

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

DOTTORATO DI RICERCA IN:

MEDICINA MOLECOLARE

XXVIII° Ciclo

COORDINATORE: PROF. ALFREDO FERRO

DOTT. ALESSANDRO PAPPALARDO

**RUOLO DEL RECETTORE GABA_A NELLE CELLULE
ALFA PANCREATICHE E SUO COINVOLGIMENTO
NELLE FASI DI DESENSIBILIZZAZIONE INDOTTA
DALLA LIPOTOSSICITA NEL DIABETE DI TIPO II.**

TESI DI DOTTORATO

Relatore:

Chiar.mo Prof. SALVATORE PIRO

ANNO ACCADEMICO 2014 – 2015

INDICE

Il Diabete Mellito	pag.4
• Definizione di Diabete Mellito	pag.4
• Nuovi aspetti della fisiopatologia del diabete	pag.9
• Isola pancreatica	pag.9
• Meccanismo di secrezione	pag.11
• Differenze e analogia tra alfa e beta-cellule	pag.13
• Alfa cellule	pag.14
• Ruolo dell'insulina sull'alfa cellule	pag.17
• Controllo Paracrino delle α -cellule	pag.18
• Ruolo del GABA nel T2DM	pag.20
Sistema Gabaergico	pag.21
• Acido γ -aminobutirrico	pag.20
• Recettori Gabaergici	pag.23
• Recettore GABA _A	pag.23
• Struttura del Recettore GABA _A	pag.25
• Recettore GABA _B	pag.27
• Recettore GABA _C o GABA _p	pag.28
Le Incretine	pag.28
• Effetti del GLP-1	pag.30
• Analoghi Strutturali del GLP-1	pag.33
Scopo del Lavoro	pag.35
Materiali e Metodi	pag.36
• Linea cellule a-TC1 e condizioni di coltura	pag.36

• Preparazione del palmitato	pag.37
• Esposizione Cronica al Palmitato e alla GLP-1	pag.37
• Secrezione di Glucagone	pag.38
• Preparazione dei Lisati Proteici Cellulari	pag.38
• Western Blot	pag.39
• Misurazione del glucagone tramite Metodica RIA	pag.39
• Saggi di vitalità ed MTT	pag.40
• Immunofluorescenza	pag.40
• Analisi Statistica	pag.41
Risultati	pag.41
• Secrezione di glucagone	pag.41
• Via del segnale insulinico	pag.43
• Conclusioni della Prima Parte	pag.48
• Risultati: Seconda Parte	pag.49
• Segnale Insulinico Intracellulare	pag.50
• Conclusioni della Seconda Parte	pag.56
Discussioni	pag.58
Bibliografia	pag.62

Il Diabete Mellito

Definizione di Diabete Mellito

Il diabete mellito (DM) è una malattia metabolica complessa e potenzialmente debilitante, dovuta alla de-regolazione dell'omeostasi glicemica e caratterizzata principalmente da iperglicemia e dall'alterato metabolismo lipidico e proteico. Alla base della patogenesi della patologia, classicamente vengono riconosciuti difetti a carico della secrezione insulinica e l'alterata sensibilità dei tessuti periferici all'ormone. Accanto a questi aspetti classici della patologia, negli ultimi anni molti altri aspetti di fisiopatologia stanno aumentando gli attori della patologia e stanno determinando nuovi bersagli terapeutici e di ricerca per la comprensione di questa patologia.

L'American Diabetes Association (ADA) ha classificato le varie forme di diabete mellito note in base al meccanismo patogenetico [Tabella 1].

<p>I. Type 1 diabetes (β-cell destruction, usually leading to absolute insulin deficiency)</p> <p>A. Immune mediated</p> <p>B. Idiopathic</p>
<p>II. Type 2 diabetes (may range from predominantly insulin resistance with relative insulin deficiency to a predominantly secretory defect with insulin resistance)</p>
<p>III. Other specific types</p> <p>A. Genetic defects of β-cell function</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. MODY 3 (Chromosome 12, HNF-1α) 2. MODY 1 (Chromosome 20, HNF-4α) 3. MODY 2 (Chromosome 7, glucokinase) 4. Other very rare forms of MODY (e.g., MODY 4: Chromosome 13, insulin promoter factor-1; MODY 6: Chromosome 2, <i>NeuroDI</i>; MODY 7: Chromosome 9, carboxyl ester lipase) 5. Transient neonatal diabetes (most commonly ZAC/HYAMI imprinting defect on 6q24) 6. Permanent neonatal diabetes (most commonly KCNJ11 gene encoding Kir6.2 subunit of β-cell K_{ATP} channel) 7. Mitochondrial DNA 8. Others <p>B. Genetic defects in insulin action</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Type A insulin resistance 2. Leprechaunism 3. Rabson-Mendenhall syndrome 4. Lipotrophic diabetes 5. Others <p>C. Diseases of the exocrine pancreas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pancreatitis 2. Trauma/pancreatectomy 3. Neoplasia 4. Cystic fibrosis 5. Hemochromatosis 6. Fibrocalculous pancreatopathy 7. Others <p>D. Endocrinopathies</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Acromegaly 2. Cushing's syndrome 3. Glucagonoma 4. Pheochromocytoma 5. Hyperthyroidism 6. Somatostatinoma 7. Aldosteronoma 8. Others <p>E. Drug or chemical induced</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 <p>F. Infections</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Congenital rubella 2. Cytomegalovirus 3. Others <p>G. Uncommon forms of immune-mediated diabetes</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Stiff-man syndrome 2. Anti-insulin receptor antibodies 3. Others <p>H. Other genetic syndromes sometimes associated with diabetes</p> <ol style="list-style-type: none"> 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
<p>IV. Gestational diabetes mellitus</p>
<p>Patients with any form of diabetes may require insulin treatment at some stage of their disease. Such use of insulin does not, of itself, classify the patient.</p>

Tabella 1 - Etiologic classification of diabetes mellitus [1]

Sulla base di questa classificazione [1], le categorie maggiormente presenti nella popolazione sