-pancreatici dell'ormone ad oggi accertati.

Da quanto detto si evince chiaramente l'importanza degli ormoni gastrointestinali nella patogenesi del diabete e delle sue complicanze; le incretine svolgono funzioni critiche per l'omeostasi glicemica del soggetto sano e le loro alterazioni nel paziente diabetico possono contribuire alla mancata omeostasi glicemica.

Partendo da queste evidenze, la ricerca scientifica sta impiegando notevoli

energie sullo studio riguardante l'utilizzo degli ormoni incretinici come strumenti terapeutici per il DMT2.

| Apparato | Effetto |
|--------------------------|---|
| Tratto gastroenterico | - Inibizione riempimento gastrico - Inibizione secrezione acida - Riduce la produzione epatica di glucosio |
| Sistema nervoso centrale | - Inibizione dell'intake di cibo e acqua - Stimolazione senso di sazietà (riduzione peso corporeo) - Attività neurotrofica e neuro protettiva |
| Sistema cardiovascolare | - Vasodilatazione - Attività cardioprotettiva durante danno ischemico-riperfusivo - Inibizione apoptosi dei cardiociti dopo ischemia indotta sperimentalmente |
| Muscolo | - Aumento dell'insulinosensibilità |

Tabella 2 – Effetti extrapancreatici del GLP-1

La Terapia basata sulle Incretine

Il ruolo del sistema incretinico nella patofisiologia del diabete è stato confermato tramite dati che hanno documentato un ridotto effetto incretinico nei soggetti con DMT2 [12]. L'utilizzo del GLP-1 ha rivelato interessanti risvolti per la terapia del diabete, in quanto capace di aumentare la secrezione dell'insulina in maniera glucosio dipendente con un rischio basso di ipoglicemia.

Oltre agli effetti glicemici, il GLP-1 può avere effetti benefici sul peso corporeo inibendo l'appetito [93], al contrario di altri strumenti farmacologici che invece provocano un indesiderato incremento ponderale. Tuttavia per la sua breve emivita risulta impossibile utilizzare il GLP-1 nativo, se non

mediante infusione continua. Essendo tale opzione non applicabile, la ricerca clinica ha focalizzato la propria attenzione su due categorie di farmaci molto promettenti:

- Agonisti/analoghi del GLP-1R: Liraglutide e Exenatide
- Inibitori delle DPP-IV (gliptine): Saxagliptin, Vildagliptin, Sitagliptin, Linagliptin.

Entrambi i tipi di approcci farmacologici sono in grado di stimolare la secrezione insulinica ed inibire il rilascio di glucagone [94,95].

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

PROGETTI SCIENTIFICI

Alla luce di quanto esposto nella parte introduttiva di questa tesi, l'attività di ricerca condotta dal mio gruppo è stata rivolta allo studio di particolari aspetti della fisiopatologia del Diabete Mellito di tipo 2 (DMT2), meno comuni e venuti alla ribalta negli ultimi anni, che a nostro parere necessitavano di essere chiariti.

In particolare le nostre indagini sono state focalizzate sull'analisi dell'azione del GLP-1 a livello dell'isola pancreatica, con particolare attenzione all'alfa cellula e sulla valutazione dell'ipotesi per cui fattori ambientali, quali per esempio la glucotossicità, possano essere la causa della disfunzione a carico del sistema incretinico osservata in corso di diabete.

Nel primo progetto di cui ho riportato i risultati in questa tesi abbiamo dunque investigato gli effetti dell'esposizione cronica ad alti livelli di GLP-1 su colture di alfa cellule pancreatiche e abbiamo fornito evidenza di un effetto diretto dell'ormone su queste cellule. Ad oggi i dati riguardanti la presenza del recettore per il GLP-1 sulle alfa cellule sono ampiamente dibattuti ed i risultati emersi dalle nostre indagini contribuiscono a chiarire questo aspetto.

Il nostro gruppo di ricerca si è storicamente rivolto allo studio riguardante gli effetti di fattori fisiologici ambientali, quali per esempio il glucosio o gli acidi grassi liberi, nel determinare disfunzione dei sistemi cellulari.

Il secondo progetto riportato in questa tesi si pone esattamente in linea con quest'orientamento di ricerca. Alla luce dei difetti a carico del sistema incretinico osservati in pazienti diabetici, abbiamo infatti, analizzato il ruolo dell'esposizione cronica ad alte concentrazioni di glucosio (glucotossicità), nel determinare alterazioni funzionali delle L cellule intestinali.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza come l'iperglicemia cronica, da noi simulata in un sistema in vitro, sia capace di inibire sensibilmente la secrezione di GLP-1 glucosio-indotta in una linea di L cellule intestinali e che questo effetto sia conseguenza di un'alterazione a carico del metabolismo mitocondriale. Questi risultati da noi ottenuti apporteranno sicuramente avanzamenti culturali nella fisiopatologia del diabete mellito.

L'esposizione cronica al GLP-1 incrementa la sintesi ed il rilascio di GLP-1 in una linea di alfa cellule pancreatiche (α -TC1): evidenze di un effetto diretto del GLP-1 sulle alfa-cellule pancreatiche.

[il manoscritto relativo a questo progetto è in fase di revisione su Plos One]

Il diabete mellito di tipo 2 è una patologia ad elevata incidenza nella popolazione; i cambiamenti dello stile di vita e le nuove abitudini alimentari hanno portato ad un graduale aumento, nell'ultimo decennio, dell'insorgenza di tale patologia nelle popolazioni industrializzate [96]. La patogenesi di questa malattia coinvolge la ridotta sensibilità all'azione dell'insulina a livello dei tessuti periferici, l'alterata secrezione insulinica da parte della beta-cellula pancreatica e l'alterata secrezione di glucagone da parte delle alfa-cellule del pancreas [97]. Accanto a questi aspetti classici, negli ultimi anni nuovi elementi hanno contribuito alla comprensione della patologia; tra questi due in particolare hanno assunto un ruolo sempre più determinante: l'asse delle incretine e gli ormoni gastro-intestinali. Entrambi questi due aspetti hanno contribuito al rinnovamento delle conoscenze sul diabete e hanno permesso di apportare modifiche negli schemi terapeutici finora utilizzati per il trattamento di questa patologia. Proprio sulla base di queste nuove evidenze negli ultimi anni l'interesse scientifico ha focalizzato le proprie attenzioni sullo sviluppo di nuove terapie mirate ad incrementare l'azione delle incretine, ormoni secreti dall'intestino in seguito all'ingestione di cibo, in grado di migliorare la risposta delle cellule dell'isola pancreatica. Questa classe di farmaci è basata sulla capacità del Glucagon-Like Peptide-1 di ridurre i livelli di glucosio plasmatico modulando la secrezione di insulina e glucagone. Il GLP-1, come detto in precedenza, stimola la secrezione glucosio-indotta

dell'insulina dalle beta cellule ed inibisce il rilascio di glucagone dalle alfa cellule pancreatiche[98].

Tuttavia non è ancora ben chiaro se l'azione osservata in termini di riduzione di glucagone sia indiretta, mediata cioè da altri ormoni (insulina/somatostatina) o diretta, tramite recettori per il GLP-1 presenti sulla cellula alfa pancreatica (Fig.1).

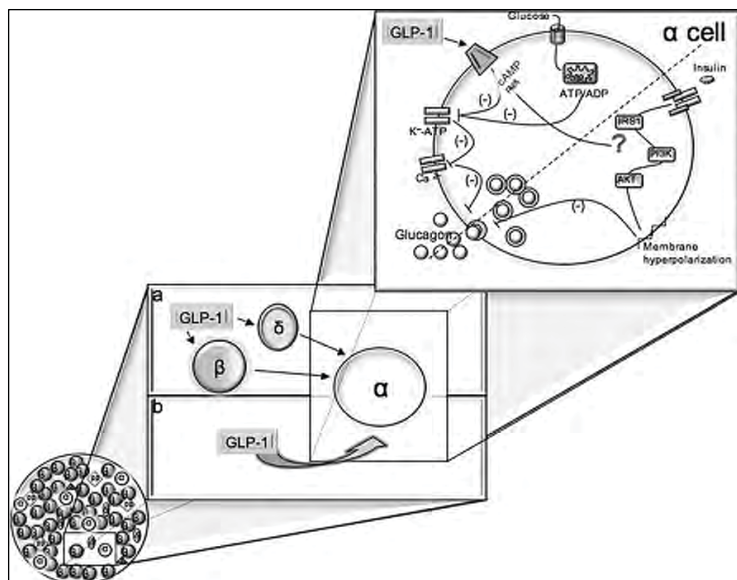


Figura 1 - Rappresentazione schematica dell'azione diretta o indiretta del GLP-1 sull'alfa cellula pancreatica (da Piro et al. The Journal of Clinical Metabolism & Diabetes. November 2011, 2(2). 6-24)

Poiché il GLP-1 viene rapidamente degradato nell'organismo ad opera dell'enzima Di-Peptidil-Peptidasi di tipo IV (DPP-IV) e presenta quindi un'emivita molto breve nel plasma, in clinica vengono attualmente utilizzati analoghi del GLP-1, che sono molto più resistenti alla degradazione da parte delle DPP-IV, oppure inibitori delle DPP-IV [99].

Con queste nuove terapie tuttavia si ottengono livelli sovrafisiologici e prolungati di GLP-1 in circolo; non è evidente se questi aumenti cronici possano avere effetti a lungo termine e/o se le azioni positive riscontrate all'inizio delle terapie perdurino nel tempo o se invece vengono perse con il perdurare delle terapie.

Il presente studio è stato quindi progettato per studiare gli effetti dell'esposizione cronica ad alti livelli di GLP-1 (come sperimentato dai pazienti affetti da DMT2 trattati con incretino-mimetici o inibitori delle DPP-IV) su colture di alfa-cellule pancreatiche (α -TC-1 clone 6).

Ad oggi la presenza del recettore del GLP-1 su queste cellule risulta ancora controversa e lo scopo di questo studio è stato anche quello di valutare questo aspetto. Per questo studio è stata utilizzata una linea immortalizzata di alfa cellule pancreatiche murine (α -TC-1 clone 6), modello attualmente unico per studi di questo genere.

I risultati ottenuti forniscono evidenze sull'espressione del recettore del GLP-1 (GLP-1R) in questa linea cellulare α -TC-1. L'evidenza della sua presenza è confermata oltre che da saggi di espressione genetica e proteica anche dall'evidenza degli effetti biologici intracellulari del GLP-1. In questo studio abbiamo studiato gli effetti dell'esposizione cronica al GLP-1 sulle alfa cellule pancreatiche, cercando di studiare in un modello in vitro i possibili comportamenti funzionali e molecolari delle cellule alfa pancreatiche in corso di terapia con incretine.

Materiali e Metodi

Modelli cellulari

Le cellule α -TC-1 (clone 6), acquistate presso l'American Type Culture

Collection (ATCC), provengono da glucagonoma di topo e sono altamente differenziate per la produzione di glucagone.

Le cellule sono state coltivate a 37°C con il 5% di CO² in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), supplementato con 10% FBS (siero fetale bovino), 2% Glutamina, 1% aminoacidi non essenziali, 0.02% albumina, antibiotici, 1% penicillina e streptomina.

Le cellule sono state tripsinizzate due volte la settimana.

Alcuni esperimenti sono stati eseguiti su un'altra linea di alfa cellule pancreatiche, le **InR1G9**, caratterizzata dalla mancanza del recettore del GLP-1 [100-102]. Le cellule InR1G9 sono state coltivate in terreno RPMI-1640 con 11 mmol/l di glucosio supplementato con FBS 5%, 100 U/ml di penicillina, 100 mg/ml di streptomina e 2 mmol/l di glutamina, in atmosfera con aria umidificata al 95%, CO₂ al 5% e a 37 °C.

Esposizione acuta al GLP-1

Le cellule sono state incubate in assenza di GLP-1 per 72 ore, lavate due volte e successivamente incubate per 2 ore in Krebs-Ringer (KRB) buffer contenente 16.7mmol/L di glucosio e 0.5% di BSA a pH 7.4 in presenza o assenza di GLP1 (100 nM). In seguito è stato misurato il contenuto di GLP-1.

Esposizione cronica al GLP-1

24 ore dopo l'impianto, le cellule α -TC-1 sono state coltivate per 72 ore in terreno DMEM completo, in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l). Il GLP-1 è stato sostituito ogni 12 ore, come precedentemente descritto [103]. Per studiare l'effetto dell'insulina, le cellule sono state coltivate in terreno

privo di FBS, supplementato con BSA 0.1% per le 24 ore precedenti la stimolazione acuta (5 min) con insulina 10⁻⁹ M.

Al fine di analizzare in dettaglio gli effetti del GLP-1, in alcuni esperimenti, durante le ultime 12 ore, le cellule sono state coltivate in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l), Exendina 9 (100 nmol/l), un antagonista del recettore del GLP-1 [104] KH7 (25mmol/l), un inibitore selettivo dell'adenililciclastasi stabile [105] o Forskolina (50 nmol/l), un induttore diretto dell'adenililciclastasi [106]. Le cellule sono state lavate due volte ed incubate per due ore in Krebs-Ringer buffer (KRB) in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l), Exendina 9 (100 nmol/l), KH7 (25 mmol/l) o Forskolina (50 nmol/l).

Misurazione dei livelli di cAMP

Abbiamo misurato i livelli di cAMP intracellulare al fine di valutare gli effetti biologici del GLP-1 all'interno della cellula. Le cellule sono state lisate in una soluzione di HCl 0.1% a 4°C. Le concentrazioni del cAMP nel surnatante sono state determinate tramite apposito kit di dosaggio (cAMP enzyme direct immunoassay kit; Sigma-Aldrich, St- Louis, MO) secondo le istruzioni del produttore.

Secrezione di glucagone

24 ore dopo l'impianto, le cellule sono state fatte crescere in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l) per 72 ore. Le cellule sono state poi lavate e incubate per 2 ore in Krebs-Ringer buffer (KRB) in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l). I campioni sono stati aliquotati in provette contenenti aprotinina (0.1 mg/ml) e congelati a -20°C fino al momento del dosaggio del

glucagone effettuato tramite metodica RIA (radioimmunoassay). Questa procedura è stata eseguita usando il Glucagon RIA kit (Millipore Corp. Billerica, MA, U.S.A.) [107] secondo le istruzioni del produttore.

Secrezione del GLP-1

Le cellule sono state fatte crescere in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l) per 72 ore e sono state poi incubate per 2 ore in Krebs-Ringer buffer in assenza di GLP-1 (100 nmol/l). I campioni sono stati successivamente raccolti in provette contenenti aprotinina (0.1 mg/ml) e congelati a -20°C fino all'analisi ELISA del GLP-1 attivo (Millipore Corp. Billerica, MA, U.S.A.) [108].

Quantificazione del contenuto di GLP-1 intracellulare

Dopo esposizione cronica al GLP-1 le cellule sono state incubate in una soluzione di HCl (10 N) ed etanolo (70%) e tenute in agitazione overnight a 4°C. I campioni sono stati poi raccolti in provette e congelati a -20°C fino all'analisi ELISA del GLP-1 totale (Millipore Corp. Billerica, MA, U.S.A.), eseguita secondo le istruzioni del produttore. Il materiale insolubile è stato rimosso mediante centrifugazione.

Preparazione dei lisati cellulari per le analisi dell'espressione delle proteine

I campioni per le analisi dell'espressione proteica sono stati preparati come precedentemente descritto [109,110]. Brevemente, alla fine del periodo di coltura, le cellule sono state lavate due volte con PBS (Phosphate Buffered Saline) freddo e lisate con RIPA buffer (Radio-Immunoprecipitation Assay). Le cellule aderenti sono state staccate dal disco e la sospensione è stata

trasferita in un tubo da centrifuga. I campioni sono stati omogeneizzati tramite sonicazione ed i lisati ottenuti sono stati centrifugati a 10,000 x g a 4°C per 5 minuti. Il surnatante è stato separato dal pellet e conservato a -20°C fino alla quantificazione proteica determinata tramite BCA assay (Thermo Scientific, Pierce, Meridian Rd, Rockford, IL U.S.A.) secondo le istruzioni del produttore.

Isolamento e quantificazione dell'mRNA mediante RT-PCR o Real-Time PCR

L'RNA totale è stato estratto seguendo il protocollo TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) secondo le istruzioni del produttore, purificato con desossiribonucleasi ribonucleasi-free I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) e quantificato mediante spettrofotometria. L'RNA totale è stato retrotrascritto tramite ThermoScript RT[®] e OligodT primers (Invitrogen, Life Technologies, Monza, Italia) per sintetizzare cDNA. La quantificazione del differente livello di espressione genica è stata eseguita tramite lo strumento ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) usando reagenti SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, U.S.A.). Il software Primer Express (Applied Biosystems) è stato usato per creare primers appropriati, che sono stati poi sintetizzati da MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). L'amplificazione genica è stata eseguita usando specifici primers per il topo:

| | |
|--|---------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • 5'-TTGCCTTTGTGATGGACGAA-3' • 5'-AGGAAGTGAAGGAGAGTTCTGTGAA-3' | GLP-1R |
| <ul style="list-style-type: none"> • 5'-CCGCTTCAGCTGAAGCTGCA-3' • 5'-CTGGAAGGAAGTGAAGGAGAGTTC-3' | Pax6 |
| <ul style="list-style-type: none"> • 5'-AGCTTCAGTCCCACAAGGCAGAAT-3' • 5'-GGCCGCAGGAGATGTTGTGAAGAT-3' | Proglucagone |

Ciascun campione è stato analizzato in triplicato. Le variazioni dell'espressione genica sono state determinate con il metodo Comparative CT (DCI) (Applied Biosystems) per Real-Time PCR.

Analisi Western Blot

Aliquote di lisati cellulari sono state sottoposte ad analisi Western blot come precedentemente descritto [111]. In breve, dopo normalizzazione proteica, le proteine sono state sottoposte a SDS-PAGE, trasferite su membrane di nitrocellulosa, incubate con specifici anticorpi e rivelate con un metodo di chemiluminescenza. La membrana di nitrocellulosa è stata poi trattata con Restore[®] stripping buffer (Thermo Scientific, pierce, Meridian Rd, Rockford, IL, U.S.A.) per 12 minuti a temperatura ambiente e successivamente incubata con anticorpo monoclonale anti-actina per la normalizzazione dei lisati. Tutti i segnali immunoblot sono stati visualizzati con metodo ECL (Amersham, Little Chalfont, U.K.) e sottoposti ad analisi densitometrica.

Analisi densitometrica

Per la densitometria delle auto-radiografie del Western Blot è stata usata la versione 1.41 del software ImageJTM (free download disponibile su <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando GraphPad Prism[®] v. 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, U.S.A.).

Statistiche

Le differenze tra le medie dei campioni non appaiati sono state analizzate con test t di Student. È stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0.05$. L'analisi statistica è stata eseguita con il software Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, U.S.A.).

Risultati

Espressione del recettore del GLP-1 nelle cellule α -TC1

Per studiare l'espressione del recettore del GLP-1 (GLP-1R) nel nostro modello cellulare (α -TC1-6), sono state eseguite analisi di espressione genica (tramite Real-Time PCR) e proteica (tramite Western Blot). Il nostro gruppo ha individuato sia l'mRNA che la proteina relativi al recettore per il GLP-1, sebbene a livelli di gran lunga inferiori rispetto a quelli osservati nelle cellule β -TC1 (Fig. 2), usate come controllo positivo. Al contrario, come atteso, non siamo riusciti a valutare l'espressione genica e proteica del GLP-1R nelle cellule InR1G9 (dati non riportati) utilizzate come controllo negativo.

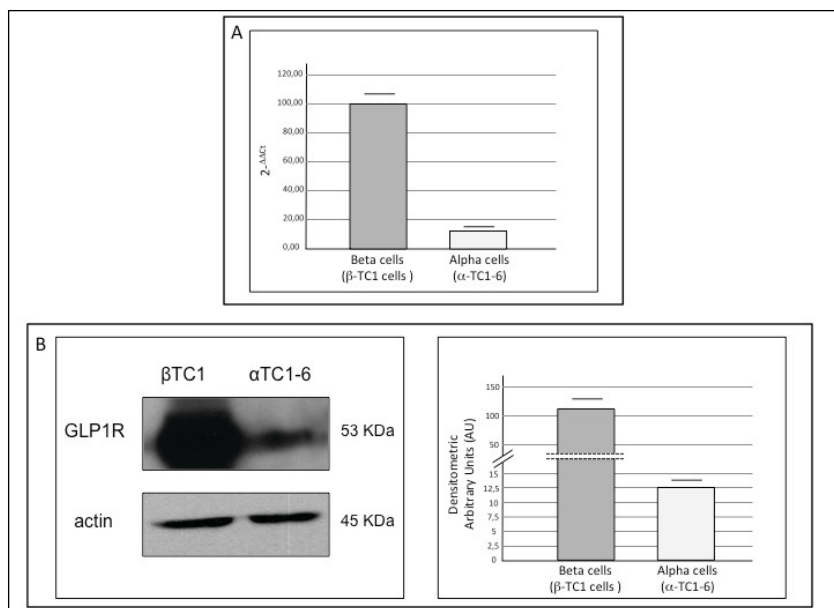


Figura 2 - Espressione del recettore del GLP-1 nelle cellule α -TC1-6. Analisi Real-Time PCR e analisi Western blot dell'espressione rispettivamente del gene e della proteina (A) Il pannello A mostra l'espressione del GLP-1R nelle cellule beta e nelle cellule alfa. (B) La parte sinistra del pannello B mostra un esperimento rappresentativo dell'espressione proteica del GLP-1R nelle cellule α -TC1-6, la parte destra mostra la relativa analisi densitometrica.

Effetto del GLP-1 sui livelli di cAMP

Per stabilire l'attività biologica del GLP-1 nelle cellule α -TC1, abbiamo per prima cosa misurato i livelli di cAMP intracellulare. Allo scopo di determinare l'effetto acuto del GLP-1, le cellule sono state coltivate in assenza di GLP-1 per 72 ore, lavate ed infine stimolate con GLP-1 (100 nmol/l) per 2 ore; in seguito abbiamo misurato il livello intracellulare di cAMP. Nel nostro modello sperimentale dopo esposizione acuta a GLP-1 i livelli di cAMP erano significativamente aumentati (21.94 ± 2.1 vs 12.14 ± 1.1 pmol/ml nelle

cellule di controllo; $n=5$; $p<0,05$ vs controllo).

Successivamente, il livello intracellulare di cAMP è stato misurato in cellule cronicamente (72 ore) esposte al GLP-1 (100 nmol/l) e si è rilevato che i livelli risultavano significativamente più elevati rispetto al controllo ($p<0.05$; $n = 5$). Inoltre, abbiamo misurato i livelli di cAMP in cellule coltivate in presenza sia di GLP-1 che di Exendina 9 (100 nmol/l), un antagonista del recettore del GLP-1. In queste condizioni sperimentali, Exendina 9 inibiva l'effetto stimolatorio del GLP-1 sulla produzione di cAMP (Fig. 3).

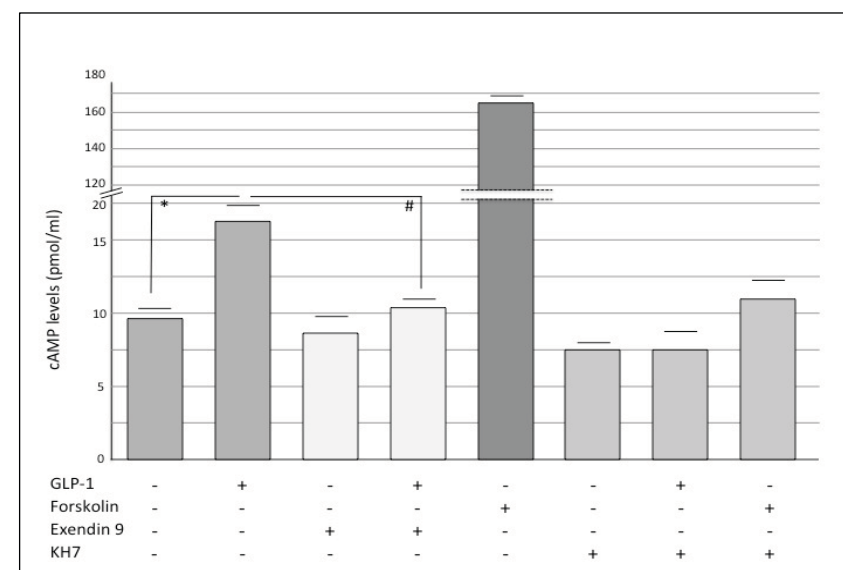


Figura 3 – Livelli di cAMP nelle cellule alfa (α -TC1-6)

I livelli intracellulari di cAMP sono stati misurati mediante analisi ELISA. Le cellule sono state trattate con GLP-1 (100 nmol/l) per 72 ore e durante le ultime 12 ore, sono state coltivate in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l), Exendina 9 (100 nmol/l), Forskolina (50 nmol/l) o KH7 (25 μ mol/l) da soli o in combinazione. Le cellule sono state successivamente lavate due volte e incubate per 2 ore in Krebs-Ringer buffer (KRB) contenente 16.7 mmol/l di glucosio e 0.5% BSA (pH=7.4). I dati sono la media di cinque differenti esperimenti. * $p<0.05$ vs gruppo di controllo; # $p< 0.05$ vs. gruppo trattato con GLP-1.

Abbiamo anche investigato gli effetti della Forskolina (50 nmol/l), un induttore diretto del cAMP, e di KH7 (25mmol/l), un inibitore selettivo dell'adenilatociclastasi solubile. Come previsto, la Forskolina incrementava significativamente i livelli di cAMP intracellulari; al contrario, il KH7 da solo mostrava effetti minimi o del tutto nulli sui livelli di cAMP. Ad ogni modo, quando co-incubato con GLP-1 o con Forskolina, KH7 riduceva significativamente gli effetti di entrambi sui livelli di cAMP (Fig. 3).

Effetti del GLP-1 sul glucagone

Al fine di valutare l'effetto del GLP-1 sulla secrezione del glucagone nel nostro sistema sperimentale, abbiamo misurato i livelli di glucagone dopo esposizione cronica ed acuta al GLP-1.

Per studiare l'effetto acuto, le cellule sono state coltivate in assenza di GLP-1 per 72 ore, lavate e quindi stimulate per 2 ore con GLP-1 (100 nmol/l); successivamente è stata misurata la secrezione di glucagone ed è stato osservato che il suo rilascio risultava significativamente ridotto nelle cellule trattate con GLP-1 (1790 ± 112 pg/ml vs 2400 ± 182 pg/ml nelle cellule di controllo; $n = 5$; $p < 0.05$).

Per studiare gli effetti dell'esposizione cronica al GLP-1 (100 nmol/l) sulla secrezione del glucagone, abbiamo misurato la secrezione dell'ormone in cellule di controllo ed in cellule cresciute per 72 ore in presenza di GLP-1. Al termine delle 72 ore, le cellule sono state lavate e coltivate per altre 2 ore in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l). Infine è stato misurato il rilascio di glucagone. Come mostrato nella figura 4A, la secrezione del glucagone era significativamente più bassa nelle cellule che erano state esposte cronicamente al GLP-1 rispetto a quella misurata nelle cellule di controllo ($p < 0.001$). L'effetto

inibitorio era più ampio di quello osservato dopo esposizione ad insulina (10^{-9} M, per 5 minuti), modulatore fisiologico della secrezione del glucagone ($p < 0.05$, gruppi esposti insulina vs gruppi di controllo). La combinazione di GLP-1 ed insulina non produceva effetti additivi.

Diversamente dalla secrezione di glucagone, il contenuto di glucagone è risultato simile nelle cellule coltivate in presenza o assenza di GLP-1 o insulina (Fig. 4B).

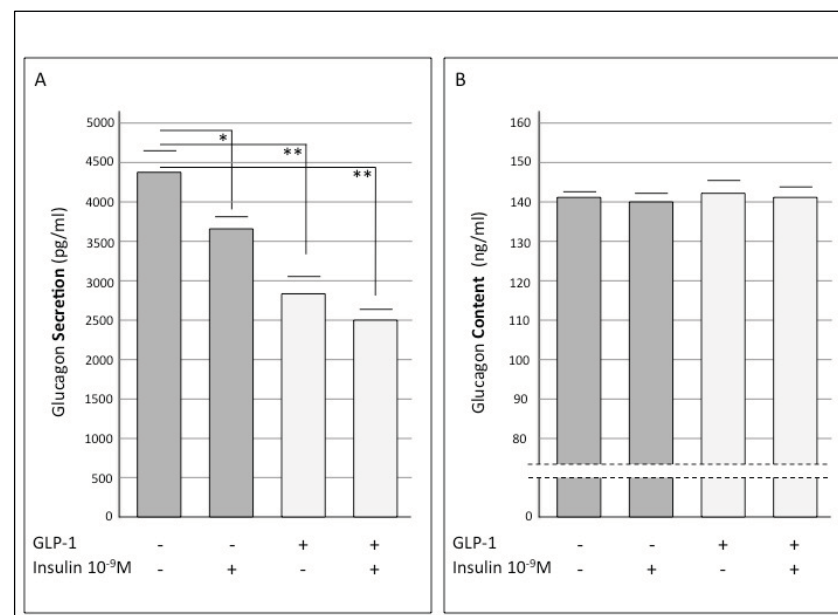


Figura 4 – Secrezione e contenuto del glucagone nelle alfa-cellule (α -TC1-6)

(A) Secrezione del Glucagone in cellule α -TC1 di controllo e in cellule coltivate con GLP-1 (100 nmol/l) per 72 ore. Le cellule sono state coltivate in DMEM con o senza GLP-1 (100 nmol/l) per 72ore, lavate e rimesse in coltura per altre due ore in KRB (glucosio 25 mmol/l) in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l) e/o insulina (10^{-9} M) per 5 minuti. I dati sono espressi in pg/ml; media \pm errore standard (SE), $n=5$; * $p < 0.05$ vs. gruppo di controllo; ** $p < 0.001$ vs. gruppo di controllo

(B) Contenuto intracellulare di glucagone nelle cellule α -TC1. Le cellule sono state

coltivate in DMEM con o senza GLP-1 (100 nmol/l) per 72ore, lavate e rimesse in coltura per altre due ore in KRB (glucosio 25 mmol/l) in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l) e/o insulina (10^{-9} M) per gli ultimi cinque minuti. Le cellule sono state poi lisate in HCl 0.1 M e analizzate per il contenuto di glucagone. I dati sono espressi in ng/ml; media \pm SE, n=5.

Effetto del GLP-1 sulla via delle MAPKs

Poiché è noto che il cAMP sia in grado di regolare la via delle MAP chinasi (MAPKs), abbiamo studiato la capacità del GLP-1 di agire a livello di tale via.

Nel nostro modello sperimentale, α -TC1 coltivate cronicamente in presenza di GLP-1 (100nM), i livelli di Fosfo-44/42^{MAPK} (ERK 1/2) erano significativamente più elevati nelle cellule trattate rispetto alle cellule di controllo ($p < 0.001$ vs controllo, fig. 5A).

Inoltre, allo scopo di evidenziare come tale fenomeno fosse specifico dell'azione del GLP-1, abbiamo condotto alcuni esperimenti in presenza di Forskolina (50 nmol/l), un attivatore dell'adenililcalsi e KH7 (25mmol/l), un inibitore dell'adenililciclastasi. La fosforilazione di 44/42^{MAPK} era significativamente aumentata nelle cellule coltivate in presenza di Forskolina (Fig. 4A) mentre risultava ridotta nelle cellule coltivate in co-presenza di GLP-1 e KH7 (25mmol/l) se confrontate con le cellule che erano state esposte esclusivamente al GLP-1 (Fig. 5A).

In seguito, al fine di verificare se l'effetto del GLP-1 fosse mediato dal recettore del GLP-1 abbiamo eseguito alcuni esperimenti in presenza di Exendina 9 (100 nmol/l), antagonista del recettore del GLP-1. Misurando la fosforilazione di 44/42^{MAPK} in cellule esposte contemporaneamente a GLP-1 ed Exendina-9, non abbiamo osservato nessuna modificazione rispetto alle cellule di controllo (Fig. 5A); il blocco del recettore del GLP-1 tramite l'uso di

un antagonista aboliva il segnale di stimolazione generato dal GLP-1.

Infine, abbiamo svolto alcuni esperimenti su un'altra linea di alfa-cellule pancreatiche (InR1G9), caratterizzata dalla mancanza del recettore per il GLP-1; in queste cellule l'esposizione (100 nmol/l, fino a 72 ore) non influenzava la fosforilazione di 44/42^{MAPK}, come determinato mediante analisi Western blot (Fig. 5B).

In contrasto, la stimolazione acuta (5 min.) con insulina (10^{-9} M) attivava p44/42^{MAPK} in queste cellule.

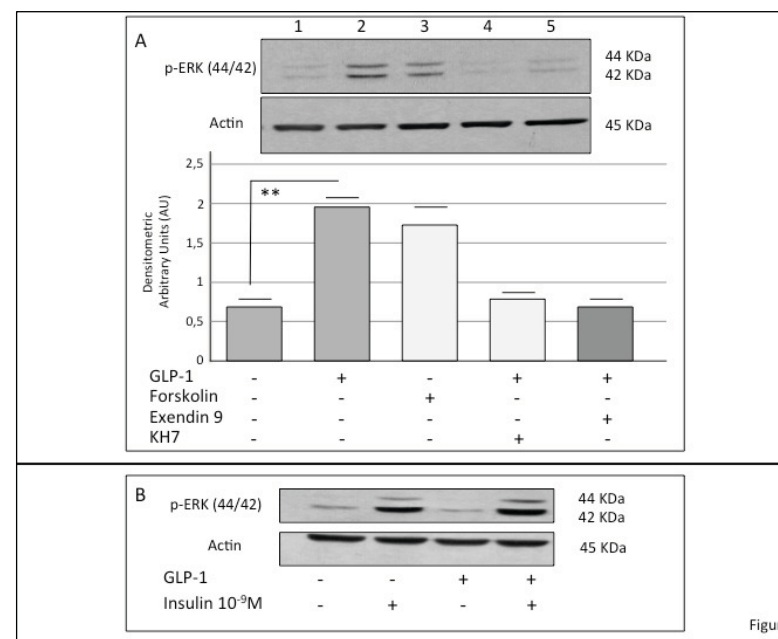


Figura 5 – Analisi Western Blot per la fosforilazione di Erk 44/42 MAPK nelle alfa cellule (α -TC1 e InR1G9).

La parte superiore del pannello A mostra un esperimento rappresentativo di Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) e per l'actina nelle cellule di controllo (colonna 1), in cellule coltivate in presenza di GLP-1 (100 nmol/l) per 72 ore (colonna

2), in cellule trattate con un attivatore dell'adenilicicliasi (Forskolina 50 nmol/l) per 72 ore (colonna 3), in cellule trattate con GLP-1 (100 nmol/l) e un inibitore dell'adenilicicliasi (KH7 25 μ mol/l) per 72 ore (colonna 4) ed in cellule coltivate per 72 ore in copresenza di GLP-1 (100 nmol/l) ed Exendina 9 (100 nmol/l) (colonna 5). La parte inferiore mostra l'analisi densitometrica proveniente da cinque differenti esperimenti. I dati sono presentati come la media \pm ES. ** $p < 0.001$ vs. gruppi di controllo.

(B) Analisi Western blot per Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) e actina nelle cellule InR1G9. Il pannello mostra un esperimento rappresentativo per Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) e per l'actina in cellule coltivate cronicamente con GLP-1 (100 nmol/l) e stimulate con insulina (10^{-9} M) per gli ultimi cinque minuti.

Effetto del GLP-1 su Pax6

Poiché la via di MAPK regola l'espressione di Pax6 attraverso P38^{MAPK} [112,113] abbiamo studiato gli effetti del GLP-1 sull'espressione di Pax6.

Pax6 è un fattore di trascrizione indispensabile per il normale sviluppo di diversi organi, compresi il pancreas ed in particolare le alfa-cellule pancreatiche. Inoltre, Pax6 risulta essere coinvolto nel controllo dell'espressione del gene del proglucagone [114,115,116].

L'espressione genica e proteica di Pax6 è stata analizzata mediante Real Time PCR e Western Blot rispettivamente.

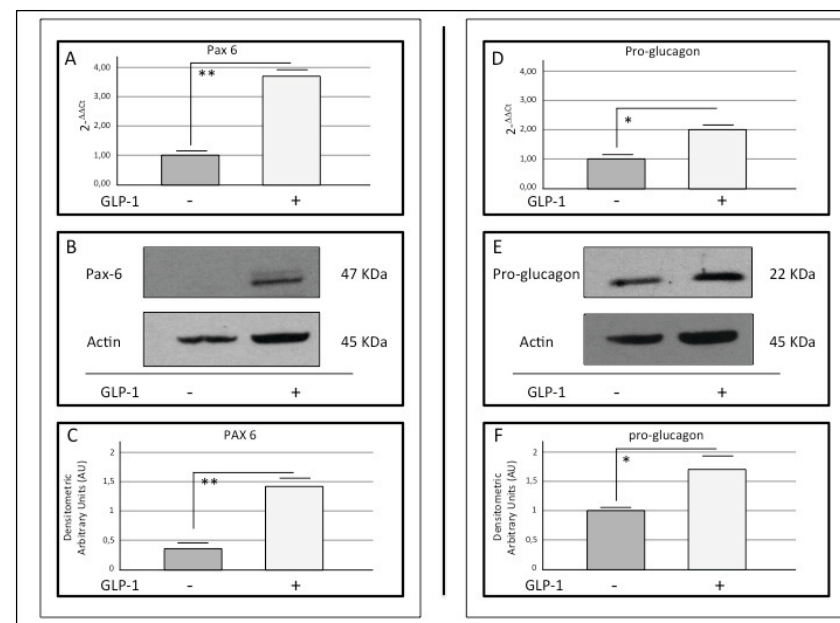


Figura 6 –Analisi Real-time PCR e Western blot per l'espressione del gene e della proteina di Pax6 e del proglucagone

Il pannello (A) mostra l'espressione di Pax 6, determinata mediante analisi Real-Time PCR. Il pannello (B) mostra un Western Blot rappresentativo per la proteina Pax 6. Il pannello (C) mostra l'analisi densitometrica. I dati sono espressi come media \pm ES. ** $p < 0.001$ vs. gruppi di controllo.

Il pannello (D) mostra l'espressione del gene del proglucagone come determinata tramite Real-Time PCR. Il pannello (E) mostra un Western Blot rappresentativo dell'espressione della proteina del proglucagone. Il pannello (F) mostra l'analisi densitometrica. I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0.05$ vs. gruppi di controllo.

Nel nostro modello sperimentale, l'espressione del gene (Fig. 6, pannello A) e della proteina (Fig. 6, pannelli B e C) relativi a Pax6 erano significativamente ($p < 0.05$ vs gruppi di controllo) aumentati nelle cellule coltivate in presenza di GLP-1 (100 nmol/l) per 72 ore.

Effetto del GLP-1 sul proglucagone

Poiché Pax6 controlla l'espressione del gene del proglucagone [112], abbiamo valutato l'espressione del gene e della proteina del proglucagone nelle cellule trattate con GLP-1. L'espressione sia del gene che della proteina sono risultate significativamente aumentate nelle cellule coltivate per 72 ore in presenza di GLP-1 (100 nmol/l) ($p < 0.05$ vs controllo) (Fig. 6, pannelli D, E ed F).

Effetto del GLP-1 sull'espressione delle pro-ormone convertasi PC 1/3 e PC2 dopo la stimolazione con GLP-1

Poiché nelle cellule coltivate con GLP-1 l'espressione del gene del proglucagone e della rispettiva proteina risultavano aumentati, mentre il contenuto di glucagone rimaneva immutato, abbiamo ipotizzato che altri regolatori della produzione glucagone, come gli enzimi di conversione, potessero essere influenzati dal trattamento con GLP-1.

E' noto che l'attività di PC2 (pro-enzima convertasi 2) sia in grado di indurre la conversione del proglucagone in glucagone nelle alfa-cellule e che invece l'attività di PC1/3 produca GLP-1 nelle cellule L intestinali [117,118]. Recenti evidenze indicano che PC1/3 sia espressa anche nelle alfa-cellule pancreatiche dell'uomo e che il GLP-1 sia individuabile nelle isole pancreatiche umane [95]. Sulla base di queste evidenze, abbiamo misurato l'espressione proteica di PC1/3 e PC2 nel nostro sistema. Nelle nostre condizioni sperimentali, l'espressione della proteina PC1/3 era marcatamente più elevata nelle cellule cronicamente esposte al GLP-1 rispetto alle cellule di controllo (Fig. 7, pannello A). L'espressione della proteina PC2, invece, non era influenzata dall'esposizione cronica al GLP-1 (Fig. 7, pannello B).

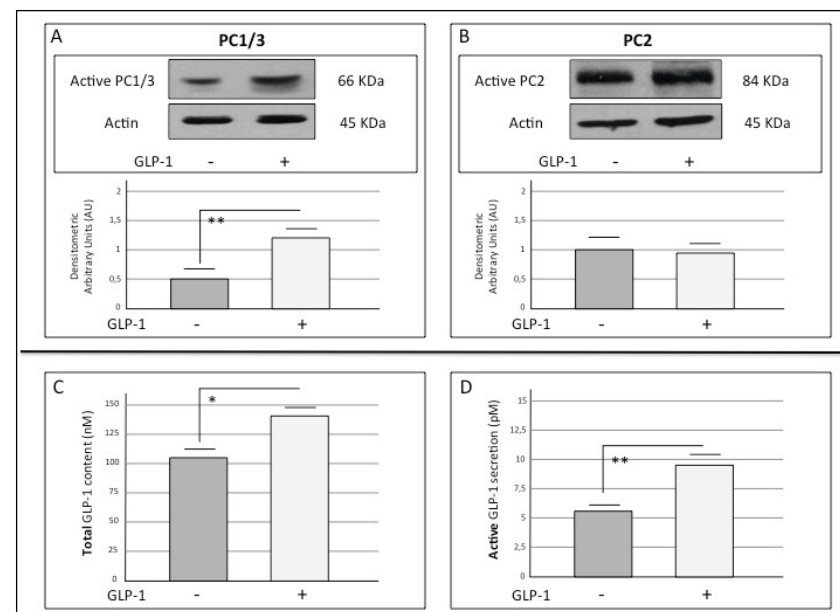


Figura 7 – Analisi Western blot per l'espressione proteica di PC1/3 e PC2 e quantificazione del GLP-1 (attivo e totale)

I pannelli (A) e (B) mostrano rispettivamente Western Blot rappresentativi per PC1/3 e PC2 attivi con le relative analisi densitometriche. I dati sono espressi come media \pm ES. ** $p < 0.001$ vs. gruppi di controllo.

Il pannello (C) mostra il contenuto intracellulare totale di GLP-1 delle cellule coltivate in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l) per 72 ore. I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0.05$ vs. gruppo di controllo.

Il pannello (D) mostra la secrezione acuta di GLP-1 attiva misurata in cellule coltivate in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l) per 72 ore. Dopo la coltura, le cellule sono state lavate in Krebs-Ringer buffer GLP-1-free e incubate per altre due ore in Krebs-Ringer buffer contenente 16.7 mmol/l di glucosio e BSA 0.5% (pH 7.4) in assenza di GLP-1 (100 nmol/l). I dati sono espressi come media \pm ES. ** $p < 0.001$ vs. gruppo di controllo.

Contenuto e secrezione di GLP-1 dopo esposizione cronica a GLP-1

Sulla base dei risultati ottenuti sull'espressione delle pro-ormone convertasi, abbiamo deciso di analizzare il contenuto e la secrezione di GLP-1 dopo esposizione cronica (72 ore) a GLP-1 (100nM).

Nei gruppi pre-esposti cronicamente a GLP-1 il contenuto dell'ormone era significativamente più elevato rispetto ai gruppi di controllo ($p < 0.05$ vs cellule di controllo) (Fig. 8, pannello A).

Abbiamo quindi valutato la secrezione acuta di GLP-1. Dopo un'esposizione per 72 ore al GLP-1, le cellule sono state lavate due volte in Krebs-Ringer buffer (KRB) GLP-1-free e incubate per altre due ore in Krebs-Ringer buffer (KRB) contenente 16.7 mmol/l di glucosio e 0.5% di BSA (PH 7.4) in assenza di GLP-1.

Sorprendentemente, le cellule coltivate cronicamente con GLP-1 rilasciavano una quantità di GLP-1 attivo significativamente maggiore rispetto alle cellule di controllo ($p < 0.05$ vs controllo). (Fig. 8, pannello B).

Per studiare più approfonditamente la capacità del GLP-1 di indurre la sintesi ed il rilascio di altro GLP-1 (feedback positivo) nelle alfa-cellule, abbiamo coltivato le cellule in presenza di Exendina-4, un analogo del GLP-1, e di Exendina-9, un antagonista del recettore del GLP-1.

Nel nostro modello, secrezione e contenuto di GLP-1 erano simili in cellule coltivate con Exendina-4 e non si osservava alcun effetto nei gruppi trattati con Exendina-9 in presenza di GLP-1 (Fig. 8).

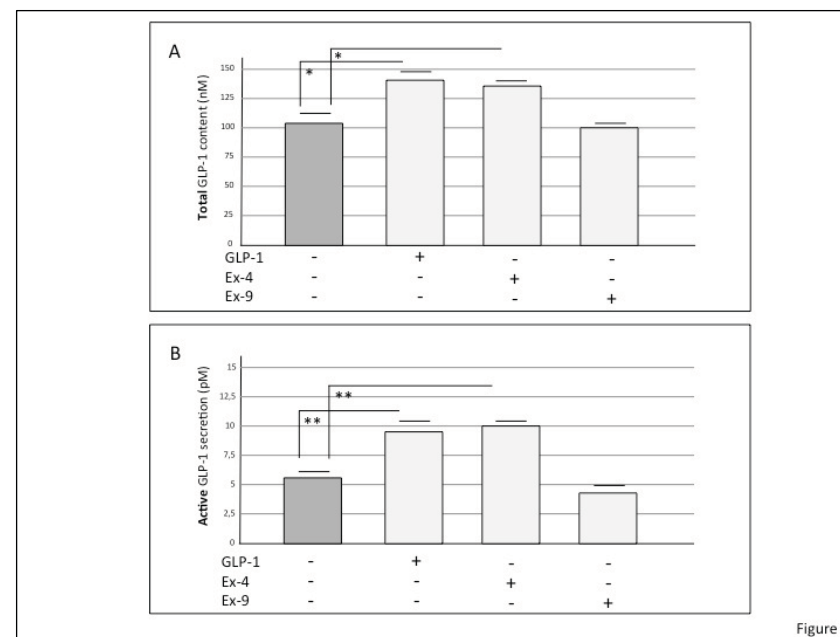


Figure 7

Figura 8 – Quantificazione di GLP-1 (attivo e totale) in cellule cronicamente esposte a GLP-1, Exendina 4 o Exendina 9

Il pannello (A) mostra il contenuto intracellulare di GLP-1 totale in cellule coltivate in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l), Exendina 4 (100 nmol/l) o Exendina 9 (100 nmol/l) per 72 ore. I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0.05$ vs. gruppo di controllo.

Il pannello (B) mostra la secrezione acuta di GLP-1 attivo in cellule coltivate in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l), Exendina 4 (100 nmol/l) o Exendina 9 (100 nmol/l) per 72 ore. Al termine del trattamento le cellule sono state lavate in Krebs-Ringer buffer GLP-1-free e incubate per altre due ore in Krebs-Ringer buffer contenente 16.7 mmol/l di glucosio e BSA 0.5% (pH 7.4) in assenza di GLP-1, Exendina 4 o Exendina 9. I dati sono espressi come media \pm ES. ** $p < 0.001$ vs. gruppo di controllo.

Discussione

I dati ottenuti dimostrano l'esistenza del recettore del GLP-1 nel nostro modello cellulare e forniscono evidenza di un effetto diretto dell'ormone sulle alfa cellule pancreatiche.

Sebbene negli ultimi anni l'interesse scientifico abbia focalizzato la propria attenzione sull'alfa cellula pancreatica, la nostra comprensione generale dei sistemi di funzionamento di questo sistema risulta ancora limitata [48]. Questa mancanza di informazioni è determinata in particolare dalla difficoltà con la quale è possibile purificare ed identificare le cellule alfa all'interno dell'isola pancreatica umana; per tale motivo modelli cellulari, come quello da noi utilizzato, vengono frequentemente adoperati per gli studi *in vitro*.

Le cellule α -TC1 clone 6, utilizzate per questo lavoro sono state ampiamente impiegate in letteratura [119, 120-123] per studiare la secrezione e l'espressione genica del glucagone e, rispetto alle isole pancreatiche, presentano il vantaggio di costituire una popolazione cellulare omogenea di alfa cellule pancreatiche.

Attraverso i nostri studi abbiamo potuto individuare il recettore del GLP-1 (GLP-1R) in questa linea di alfa cellule pancreatiche, sebbene a livelli considerevolmente inferiori rispetto a quelli riscontrati in beta-cellule pancreatiche, come riportato precedentemente in letteratura [124]. Benchè non sia attualmente disponibile in commercio alcun anticorpo specifico per il GLP-1R capace di identificare l'autentica proteina GLP-1R [125,126], noi abbiamo individuato non solo il GLP-1R (proteina e trascritto mRNA) ma anche indiscutibili effetti biologici diretti, come l'incremento dei livelli di cAMP e l'inibizione del rilascio del glucagone. Inoltre, nel nostro modello, l'utilizzo di Exendina-9, antagonista del recettore di GLP-1, annullava gli effetti determinati dal GLP-1.

L'eterogeneità dei dati presenti in letteratura potrebbe essere spiegata dal fatto che non tutte le linee di alfa-cellule pancreatiche esprimono il recettore per il GLP-1.

Un aspetto rilevante di questo lavoro ha riguardato lo studio dell'effetto dell'esposizione cronica al GLP-1 su alfa cellule pancreatiche. E' infatti noto che l'utilizzo delle terapie incretiniche per il diabete determina nei pazienti diabetici un aumento sovralfisiologico dei livelli di GLP-1 nell'organismo; l'aumento è da riferirsi sia alla dose praticata che ai tempi di permanenza dell'ormone in circolo. Questi aspetti sono critici nel campo della terapia del diabete, poiché in letteratura è ampiamente dibattuto il reale beneficio o i possibili rischi che questa classe farmacologica potrebbe determinare nell'uomo [127].

Gli esperimenti iniziali di questo studio hanno dimostrato come la linea cellulare utilizzata rappresentasse un modello idoneo per comprendere come le alfa-cellule reagiscono ad una prolungata esposizione ad alti livelli di GLP-1 (come riscontrato in pazienti affetti da diabete di tipo 2 trattati con inibitori delle DPP-IV o con analoghi del GLP-1).

Nei nostri esperimenti dopo avere esposto cronicamente (fino a 72 ore) le cellule a GLP-1, abbiamo misurato i livelli di cAMP intracellulari e la capacità dell'ormone di attivare la via delle MAPKs. Dai nostri risultati è emerso che le alfa-cellule esposte a GLP-1 per un periodo di tempo prolungato presentavano livelli più elevati di cAMP e di ERK 44/42 fosforilato rispetto alle cellule di controllo. Tali dati, dunque, indicavano che il GLP-1 era capace di attivare la via delle MAPK.

Poiché è stato riportato che questa via regola Pax6, un fattore di trascrizione implicato nella regolazione della sintesi del proglucagone, abbiamo misurato l'espressione sia di Pax6 che del proglucagone [112,128] e abbiamo osservato che l'espressione aumentava nelle cellule cronicamente esposte al GLP-1. Tuttavia, a fronte di una maggiore espressione del proglucagone, il contenuto

intracellulare di glucagone sembrava inalterato. Poiché' anche il GLP-1 deriva dal gene del proglucagone, per chiarire questo dato, abbiamo ipotizzato che il GLP-1 potesse indurre la sintesi del GLP-1 stesso, secondo un meccanismo di feedback positivo.

Abbiamo quindi misurato il contenuto e la secrezione di GLP-1 rilevando che le cellule cronicamente esposte al GLP-1 possedevano un contenuto intracellulare di GLP-1 più elevato e che erano inoltre in grado di secernere GLP-1.

In accordo con questi risultati, abbiamo osservato un incremento dell'espressione di PC1/3, la proteina convertasi che opera il clivaggio del proglucagone per produrre GLP-1; in contrasto, i livelli di PC2, la convertasi tipica delle alfa cellule che cliva il proglucagone in glucagone, rimanevano immutati.

Di conseguenza i nostri dati evidenziano che la prolungata esposizione delle alfa-cellule pancreatiche al GLP-1 incrementa la capacità di queste cellule di produrre e secernere GLP-1 stesso (Fig. 9).

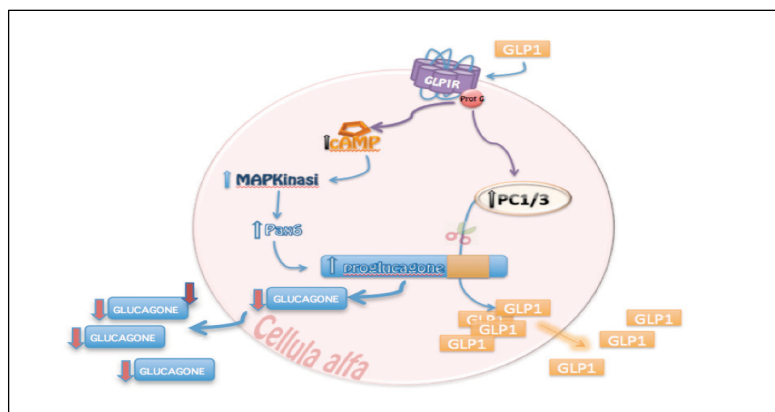


Figura 9 – Rappresentazione schematica dell'effetto del GLP-1 sull'alfa cellula pancreatica.

In letteratura esistono ampie conferme riguardanti la produzione insulare di GLP-1 da parte delle alfa cellule [129-132]. Considerevoli quantità di GLP-1 pienamente processato sono prodotte da alfa-cellule primarie provenienti da isole pancreatiche di ratto isolate [134]. La rigenerazione delle isole pancreatiche conseguente ad una parziale deplezione di beta-cellule nelle isole di ratti neonati si accompagna ad iperplasia delle alfa-cellule con un fenotipo differenziato a produrre GLP-1 [134].

Più recentemente è stato riportato che il clivaggio del proglucagone in GLP-1 si verifica anche nelle isole pancreatiche umane e murine [135]. Infine, un sistema locale di GLP-1 è stato riscontrato nelle isole pancreatiche dell'uomo. La produzione di GLP-1 che si verifica nelle alfa-cellule, è modulata dai nutrienti ed influenzata dal diabete mellito di tipo 2 [95].

Nel nostro modello, abbiamo anche osservato che la prolungata esposizione delle alfa-cellule al GLP-1 induceva l'espressione di Pax6 e della proteina convertasi PC1/3 (Fig. 2). Il fattore di trascrizione Pax6 regola la produzione di glucagone, di insulina e di somatostatina [136,137] ed è stato altresì dimostrato che esso controlla l'espressione del gene del proglucagone attraverso gli elementi G1 e G3 del promoter del proglucagone [113]. Il proglucagone contiene diversi siti di clivaggio che vengono riconosciuti con variabili gradi di efficienza dalle pro-ormone convertasi PC1/3 e PC2. Nelle alfa-cellule pancreatiche, l'abbondante espressione di PC2 è quasi esclusivamente associata alla produzione di glucagone. Tuttavia in queste cellule è presente anche PC1/3 e la sua espressione può essere modulata in varie circostanze. Per esempio, nelle alfa-cellule l'espressione di PC1/3 mediata da adenovirus incrementa la secrezione di GLP-1 da parte delle isole; tale condizione causa una migliorata secrezione di insulina glucosio-mediata e

migliora la sopravvivenza in risposta a un trattamento citochinico [138]. Inoltre, dati presenti in letteratura hanno dimostrato che l'espressione di PC1/3 piuttosto che di PC2 induce nelle alfa-cellule la produzione di GLP-1 e GLP-2 e promuove la sopravvivenza delle isole dopo trapianto [139].

Questi risultati appaiono in contraddizione con il tradizionale paradigma del sistema endocrino in cui tramite segnali "autocrini" generalmente gli ormoni generano un feed-back negativo sulle cellule che li hanno secreti. In accordo con i nostri risultati, altri autori hanno recentemente dimostrato che il glucagone regola la sua sintesi mediante segnali positivi di tipo autocrino [140].

E' possibile che una simile regolazione sia applicabile all'azione del GLP-1 sul proglucagone, sull'espressione di PC1/3 e sulla stessa produzione di GLP-1.

In conclusione, i nostri dati indicano che l'esposizione cronica delle alfa-cellule pancreatiche al GLP-1 aumenta la capacità di queste cellule di produrre e rilasciare GLP-1. Questo fenomeno si verifica attraverso la stimolazione del fattore di trascrizione Pax6 e l'aumento di espressione della proteina convertasi PC1/3. Nonostante possa sembrare forzatamente speculativo trarre conclusioni definitive da uno studio effettuato in vitro, i nostri risultati suggeriscono che questi effetti potrebbero anche verificarsi in pazienti cronicamente trattati con analoghi del GLP-1 o inibitori delle DPP-IV, contribuendo così all'effetto positivo di questi farmaci sulla funzione delle isole durante la terapia.

L'esposizione cronica ad alti livelli di glucosio riduce la secrezione di GLP-1 in una linea di L cellule intestinali (GLUTag): ruolo dell'ATP e della proteina disaccoppiante-2 (UCP-2)

L'effetto incretinico descrive il fenomeno per cui, a parità di livelli glicemici raggiunti, al carico orale di glucosio è associato un maggiore incremento dei livelli di insulina rispetto a quello osservato dopo carico endovenoso (Fig.1)[141,142]. Questo fenomeno è stimato essere responsabile di circa il 70% della secrezione di insulina glucosio indotta [55,143].

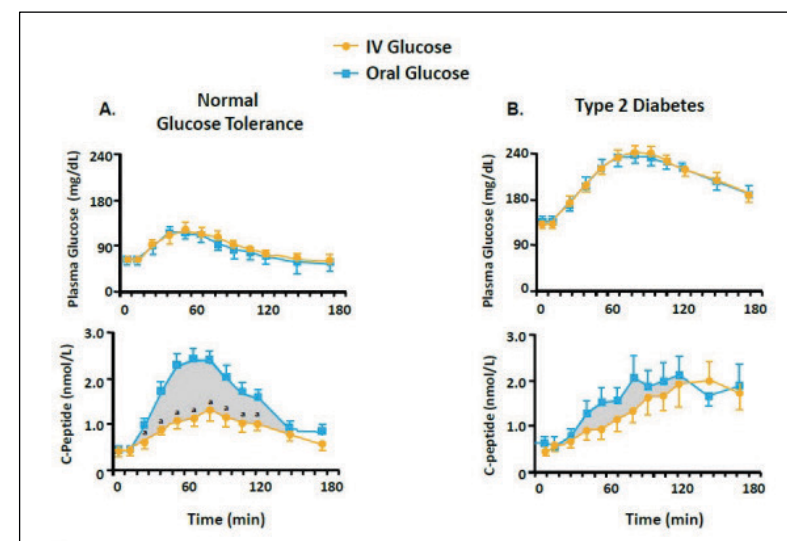


Figura 1 – Effetto incretinico in soggetti normali (A) ed affetti da diabete mellito di tipo 2 (B) (da Nauck et al. Diabetologia.1986;29:46-52)

L'effetto incretinico è maggiormente dovuto a due ormoni, il GLP-1 (Glucagon-like peptide-1), secreto dalle L cellule intestinali, localizzate principalmente nell'ileo distale e nel colon [64] ed il GIP (Glucose-dependent

insulinotropic peptide), rilasciato dalle K cellule ubicate principalmente nel tratto prossimale dell'intestino. Questi ormoni sono secreti in risposta ai nutrienti del pasto e sono in grado di potenziare la secrezione insulinica glucosio-indotta e di inibire il rilascio di glucagone [144] da parte delle isole pancreatiche.

Nei pazienti con Diabete di tipo 2 (DMT2) l'effetto incretinico risulta essere notevolmente ridotto [145](Fig. 1). I meccanismi fisiopatologici responsabili di questa alterazione sono tuttora poco chiari; studi presenti in letteratura dimostrano che potrebbe trattarsi di un difetto acquisito, secondario cioè all'insorgenza del diabete ed alla relativa perdita dell'omeostasi glicemica, e pertanto reversibile [144].

La compromissione del "sistema incretinico" nel diabete di tipo 2 sarebbe quindi descrivibile come una conseguenza delle alterazioni glicemiche e dell'insulino-resistenza, tipiche della patologia stessa, piuttosto che come una causa o un evento patogenetico primario [146-148].

Su queste basi fisiopatologiche risulta verosimile l'ipotesi per cui il progressivo declino dell'effetto incretinico potrebbe essere dovuto, almeno in parte, all'iperglicemia cronica (glucotossicità) tipica del diabete; la prolungata stimolazione del glucosio potrebbe quindi essere responsabile della graduale perdita di "sensibilità" della cellula L e del conseguente alterato rilascio di GLP-1.

Specialmente con il recente sviluppo di terapie attive sul "sistema delle incretine", è di critica importanza non solo individuare gli elementi all'origine del danno secretorio ma, soprattutto, identificare la maniera di modulare la produzione endogena di GLP-1.

Sulla base di queste osservazioni, lo scopo del presente studio è stato quello di determinare se l'esposizione cronica ad alte concentrazioni di glucosio potesse compromettere la risposta fisiologica delle L cellule intestinali alla stimolazione acuta da nutrienti, così come osservato in altri modelli cellulari [149-152; 153-155].

Diversi sono i meccanismi proposti per spiegare il modo in cui le L cellule possono "sentire" il glucosio; la chiusura dei canali del potassio ATP sensibili (K_{ATP}), l'attività dei cotrasportatori sodio-glucosio (SGLT) e l'attivazione di alcuni tipi di recettori coinvolti nel sistema del gusto sembrano essere alla base della sensibilità al glucosio e della funzione secretoria delle L cellule intestinali [156,157].

Proprio come per le beta cellule pancreatiche, un ruolo fondamentale nel sistema di responsività al glucosio è dunque attribuito alla chiusura dei canali K_{ATP} , generata dall'aumento del rapporto tra ATP e ADP conseguente al metabolismo del glucosio.

Poiché l'aumento dell'ATP rappresenta dunque uno snodo fondamentale nel sistema di rilascio del GLP-1, qualunque difetto nel suo processo di produzione potrebbe essere responsabile della ridotta secrezione dell'ormone. Per queste ragioni, utilizzando un modello murino di L-cellule intestinali, GLUTag [158], abbiamo valutato la secrezione di GLP-1 ed i livelli di ATP in cellule esposte cronicamente (fino a 72 ore) ad alti livelli di glucosio.

Oltre che dall'ossidazione mitocondriale del glucosio, la sintesi dell'ATP è regolata anche dall'attività della proteina disaccoppiante 2 (UCP-2). Localizzata a livello della membrana mitocondriale interna, questa proteina agisce come canale protonico disaccoppiando la fosforilazione ossidativa

dalla produzione di ATP; attraverso questo meccanismo parte dell'energia viene dissipata sotto forma di calore e la sintesi di ATP ne risulta ridotta.

Studi precedenti hanno già evidenziato come l'attività di UCP-2 possa regolare negativamente la secrezione di GLP-1 da parte delle L cellule intestinali [159] ed è stato inoltre osservato come l'alterata secrezione insulinica, derivante da un trattamento cronico con alto glucosio o acidi grassi (FFA), sia associata ad una riduzione della sintesi di ATP conseguente ad alterazioni della funzionalità mitocondriale ed iperespressione di UCP-2 [160-162].

Sulla base di queste informazioni, al fine di studiare l'effetto della glucotossicità sulla funzionalità delle L cellule intestinali abbiamo esaminato la secrezione di GLP-1, la sintesi di ATP ed anche i livelli di UCP-2 in cellule GLUTag cronicamente esposte ad alti livelli di glucosio; inoltre, per approfondire ulteriormente l'attività di UCP-2, abbiamo valutato l'effetto del Genipin, un aglicone capace di inibire selettivamente l'attività di UCP-2, e studiato l'espressione di PPAR- γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) [163, 164] coinvolto nella trascrizione del gene di UCP-2.

Materiali e metodi

Modelli cellulari

Le cellule GLUTag (16D1), gentilmente fornite dalla Prof.ssa Gribble (Università di Cambridge) per cortese concessione del Prof. Drucker (Università di Toronto), sono state coltivate a 37°C con il 5% di CO² in DMEM (5.6 mmol/ l glucosio), con aggiunta di 10% FBS, 1% penicillina e streptomina e 2% Glutamina. Il mezzo di coltura è stato cambiato una

volta a settimana e le cellule sono state tripsinizzate quando raggiunta una confluenza del 70% (ogni 5 giorni circa).

Esposizione cronica al glucosio

24 ore dopo l'impianto, le cellule (GLUTag) sono state incubate per 72 ore a 37°C in terreno DMEM completo (5.6 mmol/l glucosio) con aggiunta o meno di extra glucosio (19.6 mmol/l glucosio) per ottenere una concentrazione finale di 25.2 mmol/l. Il medium a 5.6 mmol/l o a 25.2 mmol/l glucosio è stato sostituito ogni 24 ore.

Solo per alcuni esperimenti, durante le ultime 24 ore, le cellule sono state coltivate in presenza del Genipin, specifico inibitore di UCP-2, ad una concentrazione finale di 110 μ M.

Secrezione di GLP-1

Dopo 72 ore di esposizione cronica ad alto glucosio (25mmol/l), le cellule sono state incubate per 2 ore in Krebs-Ringer Buffer (KRB), contenente (in mmol/l) 120 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂ e 0.1 DiprotinA, una miscela di gas 95% O₂/5% CO₂, 1 MgCl₂, 22 NaHCO₃, con 0.5% (wt/vol) BSA a diverse concentrazioni di glucosio (0, 0.5, 5, 25 mmol/l). La genipina e la forskolina sono state preparate come soluzione di partenza in DMSO, la cui concentrazione finale è stata poi aggiustata allo 0.25% per tutte le condizioni testate. Alla fine del periodo di incubazione, il mezzo è stato raccolto e centrifugato. Le cellule sono state lisate ed il lisato è stato poi analizzato per valutare il contenuto totale di proteine utilizzato come normalizzatore. La concentrazione di GLP-1 (7-36) attivo è stata valutata mediante ELISA

(ALPCO Diagnostic). La secrezione è stata normalizzata sulla secrezione basale in assenza di glucosio (8.2 pmol/l in 2h).

Misurazione dell'ATP

Dopo 72 ore di esposizione ad alti livelli di glucosio (25.2 mmol/l), la produzione di ATP è stata valutata mediante apposito kit Cell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA) secondo le istruzioni del produttore.

Preparazione dei lisati cellulari per le analisi dell'espressione delle proteine

I campioni per le analisi dell'espressione proteica sono stati preparati come precedentemente descritto^[106,107]. Brevemente, alla fine del periodo di coltura, le cellule sono state lavate due volte con PBS (Phosphate Buffered Saline) freddo e lisate con RIPA buffer (Radio-Immunoprecipitation Assay). Le cellule aderenti sono state staccate dal disco e la sospensione è stata trasferita in un tubo da centrifuga. I campioni sono stati omogeneizzati tramite sonicazione ed i lisati ottenuti sono stati centrifugati a 10,000 x g a 4°C per 5 minuti. Il surnatante è stato separato dal pellet e conservato a -20°C fino alla quantificazione proteica determinata tramite BCA assay (Thermo Scientific, Pierce, Meridian Rd, Rockford, IL U.S.A.) secondo le istruzioni del produttore.

Analisi Western Blot

Aliquote di lisati cellulari sono state sottoposte ad analisi Western blot come precedentemente descritto^[108]. In breve, dopo normalizzazione proteica, le proteine sono state sottoposte a SDS-PAGE, trasferite su membrane di

nitrocellulosa, incubate con specifici anticorpi e rivelate con un metodo di chemiluminescenza. La membrana di nitrocellulosa è stata poi trattata con Restore[®] stripping buffer (Thermo Scientific, pierce, Meridian Rd, Rockford, IL, U.S.A.) per 12 minuti a temperatura ambiente e successivamente incubata con anticorpo monoclonale anti-actina per la normalizzazione dei lisati. Tutti i segnali immunoblot sono stati visualizzati con metodo ECL (Amersham, Little Chalfont, U.K.) e sottoposti ad analisi densitometrica.

Analisi densitometrica

Per la densitometria delle auto-radiografie del Western Blot è stata usata la versione 1.41 del software ImageJTM (free download disponibile su <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando GraphPad Prism[®] v. 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, U.S.A.).

Saggio MTT

La proliferazione cellulare è stata valutata mediante MTT (bromuro di 3-(4,5 dimetiltiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Le cellule sono state impiantate in multiwell da sei e dopo 24 ore sono state trattate cronicamente (72 ore) con alto glucosio (25 mmol/l); al termine la vitalità cellulare è stata determinata sulla base del tasso di conversione metabolica dell' MTT a formazano.

Statistiche

Le differenze tra le medie dei campioni non appaiati sono state analizzate con test t di Student. È stato considerato statisticamente significativo un valore di

p < 0.05. L'analisi statistica è stata eseguita con il software Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, U.S.A.).

Risultati

Secrezione di GLP-1

Al fine di studiare gli effetti della glucotossicità sulla secrezione di GLP-1 attivo (7-36) nel nostro modello cellulare, abbiamo misurato il rilascio dell'ormone in cellule di controllo cresciute a 5,6 mmol/l di glucosio ed in cellule pre-esposte cronicamente ad alto glucosio (25.2 mmol/l glucosio per 72 ore).

Al termine del trattamento cronico con elevati livelli di glucosio, le cellule sono state incubate per altre due ore in KRB a differenti concentrazioni di glucosio (0, 0.5, 5 e 25 mmol/l) ed infine è stato misurato il rilascio di GLP-1 attivo (7-36).

Come mostrato in Figura 1, nei gruppi di controllo il glucosio stimolava la secrezione di GLP-1 in maniera dose-dipendente ($P < 0.001$); la forskolina (10 μM), un attivatore diretto dell'adenilato ciclasi come atteso provocava il rilascio di GLP-1 ($P < 0.001$) attivo in assenza di glucosio.

Nelle cellule esposte cronicamente ad alti livelli di glucosio (25 mmol/l per 72 ore), la secrezione basale di GLP-1 era lievemente, ma non significativamente, aumentata rispetto al controllo basale mentre il rilascio glucosio-stimolato era significativamente ridotto per tutte le concentrazioni di glucosio testate. L'effetto della forskolina rimaneva inalterato.

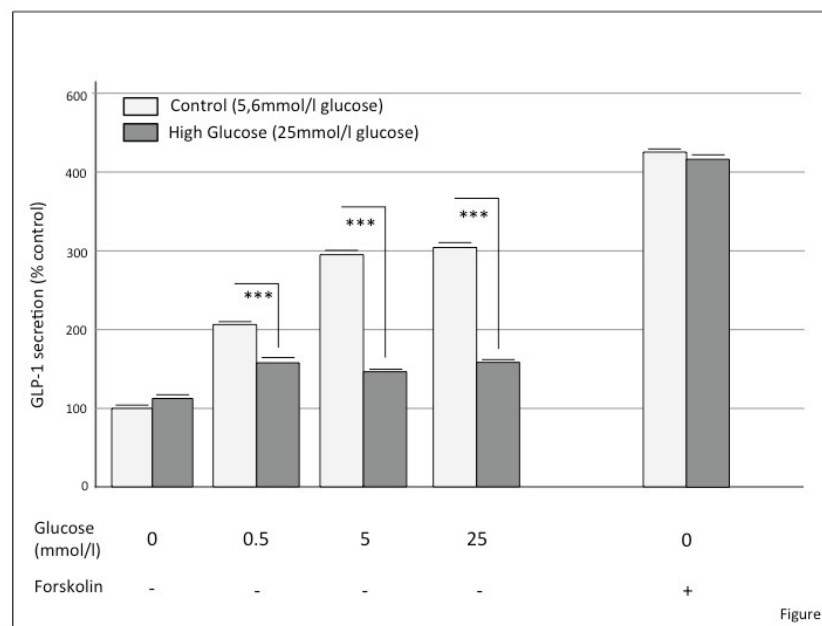


Figure 1

Figura 1 – Secrezione di GLP-1 in cellule GLUTag

Secrezione di GLP-1 in cellule di controllo (cresciute a 5.6 mmol/l di glucosio) ed in cellule esposte per 72 ore ad elevati livelli di glucosio (25.2 mmol/l). Dopo il periodo di trattamento ad alto glucosio le cellule sono state lavate in KRB privo di glucosio e poi incubate per altre due ore in KRB a crescenti concentrazioni di glucosio. I dati sono espressi come percentuale del controllo in assenza di glucosio. *** $p < 0.001$

Espressione proteica dei trasportatori del glucosio

Allo scopo di esaminare i principali elementi coinvolti nel trasporto degli zuccheri a livello intestinale, abbiamo deciso di analizzare l'espressione di GLUT1 e GLUT2, responsabili del trasporto facilitato del glucosio a livello della membrana basale della L cellula [81,165] e di SGLT1, responsabile del trasporto attivo a livello della membrana apicale.

Come mostrato in figura 2 abbiamo identificato tutti e tre i tipi di trasportatori ma senza nessuna differenza di espressione tra i gruppi di

controllo e le cellule pre-esposte (72 ore) ad alto glucosio (25.2 mmol/l).

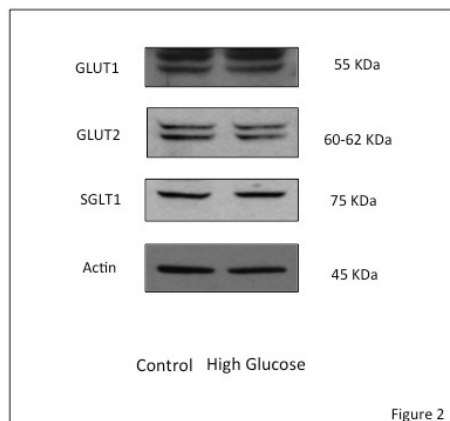


Figura 2 – Western Blot per GLUT1, GLUT2 e SGLT1 in cellule GLUTag
Western Blot rappresentativi per GLUT1, GLUT2 e SGLT1 e per l'actina in cellule di controllo ed in cellule trattate cronicamente (72 ore) con alti livelli di glucosio (25.2 mmol/l).

Produzione di ATP

Proprio come già osservato in altre cellule endocrine, la secrezione di GLP-1 da parte delle L cellule intestinali è provocata dall'innalzamento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} [79]; questo fenomeno può essere ottenuto, almeno in parte, grazie all'aumento dei livelli intracellulari di ATP conseguente al metabolismo mitocondriale.

Su queste basi, allo scopo di esaminare più approfonditamente le origini delle alterazioni secretorie indotte dalla glucotossicità, abbiamo valutato i livelli di ATP in cellule trattate cronicamente con alti livelli di glucosio (25.2 mmol/l per 72 ore).

Come mostrato in Figura 3, nei gruppi di controllo il glucosio stimolava la produzione di ATP in maniera dose-dipendente ($P < 0.001$).

Nelle cellule pre-esposte cronicamente ad alti livelli di glucosio (25 mmol/l per 72 ore), la produzione basale di ATP era lievemente, ma non significativamente, aumentata rispetto al controllo basale mentre il rilascio glucosio-stimolato era significativamente ridotto per tutte le concentrazioni di glucosio testate.

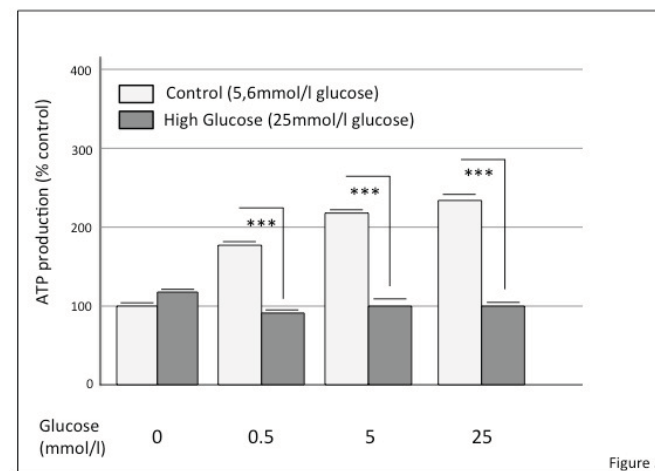


Figura 3 – Produzione di ATP in cellule GLUTag
Produzione di ATP in cellule di controllo (cresciute a 5.6 mmol/l di glucosio) ed in cellule esposte per 72 ore ad elevati livelli di glucosio (25.2 mmol/l). Dopo il periodo di trattamento ad alto glucosio le cellule sono state lavate in KRB privo di glucosio e poi incubate per mezz'ora in KRB a crescenti concentrazioni di glucosio. I dati sono espressi come percentuale del controllo in assenza di glucosio. *** $p < 0.001$

Espressione proteica di UCP-2

Come già precedentemente osservato in linee di beta cellule pancreatiche [160-162] l'iperlipidemia o l'iperlipidemia croniche possono indurre un aumento dell'espressione di UCP-2 (Uncoupling Protein-2) che neutralizzando il gradiente protonico a livello della membrana mitocondriale interna provoca un netto decremento della produzione di ATP.

Per queste ragioni, abbiamo misurato l'espressione di UCP-2 in cellule cronicamente trattate con alti livelli di glucosio.

Come mostrato in figura 4 i livelli della proteina UCP-2 erano significativamente più elevati in cellule pre-esposte ad alti livelli di glucosio (25.2 mmol/l) per 72 ore.

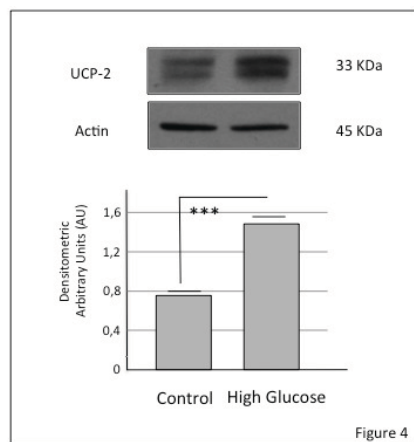


Figura 4 – Western Blot per UCP-2 in cellule GLUTag
Western Blot rappresentativo per UCP-2 e per l'actina in cellule di controllo ed in cellule trattate cronicamente (72 ore) con alti livelli di glucosio (25.2 mmol/l). La parte inferiore mostra l'analisi densitometrica proveniente da quattro diversi esperimenti. I dati sono espressi come la media \pm ES; ***p<0.001 vs. gruppi di controllo.

Espressione proteica di PPAR- γ

In condizioni di iperglicemia la trascrizione di UCP-2 è attivata da un gruppo di proteine regolatrici come i Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) [163,164]; in particolare PPAR- γ è noto come regolatore del metabolismo del glucosio.

Per queste ragioni, al fine di approfondire l'azione di UCP-2 in corso di iperglicemia cronica, abbiamo misurato l'espressione di PPAR- γ in cellule

cronicamente trattate con alti livelli di glucosio.

Come mostrato in figura 5 i livelli della proteina erano significativamente più elevati in cellule pre-esposte ad alti livelli di glucosio (25.2 mmol/l) per 72 ore.

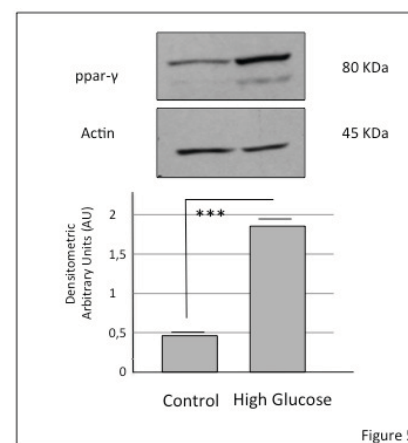


Figura 5 – Western Blot per PPAR- γ in cellule GLUTag
Western Blot rappresentativo per PPAR- γ e per l'actina in cellule di controllo ed in cellule trattate cronicamente (72 ore) con alti livelli di glucosio (25.2 mmol/l). La parte inferiore mostra l'analisi densitometrica proveniente da quattro diversi esperimenti. I dati sono espressi come la media \pm ES; ***p<0.001 vs. gruppi di controllo.

Inibizione di UCP-2

Al fine di studiare ulteriormente il ruolo di UCP-2 nell'alterazione secretoria osservata in cellule L esposte ad iperglicemia cronica, abbiamo deciso di valutare gli effetti del Genipin, un aglicone capace di inibire selettivamente l'attività di UCP-2 [166].

Le cellule sono state esposte ad alti livelli di glucosio per un totale di 72 ore e nelle 24 ore finali è stato aggiunto il Genipin ad una concentrazione finale di 110 μ M, come usato in letteratura. Al termine del trattamento le cellule sono

state incubate per altre due ore in KRB a differenti concentrazioni di glucosio (0, 0.5, 5 e 25 mmol/l) ed infine è stato misurato il rilascio di GLP-1 attivo (7-36).

Come è possibile osservare in figura 6 la presenza del Genipin ripristinava il pattern secretorio ai livelli dei gruppi di controllo.

In cellule trattate con alte concentrazioni di glucosio e Genipin, il rilascio glucosio-stimolato di GLP-1 risultava significativamente aumentato rispetto ai gruppi coltivati solo con alte concentrazioni di glucosio ed inoltre la secrezione basale era leggermente diminuita.

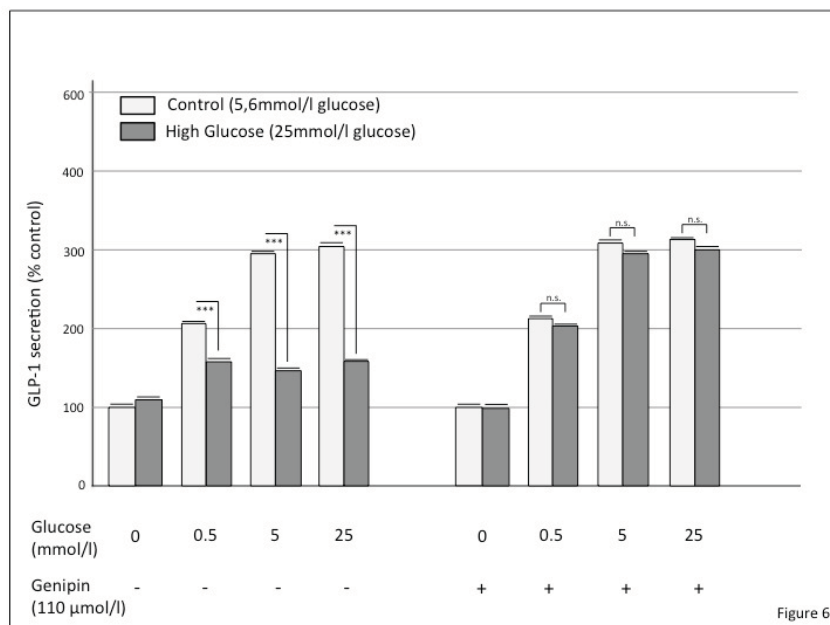


Figura 6 – Secrezione di GLP-1 in cellule GLUTag. Secrezione di GLP-1 in cellule di controllo (5.6 mmol/l di glucosio) ed in cellule esposte per 72 ore ad elevati livelli di glucosio (25.2 mmol/l) coltivate, per le ultime 24 ore, in presenza dello specifico inibitore di UCP-2, Genipin (110 μM). Dopo il periodo di

trattamento le cellule sono state lavate in KRB privo di glucosio e poi incubate per altre due ore in KRB a crescenti concentrazioni di glucosio. I dati sono espressi come percentuale del controllo in assenza di glucosio. *** p<0.001

Sopravvivenza cellulare

Al fine di determinare gli effetti dell'iperglicemia cronica, abbiamo deciso di analizzare la vitalità cellulare nel nostro modello.

Le cellule sono state coltivate cronicamente (72 ore) in presenza di alte concentrazioni di glucosio (25.2 mmol/l) ed alla fine dell'esposizione è stato eseguito un saggio MTT. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il trattamento non alterava la sopravvivenza cellulare.

Discussione

I dati ottenuti in questo studio dimostrano, per la prima volta, come la glucotossicità sia capace di inibire sensibilmente la secrezione di GLP-1 glucosio-indotta in una linea di L cellule intestinali. Ad oggi, infatti, non sono noti gli effetti che livelli elevati e cronici di glucosio, come quelli osservati nel diabete, possano avere sulle cellule enteroendocrine secernenti GLP-1.

Nel nostro studio abbiamo altresì avuto modo di osservare che lo stato di iperglicemia simulato *in vitro* è responsabile di una ridotta produzione di ATP come conseguenza dell'iper-espressione di UCP-2.

I pazienti con diabete di tipo 2 presentano abitualmente elevati livelli plasmatici di glucosio [149,152] in parte responsabili della ridotta sensibilità all'insulina; negli stessi pazienti è stato recentemente osservato anche un alterato effetto incretinico [12] e tuttora le origini di questa alterazione sono poco chiare.

Proprio in virtù di queste conoscenze abbiamo deciso di valutare se l'esposizione cronica ad alti livelli di glucosio potesse in qualche modo

compromettere la funzionalità delle cellule secernenti GLP-1 ed essere quindi responsabile del ridotto effetto incretinico osservato in pazienti con diabete di tipo 2.

Per simulare un'iperglicemia cronica, abbiamo esposto per 72 ore cellule appartenenti alla linea murina GLUTag ad alti livelli di glucosio (25.2 mmol/l). Le cellule GLUTag sono state ampiamente usate in letteratura per studiare la secrezione di GLP-1 [167]; esse appaiono ben differenziate e riproducono la responsività delle colture primarie di L-cellule intestinali ai seretagoghi fisiologici e farmacologici del GLP-1 [158,168].

I nostri risultati dimostrano l'esistenza di un massiccio effetto inibitorio sulla secrezione glucosio-stimolata di GLP-1 a seguito di un trattamento cronico con alte concentrazioni di glucosio. Questo fenomeno si accompagna ad un forte decremento nella sintesi di ATP come conseguenza dell'incapacità della L cellula di rispondere alla stimolazione acuta da parte del glucosio. Nel corso delle nostre ricerche abbiamo anche potuto osservare come l'iper-espressione di UCP-2 (Fig. 8) potesse contribuire allo sviluppo di questa anomalia e che, infatti, la sua inibizione selettiva permetteva il ripristino della normale funzionalità secretoria.

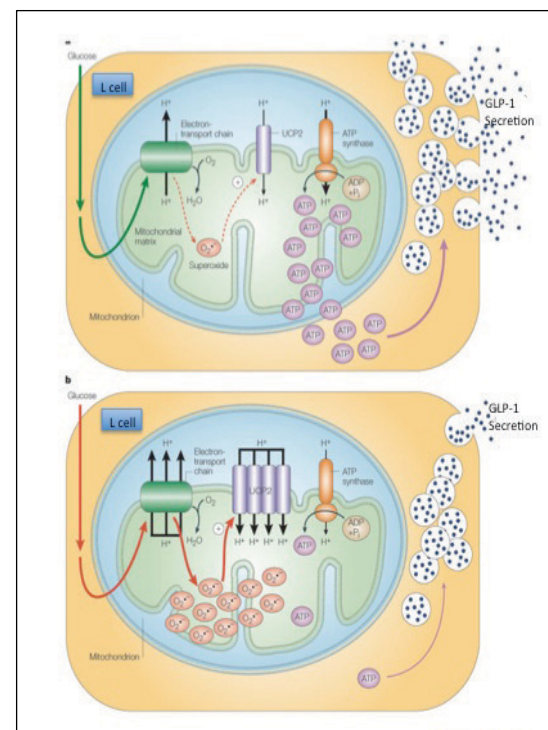


Figura 8 – Rappresentazione grafica dell'attività di UCP-2 (da Krauss et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Mar;6(3):248-61)

Investigando i meccanismi responsabili dell'aumentata espressione di UCP-2 abbiamo trovato che PPAR- γ risulta coinvolto in questo processo; è noto infatti che questo recettore è implicato nell'attivazione della trascrizione di UCP-2 [164] negli stati di iperglicemia o iperlipidemia.

Il meccanismo che sta alla base dell'acquisizione del glucosio da parte delle L-cellule intestinali è tuttora oggetto di studio: trasportatori SGLT1 [81], canali potassio ATP dipendenti [76] e recettori per il gusto [169,170] sono i protagonisti principali.

Sebbene sia stato affermato che l'assorbimento elettrogenico, mediante i trasportatori SGLT-1, costituisca il principale mezzo di assorbimento del glucosio da parte delle L cellule intestinali [79], i dati ottenuti in questo progetto mettono in evidenza che un meccanismo di tipo metabolico, a valle dell'assorbimento mediato da SGLT-1 o da altri trasportatori, giochi un ruolo non meno importante.

Studi precedenti hanno confermato che sia le subunità Kir6.2 e SUR1 dei canali K_{ATP} che la glucochinasi, l'enzima tipico dell'unità glucosensoria delle beta cellule, sono altamente espressi in L-cellule purificate di topo; queste proteine sono state inoltre rilevate mediante immunocistochimica anche in cellule umane. Studi di elettrofisiologia e di secrezione hanno dimostrato che i canali K_{ATP} presenti a livello delle L cellule sono funzionanti e che le sulfoniluree stimolano la secrezione di GLP-1 da colture primarie di colon.

Per quanto riguarda l'attività dei glucotrasportatori GLUT, il loro ruolo nel processo di secrezione degli ormoni incretinici è ancora poco chiaro; se da un lato è stato dimostrato che la loro inibizione farmacologica non ha effetti significativi sulla secrezione di GLP-1 in colture primarie di L-cellule intestinali e che l'utilizzo della floretina (inibitore selettivo della famiglia dei GLUT) impedisce sì l'accumulo di glucosio ma il suo effetto sulla secrezione di GLP-1 è limitato alla linea GLUTag, è stato altresì osservato che topi privi di GLUT-2 mostrano ridotte concentrazioni di plasmatiche di GLP-1 in risposta ad un carico orale di glucosio.

E' noto che la secrezione di GLP-1 è determinata da uno stimolo di tipo orale; nel classico modello di assorbimento del glucosio da parte delle L-cellule il trasportatore SGLT-1, localizzato sulla membrana apicale, agisce da sensore luminale delle variazioni di glucosio mentre l'azione di GLUT2,

localizzato sulla membrana basolaterale, definisce le concentrazioni glucidiche intracellulari. Kellet e Laroche [171] hanno rivisitato questo modello suggerendo una nuova visione del meccanismo di assorbimento per cui, in presenza di diete ad alto indice glicemico, GLUT-2 traslocherebbe a livello della membrana apicale e parteciperebbe all'assorbimento luminale del glucosio. Secondo questa teoria, l'individuazione di GLUT-2 a livello apicale costituirebbe un marker di patologia diabetica.

Sulla base di questo modello è quindi ragionevole ipotizzare che durante gli stati di iperglicemia cronica, come quella riscontrabile in presenza di diabete mellito o come simulato nel nostro sistema in vitro, il ruolo di GLUT-2, e di conseguenza dell'enzima glucochinasi, potrebbe essere molto più importante di quello giocato in condizioni di normoglicemia.

Tuttavia la validità dei nostri risultati non è strettamente correlata alla presenza o al ruolo giocato dai GLUT, infatti, anche il glucosio assorbito mediante il trasportatore SGLT-1 contribuisce alla secrezione di GLP-1 dipendente dal metabolismo mitocondriale.

Con il recente avvento di farmaci antidiabetici, volti a mimare l'azione del GLP-1 o a prevenirne la sua degradazione, è diventato cruciale focalizzare l'attenzione sulla cellula L e sul possibile controllo, modulazione o addirittura stimolazione della produzione endogena di GLP-1. Migliorare la secrezione dell'ormone direttamente *in situ* potrebbe, infatti, rappresentare una strategia terapeutica più fisiologica e più facilmente tollerabile dall'organismo per la cura del diabete.

Questo approccio richiede però una comprensione approfondita non solo dei meccanismi alla base del rilascio fisiologico di GLP-1 da parte della cellula L ma anche dei fattori che potrebbero essere responsabili di modificazioni o

alterazioni a carico di questo sistema finemente controllato.

In conclusione, in questo lavoro dimostriamo che la glucotossicità può contribuire alla compromissione del sistema incretinico tipica del diabete di tipo 2 e che la capacità secretoria del GLP-1 potrebbe quindi progressivamente diminuire con l'aumentare dell'iperglicemia e della severità del diabete.

Queste conoscenze potrebbero rappresentare un primo passo verso lo sviluppo di nuove terapie per il diabete basate sull'incremento endogeno della produzione di GLP-1 attraverso meccanismi diretti o secondari all'ottenimento di una migliore funzionalità delle cellule L.

CONCLUSIONI

L'introduzione nella pratica clinica delle incretine – analoghi del GLP-1 ed inibitori del DPP-IV - ha rappresentato una significativa innovazione nel trattamento del Diabete Mellito di tipo 2. Queste terapie sono oggi ampiamente utilizzate ed oltre ad un'efficacia non inferiore a quelle già disponibili, offrono anche i vantaggi di un basso rischio di ipoglicemia e di molteplici effetti positivi a livello extrapancreatico.

Ciononostante il loro sempre più esteso impiego ha messo in evidenza una serie di nuovi quesiti che meritano indagini più approfondite.

Uno di essi riguarda l'effetto dei livelli sovralfisiologici e prolungati di GLP-1 che si ottengono con queste terapie; non è infatti evidente se questi aumenti cronici possano avere effetti a lungo termine e/o se le azioni positive riscontrate all'inizio delle terapie perdurino nel tempo o se invece vengano perse con il perdurare delle terapie. Sono ancora meno chiari gli esatti effetti di una tale esposizione cronica in particolare sulle alfa cellule pancreatiche.

Il DMT2 è una malattia a eziopatogenesi eterogenea, cui concorrono sia una diminuita sensibilità all'azione insulinica da parte dei tessuti periferici (fegato, muscolo e tessuto adiposo) sia difetti della secrezione insulinica da parte della beta cellula pancreatica, incapace di compensare la ridotta azione biologica dell'ormone. A queste modificazioni se ne aggiungono altre, come le alterazioni funzionali dell'alfa cellula e degli ormoni incretinici. Oggi è noto che è l'interazione tra queste disfunzioni che caratterizza l'evoluzione della malattia.

Nel DMT2, dunque, oltre all'attività della beta cellula, anche la funzione alfa cellulare e la risposta incretinica sono alterate determinando una condizione di relativa insulinopenia, iperglicemia ed eccessiva produzione epatica di

glucosio.

Queste alterazioni forniscono il razionale fisiopatologico per un intervento terapeutico basato sul ripristino di equilibrate concentrazioni di insulina e glucagone mediante l'impiego di agonisti del recettore del GLP-1 o inibitori del DPP-IV. Il ripristino di un più fisiologico rapporto tra insulina e glucagone rappresenta quindi un obiettivo terapeutico primario e proprio attraverso questo meccanismo sembra operare il trattamento farmacologico basato sull'aumento prolungato dei livelli di GLP-1. L'infusione dell'ormone è in grado di normalizzare la glicemia potenziando la secrezione insulinica ed inibendo quella di glucagone.

I risultati ottenuti dalle nostre ricerche, condotte su linee di alfa cellule pancreatiche, confermano ed aggiungono nuove informazioni riguardanti gli effetti che il trattamento cronico con GLP-1 ha sulla secrezione di glucagone e sulle alfa cellule pancreatiche.

I nostri dati, inoltre, forniscono evidenza che tali effetti si verificano mediante meccanismi diretti attraverso specifici recettori per il GLP-1 posti sulla membrana plasmatica delle alfa cellule. Ma l'aspetto più originale dei risultati ottenuti in questo progetto riguarda la dimostrazione che l'esposizione cronica al GLP-1 sia capace di amplificare la produzione insulare di GLP-1 stesso. Evidenze riguardanti la capacità dell'alfa cellula di produrre e secernere GLP-1 erano già presenti in letteratura ma i nostri dati si pongono in maniera del tutto innovativa perché dimostrano la presenza di un effetto autocrino per cui il GLP-1 è capace di stimolare la produzione di se stesso all'interno dell'isola.

I nostri risultati suggeriscono che questi effetti potrebbero anche verificarsi in pazienti cronicamente trattati con analoghi del GLP-1 o inibitori delle DPP-

IV, contribuendo così all'effetto positivo di questi farmaci sulla funzione delle isole durante la terapia.

Non è stato ancora totalmente chiarito se un difetto di secrezione e/o azione delle incretine abbia un ruolo primario nella fisiopatologia del DMT2 o se invece sia secondario alle alterazioni metaboliche presenti nella patologia.

Molteplici studi hanno evidenziato che le alterazioni ormonali a carico dell'asse incretinico possono essere secondarie ai difetti dell'omeostasi glucidica ed i dati ottenuti nei nostri studi sulla linea murina di L cellule GLUTag confermano l'ipotesi per cui alterazioni metaboliche, secondarie all'instaurarsi del diabete, siano responsabili del compromesso effetto incretinico tipico della patologia.

Nel nostro modello, lo stato di iperglicemia cronica, simulata mediante trattamento prolungato con alti livelli di glucosio, è causa di una sensibile riduzione della risposta secretoria agli stimoli acuti dei nutrienti. Tale effetto si associa ad una disfunzione del metabolismo mitocondriale. Come già osservato in modelli di alfa e beta cellule pancreatiche, dunque, le alterazioni a carico del macchinario metabolico, dovute peraltro ad una condizione di tossicità cronica da metaboliti, conducono ad un'alterazione funzionale anche nelle L cellule intestinali. Tale disfunzionalità si esplica fenotipicamente in una ridotta secrezione di GLP-1.

Tale difetto potrebbe essere uno degli elementi all'origine dell'alterazione dell'effetto incretinico in pazienti affetti da DMT2. Le terapie sinora sviluppate mirano unicamente a prolungare il mantenimento del GLP-1 in circolo; alla luce dei dati da noi acquisiti una diretta evoluzione in tal senso potrebbe consistere nel valutare l'eventuale modulazione della

produzione/secrezione di GLP-1 in situ direttamente da parte delle stesse L cellule. Secondo quest'ottica, le informazioni riguardanti le alterazioni metaboliche a monte della disfunzione delle L cellule diventano di fondamentale importanza perché forniscono utili spunti per sviluppare strategie terapeutiche che si avvicinano alla patofisiologia del diabete in maniera del tutto innovativa, mirando cioè ad ottenere una maggiore quantità di GLP-1 circolante mediante la modulazione fisiologica della sua produzione in situ.

PRODUZIONE SCIENTIFICA

Chronic exposure to GLP-1 increases GLP-1 synthesis and release in a pancreatic alpha cell line (α -TC1): evidence of a direct effect of GLP-1 on pancreatic alpha cells

Salvatore Piro*, Lorian G. Mascali*, Francesca Urbano, Salvatore Calanna, Agata M. Rabuazzo and Francesco Purrello.

In fase di revisione sulla rivista PLoS One

Cardiovascular Risk Profile in Subjects with Pre-diabetes and New Onset Type 2 Diabetes Identified by HbA1c According to ADA Criteria

Antonino Di Pino, Roberto Scicali, Salvatore Calanna, Francesca Urbano, Concetta Mantegna, Agata Maria Rabuazzo, Francesco Purrello, Salvatore Piro

In fase di revisione sulla rivista Diabetes Care

Intestino come ghiandola endocrina

Salvatore Piro, Lorian Mascali, Francesca Urbano, Agata Maria Rabuazzo e Francesco Purrello

Il Diabete. Vol.25 n.1 Marzo 2013

Beta and alpha cell function in metabolically healthy but obese subjects: relationship with entero-insular axis.

Calanna S, Piro S, Di Pino A, Maria Zagami R, Urbano F, Purrello F, Maria Rabuazzo A

Obesity (Silver Spring). 2013 Feb;21(2):320-5. doi: 10.1002/oby.20017.

miR-296-3p, miR-298-5p and their downstream networks are causally involved in the higher resistance of mammalian pancreatic α cells to cytokine-induced apoptosis as compared to β cells.

Barbagallo D, Piro S, Condorelli AG, Mascali LG, Urbano F, Parrinello N, Monello A, Statello L, Ragusa M, Rabuazzo AM, Di Pietro C, Purrello F, Purrello M.

BMC Genomics. 2013 Jan 29;14:62. doi: 10.1186/1471-2164-14-62.

Separate impact of metabolic syndrome and altered glucose tolerance on early markers of vascular injuries.

Di Pino A, Alagona C, Piro S, Calanna S, Spadaro L, Palermo F, Urbano F, Purrello F, Rabuazzo AM.

Atherosclerosis. 2012 Aug; 223(2):458-62. doi: 10.1016/j.atherosclerosis. 2012.05.008. Epub 2012 Jun 7.

Elevated plasma glucose-dependent insulinotropic polypeptide associates with hyperinsulinemia in metabolic syndrome.

Calanna S, Urbano F, Piro S, Zagami RM, Di Pino A, Spadaro L, Purrello F, Rabuazzo AM.

Eur J Endocrinol. 2012 May;166(5):917-22. doi: 10.1530/EJE-11-0765. Epub 2012 Mar 5.

La cellula L intestinale come target di terapia

Piro S, Mascali LG, Urbano F, Purrello F.

Il Diabete. vol.24 n.1 Marzo 2012

Incretin-based Therapies: A Focus on Alpha Cells and Glucagon Secretion

Salvatore Piro, Francesca Urbano, Agata Maria Rabuazzo and Francesco Purrello.

The Journal of Clinical Metabolism & Diabetes. November 2011, 2(2). 6-24.

BIBLIOGRAFIA

- 1. American Diabetes Association**, Standards of medical care in Diabetes – 2013.
- 2.** Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Diabetes care, 35, 1, January 2012.
- 3. Reece EA, Leguizamon G, Wiznitzer A.** Gestational diabetes: the need for a common ground. Lancet 2009, 373(9677):1789-1797.
- 4. Weir, G.C., Leathy, J. L.** Pathogenesis Of non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus. Joslin's diabetes mellitus. 13th. C. R. Kahn and G. E. Weir editors - Lea & Fabinger. Philadelphia,1994: 240-264.
- 5. Bogardus, C.** Metabolic abnormalities in the development of non-insulin dependent diabetes mellitus. Diabetes mellitus. D. LeRoith, S.I. Taylor, and J.M. Olefski, editors. Lippincot-Raven Publishers. Philadelphia,1996: 459.
- 6. De Fronzo, R.A.** Lilly lecture . The triumvirate: B-cell, muscle, liver. A collision responsible for NIDDM. Diabetes.1987; 37:667-687.
- 7. Faglia G., Beck-Peccoz P.** Malattie del Sistema Endocrino e del Metabolismo, IV edizione. McGraw Hill, 2006; 393-397.
- 8. Unger RH, Orci L.** The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. Lancet 1975; 1:14–16.
- 9. Dedoussis GVZ, Kaliora AC, Panagiotakos DB.** Genes, Diet and type 2 diabetes mellitus: a review. The review of diabetic studies, 2007; 4: 13-24.
- 10. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haefen TW.** Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. Lancet 2005; 365:1333–134.
- 11. Piro S, Anello M, Di Pietro C, Lizzio MN, Patané G, Rabuazzo AM, Vigneri R, Purrello M, Purrello F.** Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. Metabolism. 2002; 51:1340-7.
- 12. Nauck, Stockman, Ebert et al.** Reduced incretin effect in type 2(non-insulin-dependent) diabetes. Diabetologia, 29, 46-52.

- 13. Faglia G., Beck-Peccoz P.** *Malattie del Sistema Endocrino e del Metabolismo*, IV edizione. McGraw Hill, 2006; 393-397.
- 14. Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, Stengard J, Kesaniemi YA.** Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus in a population based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 1992; 35:1060-1067.
- 15. Newman B, Selby JV, King MC, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman GD.** Concordance for type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 1987; 30:763-768.
- 16. Nauck, Stockman, Ebert et al.** Reduced incretin effect in type 2(non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, 29, 46-52.
- 17. Nauck MA, Baller B, Meier JJ.** Gastric inhibitory polipeptide and glucagon-like peptide 1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53 (suppl 3): 190-196.
- 18. Vaag AA, Holst JJ, Volund A, Beck-Nielsen HB.** Gut incretin hormones in identical twins discordant for non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) – evidence for decreased glucagon-like peptide 1 secretion during oral glucose ingestion in NIDDM twins. *Eur J Endocrinol* 1996; 135: 425-432.
- 19. Jensen DH, Aaboe K, Henriksen JE, et al.** Insulin resistance and glucose intolerance independently reduce the incretin effect. *Diabetologia* 2010; 53(Suppl. 1):S262.
- 20. Villareal DT, Robertson H, Bell GI, et al.** TCF7L2 variant rs7903146 affects the risk of type 2 diabetes by modulating incretin action. *Diabetes* 2010; 59:479–485.
- 21. Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NL, Madsen K, Pedersen FZ, Thogersen H, Wilken M, Agero H.** Potent derivatives of glucagon-like peptide 1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J Med Chem* 43: 1664-1669.
- 22. Chia CW, Egan JM.** Incretin-based therapy in type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(10): 3703-3716.
- 23. Aschner P, Kipnes MS, Luncford JK et al.** Effect of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 29: 2638-2643.
- 24. Bonner-Weir S, Orci L.** New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 1982; 31(10): 883-9.
- 25. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A.** The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 14; 2006; 103(7):2334-9.
- 26. Robbins e Cotran.** *Le basi patologiche delle malattie*, VII edizione 2006; Volume 2: 939-952.
- 27. Li Y, Cao X, Li LX et al.** Beta-cell Pdx1 is essential for the glucoregulatory, proliferative and cytoprotective actions of glucagon-like peptide 1. *Diabetes*, 2005; 54: 482-491.
- 28. Ma X, Zhang Y, Gromada J, Sewing S, Berggren PO, Buschard K, Salehi A, Vikman J, Rorsman P & Eliasson L** Glucagon stimulates exocytosis in mouse and rat pancreatic alpha-cells by binding to glucagon receptors. *Molecular Endocrinology* 2005; 19 198–212.
- 29. Persaud SJ, Howell SL.** The biosynthesis and secretion of insulin. Williams G. *Textbook of diabetes*; Blackwell Publishing company 2003; 13:11-17..
- 30. Djiogue S, Nwabo Kamdje AH, Vecchio L, Kipanyula MJ, Farahna M, Aldebasi Y, Seke Etet PF.** *Endocr Relat Cancer.* 2013; 20(1):R1-R17.
- 31. Ohneda A, Watanabe K, Horigome K, Sakai T, Kai Y, Oikawa S.** Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1978, 46(3):504-510.
- 32. Wiederkehr A, Wollheim CB.** Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology* 2006; 147(6):2643-9.
- 33. 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.* 2006; 2(2):241-59.

- 34. 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* 2002; 51(9):2749-56.
- 35. Marino- Buslje C, Martin-Martinez M, Mizuguchi K, Siddle K, Blundell TL** The insulin receptor: from protein sequence to structure “*Biochem. Soc. Trans.*”(1999); 27 (4):715-726.
- 36. Heller RS, Kieffer TJ, Habener JF.** Insulinotropic glucagon-like peptide 1 receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas. *Diabetes* 1997; 46: 785-791.
- 37. Murlin JR, Clough HD, Gibbs CBF, Stokes AM.** Aqueous extracts of the pancreas. 1. Influence on the carbohydrate metabolism of depancreatized animals. *J Biol Chem* 1923; 56:253–296.
- 38. Unger RH, Eisentraut AM, McCall MS, Keller S, Lanz HC, Madison LL.** Glucagon antibodies and their use for immunoassay for glucagon. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959; 102:621–623.
- 39. Unger RH, Eisentraut AM, McCall MS, Madison LL, Sims KR, TimmL, Patman L.** Glucagon antibodies and an immunoassay for glucagon. *J Clin Invest* 1961; 40:1280–1289.
- 40. Unger RH, Eisentraut AM, McCall MS, Madison LL, Sims KR, Patman L.** Measurements of endogenous glucagon in plasma and the influence of blood glucose concentration upon its secretion. *J Clin Invest* 1962 ;41:682–689.
- 41. Exton JH, Jefferson LS, Jr., Butcher RW, Park CR.** Gluconeogenesis in the perfused liver. The effects of fasting, alloxan diabetes, glucagon, epinephrine, adenosine 3',5'monophosphate and insulin. *The American journal of medicine* 1966, 40(5):709-715.
- 42. Unger RH, Orci L.** The role of glucagon in the endogenous hyperglycemia of diabetes mellitus. *Annual review of medicine* 1977, 28:119-130.
- 43. Heller RS, Kieffer TJ, Habener JF.** Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas. *Diabetes* 1997, 46(5):785-791.
- 44. Furuta M, Zhou A, Webb G, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, Steiner DF.** Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice. *The Journal of biological chemistry* 2001, 276(29):27197-27202.
- 45. Rouille Y, Bianchi M, Irminger JC, Halban PA.** Role of the prohormone convertase PC2 in the processing of proglucagon to glucagon. *FEBS letters* 1997, 413(1):119-123.
- 46. Scopsi L, Gullo M, Rilke F, Martin S, Steiner DF.** Proprotein convertases (PC1/PC3 and PC2) in normal and neoplastic human tissues: their use as markers of neuroendocrine differentiation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1995, 80(1):294-301.
- 47. Gromada, J., Franklin, I., and Wollheim, C.B.** Alpha cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr. Rev.* 2007; 28, 84–116.
- 48. Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M.** Electrophysiology of islet cells..*Adv Exp Med Biol.* 2010;654:115-63.
- 49. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F.** The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept,* 2002; 107:63–69
- 50. Mears D.J.** Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca(2+)channels. *Membr Biol.* 2004 Jul 15;200(2):57-66.
- 51. Kumar U, Sasi R, Suresh S, Patel A, Thangaraju M, Metrakos P, Patel SC & Patel YC.** Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1-5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis. *Diabetes* 1999; 48:77–85.
- 52. Prasad K, Daume E, Preuett B, Spilde T, Bhatia A, Kobayashi H, Hembree M, Manna P, Gittes GK.** Glucagon is required for early insulin-□

- positive differentiation in the developing mouse pancreas. *Diabetes* 2002, 51(11):3229-3236.
- 53. Vuguin PM, Kedeas MH, Cui L, Guz Y, Gelling RW, Nejatshaim M, Charron MJ, Teitelman G.** Ablation of the glucagon receptor gene increases fetal lethality and produces alterations in islet development and maturation. *Endocrinology* 2006, 147(9):3995-4006.
- 54. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W.** Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986, 29(1):46-52.
- 55. Baggio LL, Drucker DJ: Biology of incretins.** GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007, 132(6):2131-2157.
- 56. Buffa R, Capella C, Fontana P, Usellini L, Solcia E.** Types of endocrine cells in the human colon and rectum. *Cell and tissue research* 1978, 192(2):227-240.
- 57. Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR.** Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 1987, 2(8571):1300-1304.
- 58. Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF.** Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *The Journal of biological chemistry* 1986, 261(25):11880-11889.
- 59. Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C.** Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience* 1997, 77(1):257-270.
- 60. Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FG, Poulsen SS, Nielsen OV.** Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology* 1986, 119(4):1467-1475.
- 61. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, Larsen S, Madsbad S, Volund A, Holst JJ, Krarup T.** Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes* 2007, 56(8):1951-1959.
- 62. Hansen KB, Vilsboll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK.** Increased postprandial GIP and glucagon responses, but unaltered GLP-1 response after intervention with steroid hormone, relative physical inactivity, and high-calorie diet in healthy subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2011; 96(2):447-453.
- 63. Hansen KB, Vilsboll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK.** Reduced glucose tolerance and insulin resistance induced by steroid treatment, relative physical inactivity, and high-calorie diet impairs the incretin effect in healthy subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2010; 95(7):3309-3317.
- 64. Eissele R, Goke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Goke B.** Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European journal of clinical investigation* 1992; 22(4):283-291.
- 65. Lupi R, Del Guerra S, Mancarella R, Novelli M, Valgimigli L, Pedulli GF, Paolini M, Soleti A, Filipponi F, Mosca F et al.** Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger. *Diabetes & metabolism* 2007; 33(5):340-345.
- 66. Brun T, Hu He KH, Lupi R, Boehm B, Wojtuszciszyn A, Sauter N, Donath M, Marchetti P, Maedler K, Gauthier BR.** The diabetes-linked transcription factor Pax4 is expressed in human pancreatic islets and is activated by mitogens and GLP-1. *Human molecular genetics* 2008; 17(4):478-489.
- 67. Xu G, Kaneto H, Lopez-Avalos MD, Weir GC, Bonner-Weir S.** GLP-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. *Diabetes research and clinical practice* 2006; 73(1):107-110.
- 68. Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF.** Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 2002; 143(8):3152-3161.
- 69. Nauck MA, Wollschlager D, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Willms B.** Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996; 39(12):1546-1553.

- 70. Sokos GG, Nikolaidis LA, Mankad S, Elahi D, Shannon RP.** Glucagon-like peptide-1 infusion improves left ventricular ejection fraction and functional status in patients with chronic heart failure. *Journal of cardiac failure* 2006; 12(9):694-699.
- 71. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, Shannon RP.** Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation* 2004; 109(8):962-965.
- 72. McIntosh CH, Widenmaier S, Kim SJ.** Pleiotropic actions of the incretin hormones. *Vitamins and hormones* 2010, 84:21-79.
- 73. Ahren B, Holst JJ.** The cephalic insulin response to meal ingestion in humans is dependent on both cholinergic and noncholinergic mechanisms and is important for postprandial glycemia. *Diabetes* 2001; 50(5):1030-1038.
- 74. Nauck MA, Vardarli I, Deacon CF, Holst JJ, Meier JJ.** Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia* 2011; 54(1):10-18.
- 75. Theodorakis MJ, Carlson O, Michopoulos S, Doyle ME, Juhaszova M, Petraki K, Egan JM.** Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2006; 290(3):E550-559.
- 76. Reimann F, Gribble FM.** Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes* 2002; 51(9):2757-2763.
- 77. Rorsman P.** The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 1997; 40(5):487-495.
- 78. Reimann F, Gribble FM.** Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes* 2002; 51(9):2757-2763.
- 79. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM.** Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab* 2008; 8(6):532-539.
- 80. Nielsen LB, Ploug KB, Swift P, Orskov C, Jansen-Olesen I, Chiarelli F, Holst JJ, Hougaard P, Porksen S, Holl R et al.** Co-localisation of the Kir6.2/SUR1 channel complex with glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide expression in human ileal cells and implications for glycaemic control in new onset type 1 diabetes. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2007; 156(6):663-671.
- 81. Gribble FM, Williams L, Simpson AK, Reimann F.** A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes* 2003; 52(5):1147-1154.
- 82. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ.** Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 1995; 44(9):1126-1131
- 83. Demuth HU, McIntosh CH, Pederson RA.** Type 2 diabetes--therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Biochimica et biophysica acta* 2005; 1751(1):33-44.
- 84. Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ.** Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* 1999; 140(11):5356-5363.
- 85. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ.** Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminal truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 952-957.
- 86. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S et al.** Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP level in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 3434-3438.
- 87. Drucker, D.J.** The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 2006; 3: 153–165.
- 88. Li Y, Hansotia T, Yusta B, et al.** Glucagon-like peptide 1 receptor signalling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem*; 2003; 278: 471-478.
- 89. Orskov C, Holst JJ, Nielsen OV.** Effect of truncated glucagonlike peptide-1 [proglucagon- (78 –107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology* 1988; 123: 2009–2013.

- 90. Creutzfeldt WO, Kleine N, Willms B, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA.** Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I (7–36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care* 1996; 19: 580–586.
- 91. Fehmann HC, Goke R, Goke B.** Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr Rev* 1995; 16: 390–410.
- 92. Ding WG, Renstrom E, Rorsman P, Buschard K, Gromada J.** Glucagon-like peptide I and glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulate Ca²⁺-induced secretion in rat alpha-cells by a protein kinase A-mediated mechanism. *Diabetes* 1997; 46: 792–800.
- 93. Edholm, T., Degerblad, M., Grybačková, P. et al.** Differential incretin effects of GIP and GLP-1 on gastric emptying, appetite, and insulin-glucose homeostasis. *Neurogastroenterology & Motility*, 22, 2010; 1191–1200, e315.
- 94. Behme MT, Dupre J, McDonald TJ.** Glucagon-like peptide 1 improved glycemic control in type 1 diabetes. *BMC endocrine disorders* 2003, 3(1):3.
- 95. Dunning BE, Foley JE, Ahren B.** Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia* 2005, 48(9):1700-1713.
- 96. Agardh E, Allebeck P, Hallqvist J, Moradi T, Sidorchuk A.** Type 2 diabetes incidence and socio-economic position: a systematic review and meta-analysis. *International journal of epidemiology* 2011, 40(3):804-818.
- 97. Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A.** Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol*. 2008, 199(1):5-19.
- 98. Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF & Rizza RA.** Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85 4053–4059.
- 99. Ashcroft FM, Rorsman P.** Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell* 2012; 148: 1160-1171.
- 100. Webb GC, Dey A, Wang J, Stein J, Milewski M, et al.** Altered proglucagon processing in an alpha-cell line derived from prohormone convertase 2 null mouse islets. *J Biol Chem* 2004; 279: 31068-31075.
- 101. Hamaguchi K, Utsunomiya N, Takaki R, Yoshimatsu H, Sakata T.** Cellular interaction between mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines: possible contact-dependent inhibition of insulin secretion. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 1227-1233.
- 102. Xiao J, Gregersen S, Kruhoffer M, Pedersen SB, Orntoft TF, et al.** The effect of chronic exposure to fatty acids on gene expression in clonal insulin-producing cells: studies using high density oligonucleotide microarray. *Endocrinology* 2001; 142: 4777-4784.
- 103. Piro S, Mascalchi ET, Monello A, Pandini G, Mascali LG, et al.** Palmitate affects insulin receptor phosphorylation and intracellular insulin signal in a pancreatic alpha-cell line. *Endocrinology* 2010; 151: 4197-4206.
- 104. Chen L, Wang P, Andrade CF, Zhao IY, Dube PE, et al.** PKA independent and cell type specific activation of the expression of caudal homeobox gene Cdx-2 by cyclic AMP. *FEBS J* 2005; 272: 2746-2759.
- 105. Fehmann HC, Janssen M, Goke B.** Interaction of glucagon-like peptide-I (GLP-I) and galanin in insulin (beta TC-1)- and somatostatin (RIN T3)-secreting cells and evidence that both peptides have no receptors on glucagon (INR1G9)-secreting cells. *Acta Diabetol* 1995; 32: 176-181.
- 106. Fehmann HC, Habener JF** Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) on a somatostatin secreting cell line. *FEBS Lett* 1991; 279: 335-340.
- 107. Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, et al.** Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* 2003; 144: 5149-5158.

- 108. Wang L, Guo F, Wei S, Zhao R.** Divergent effects of GLP-1 analogs exendin-4 and exendin-9 on the expression of myosin heavy chain isoforms in C2C12 myotubes. *Peptides* 2011; 32: 1313-1319.
- 109. Tian G, Sandler S, Gylfe E, Tengholm A.** Glucose- and hormone-induced cAMP oscillations in alpha- and beta-cells within intact pancreatic islets. *Diabetes* 2011; 60: 1535-1543.
- 110. Barovsky K, Pedone C, Brooker G.** Distinct mechanisms of forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation and forskolin-potentiated hormone responses in C6-2B cells. *Mol Pharmacol* 1984; 25: 256-260.
- 111. Calanna S, Urbano F, Piro S, Zagami RM, Di Pino A, et al.** Elevated plasma glucose-dependent insulinotropic polypeptide associates with hyperinsulinemia in metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol* 2012; 166: 917-922.
- 112. Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, et al.** A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia* 2012; 55: 3262-3272.
- 113. Piro S, Spampinato D, Spadaro L, Oliveri CE, Purrello F, et al.** Direct apoptotic effects of free fatty acids on human endothelial cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18: 96-104.
- 114. Anello M, Spampinato D, Piro S, Purrello F, Rabuazzo AM.** Glucosamine-induced alterations of mitochondrial function in pancreatic beta-cells: possible role of protein glycosylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E602-608.
- 115. Rabuazzo AM, Patane G, Anello M, Piro S, Vigneri R, et al.** Hexokinase shift to mitochondria is associated with an increased sensitivity to glucose in rat pancreatic islets. *Diabetes* 1997; 46: 1148-1152.
- 116. Sengupta R, Sun T, Warrington NM, Rubin JB.** Treating brain tumors with PDE4 inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32: 337-344.
- 117. Mikkola I, Bruun JA, Bjorkoy G, Holm T, Johansen T.** Phosphorylation of the transactivation domain of Pax6 by extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1999; 274: 15115-15126.
- 118. Prasad K, Daume E, Preuett B, Spilde T, Bhatia A, et al.** Glucagon is required for early insulin-positive differentiation in the developing mouse pancreas. *Diabetes* 2002; 51: 3229-3236.
- 119. Hong J, Abudula R, Chen J, Jeppesen PB, Dyrskog SE, Xiao J, Colombo M, Hermansen K.** The short-term effect of fatty acids on glucagon secretion is influenced by their chain length, spatial configuration, and degree of unsaturation: studies in vitro. *Metabolism: clinical and experimental* 2005; 54(10):1329-1336.
- 120. Kisanuki K, Kishikawa H, Araki E, Shirohara T, Uehara M, Isami S, Ura S, Jinnouchi H, Miyamura N, Shichiri M.** Expression of insulin receptor on clonal pancreatic alpha cells and its possible role for insulin-stimulated negative regulation of glucagon secretion. *Diabetologia* 1995; 38(4):422-429.
- 121. McGirr R, Ejbick CE, Carter DE, Andrews JD, Nie Y, Friedman TC, Dhanvantari S** Glucose dependence of the regulated secretory pathway in alphaTC1--6 cells. *Endocrinology* 2005, 146(10):4514-4523.
- 122. Mizusawa N, Hasegawa T, Ohigashi I, Tanaka-Kosugi C, Harada N, Itakura M, Yoshimoto K** Differentiation phenotypes of pancreatic islet beta- and alpha-cells are closely related with homeotic genes and a group of differentially expressed genes. *Gene* 2004, 331:53-63.
- 123. Wang J, Webb G, Cao Y, Steiner DF** Contrasting patterns of expression of transcription factors in pancreatic alpha and beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100(22):12660-12665.
- 124. St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P (1997)** Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas
- 125. Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, et al. (1991)** Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67: 1059-1074.
- 126. Rouille Y, Kantengwa S, Irminger JC, Halban PA (1997)** Role of the prohormone convertase PC1 in the processing of proglucagon to glucagon-like peptide 1. *J Biol Chem* 272: 32810-32816.

- 127. Nie Y, Nakashima M, Brubaker PL, Li QL, Perfetti R, et al.** (2000) Regulation of pancreatic PC1 and PC2 associated with increased glucagon-like peptide 1 in diabetic rats. *J Clin Invest* 105: 955-965.
- 128. De Marinis YZ, Salehi A, Ward CE, Zhang Q, Abdulkader F, et al.** (2010) GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca²⁺ channel-dependent exocytosis. *Cell Metab* 11: 543-553.
- 129. Pyke C, Knudsen LB** (2013) The Glucagon-Like Peptide-1 Receptor--or Not? *Endocrinology* 154: 4-8.
- 130. Panjwani N, Mulvihill EE, Longuet C, Yusta B, Campbell JE, et al.**(2013) GLP-1 receptor activation indirectly reduces hepatic lipid accumulation but does not attenuate development of atherosclerosis in diabetic male ApoE(-/-) mice. *Endocrinology* 154: 127-139.
- 131. Butler PC, Elashoff M, Elashoff R, Gale EA** (2013) A Critical Analysis of the Clinical Use of Incretin-Based Therapies: Are the GLP-1 therapies safe? *Diabetes Care*.
- 132. Kreymann B, Ghatei MA, Domin J, Kanse S, Bloom SR** (1991) Developmental patterns of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide and peptide-YY in rat pancreas and gut. *Endocrinology* 129: 1001-1005
- 133. Butler PC, Elashoff M, Elashoff R, Gale EA** (2013) A Critical Analysis of the Clinical Use of Incretin-Based Therapies: Are the GLP-1 therapies safe? *Diabetes Care*.
- 134. Mojsov S, Kopczyński MG, Habener JF** (1990) Both amidated and nonamidated forms of glucagon-like peptide I are synthesized in the rat intestine and the pancreas. *J Biol Chem* 265: 8001-8008.
- 135. Heller RS, Aponte GW** (1995) Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like peptide-1-(7--36) amide. *Am J Physiol* 269: G852-860.
- 136. Thyssen S, Arany E, Hill DJ** (2006) Ontogeny of regeneration of beta-cells in the neonatal rat after treatment with streptozotocin. *Endocrinology* 147: 2346-2356
- 137. Whalley NM, Pritchard LE, Smith DM, White A** (2011) Processing of proglucagon to GLP-1 in pancreatic alpha-cells: is this a paracrine mechanism enabling GLP-1 to act on beta-cells? *J Endocrinol* 211: 99-106.
- 138. Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, et al.** (2011) Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med* 17: 1481-1489.
- 139. Hansen AM, Bodvarsdottir TB, Nordestgaard DN, Heller RS, Gotfredsen CF, et al.** (2011) Upregulation of alpha cell glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in *Psammomys obesus*--an adaptive response to hyperglycaemia? *Diabetologia* 54: 1379-1387.
- 140. Larsson LI, St-Onge L, Hougaard DM, Sosa-Pineda B, Gruss P** (1998) Pax 4 and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development. *Mech Dev* 79: 153-159.
- 141. Elrick, H. et al.** (1964) Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 24, 1076-1082
- 142. Creutzfeldt, W.** (1979) The incretin concept today. *Diabetologia* 16, 75-85
- 143. Holst, J.J.** (2007) The physiology of glucagon- like peptide 1. *Physiological Reviews* 87, 1409-1439
- 144. Holst JJ, Vilsbøll T, Deacon CF.** The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 297 (1-2): 127-36.
- 145. Vilsbøll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, and Holst JJ.** Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50: 609-613, 2001.
- 146. Knop FK, Vilsbøll T, Højberg PV, et al.** Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes* 2007; 56:1951–1959.
- 147. Nauck MA, El-Ouaghli A, Gabrys B, et al.** Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul Pept* 2004; 122:209–217.

- 148. Meier JJ, Gallwitz B, Askenas M, et al.** Secretion of incretin hormones and the insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in women with a history of gestational diabetes. *Diabetologia* 2005; 48:1872–1881.
- 149. Grodsky GM, Bolaffi JL:** Desensitization of the insulin-secreting beta cell. *J Cell Biochem* 48:3–11, 1992.
- 150. Leahy JL, Cooper HE, Deal DA, Weir GC:** Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. *J Clin Invest* 77:908–915, 1986
- 151. Hoenig M, MacGregor LC, Matschinsky FM:** In vitro exhaustion of pancreatic-cells. *Am J Physiol* 250:E502–E511, 1986.
- 152. Purrello F, Vetri M, Gatta C, Gullo D, Vigneri R:** Effects of high glucose on insulin secretion by isolated rat islets and purified B-cells and possible role of glycosylation. *Diabetes* 38:1417–1422, 1989.
- 153. Cnop, M. 2008.** Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 348–352.
- 154. Delghingaro-Augusto, V. et al. 2009.** Islet beta cell failure in the 60% pancreatectomised obese hyperlipidaemic Zucker fatty rat: severe dysfunction with altered glycerolipid metabolism without steatosis or a falling beta cell mass. *Diabetologia* 52: 1122–1132.
- 155. Poitout, V. 2008.** Glucolipotoxicity of the pancreatic betacell: myth or reality? *Biochem. Soc. Trans.* 36: 901–904.
- 156. Herrmann C., Goke R., Ritcher G., Fehmann HC., Arnold R & Gooke B., 1995.** Glucagon-like peptide-1 and glucose dependent insulin-realising polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56 117-126.
- 157. Ritzel U., Fromme A., Ottleben M., Leonhardt U. & Ramadori G., 1997.** Release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perused rat ileum. *Acta Diabetologia* 34 18-21.
- 158. Drucker DJ, Jin T, Asa SL, Young TA, Brubaker PL:** Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Mol Endocrinol* 8:1646–1655, 1994.
- 159. Hongjie Zhang, Jing Li, Xiangying Liang, Yun Luo, Ke Zen e Chen-Yu Zhang:** Uncoupling protein 2 negatively regulates glucose-induced glucagon-like peptide 1 secretion. *Journal of Molecular Endocrinology* (2012) 49, 151-158.
- 160. Giovanni Patane` , Marcello Anello, Salvatore Piro, Riccardo Vigneri, Francesco Purrello e Agata Maria Rabuazzo:** 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-Inhibition. *Diabetes*, vol. 51, september 2002.
- 161. Medvedev AV, Robidoux J, Bai X, Cao W, Floering LM, Daniel KW, Collins S.** Regulation of the uncoupling protein-2 gene in INS-1 beta-cells by oleic acid. *J Biol Chem* 2002; 277: 42639-42644
- 162. Lameloise N, Muzzin P, Prentki M, Assimacopoulos-Jeannet F.:**Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? *Diabetes* 2001; 50: 803-809
- 163. Alexander V. Medvedev, Sheridan K. Snedden, Serge Raimbaulti, Daniel Ricquieri, and Sheila Collins:** Transcriptional Regulation of the Mouse Uncoupling Protein-2 Gene. Double e-box motif is required for peroxisome proliferator-activated receptor-dependent activation. Received for publication, November 22, 2000, and in revised form, January 5, 2001Published, JBC
- 164. Vian Azzu, Martin Jastroch , Ajit S. Divakaruni, Martin D. Brand:** The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797 (2010) 785–791.
- 165. H. E. Parker & A. Adriaenssens & G. Rogers & P. Richards & H. Koepsell & F. Reimann & F. M. Gribble.** Predominant role of active versus facilitative glucose transport for glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetologia* (2012)
- 166. C.Y. Zhang, L.E. Parton, C.P. Ye, S. Krauss, R. Shen, C.T. Lin, J.A. Porco Jr., B.B. Lowell,** Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets, *Cell Metab.* 3 (2006) 417–427.

- 167. Y.C. Lee, S.L. Asa, D.J. Drucker**, Glucagon gene 50-flanking sequences direct expression of simian virus 40 large T antigen to the intestine, producing carcinoma of the large bowel in transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10705–10708.
- 168. P.L. Brubaker, J. Schloos, D.J. Drucker**, Regulation of glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line, *Endocrinology* 139 (1998) 4108–4114.
- 169. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ et al** (2007) Gut- expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15069– 15074 24.
- 170. Dyer J, Salmon KS, Zibrik L, Shirazi-Beechey SP** (2005) Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans* 33:302–305 25.
- 171. Kellett GL, Brot-Laroche E** Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes*. 2005 Oct;54(10):3056-62. Review.
- 172. Calanna S, Christensen M, Holst JJ, Laferrere B, Gluud LL, Vilsboll T, and Knop FK**. Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies. *Diabetologia* 56: 965-972, 2013.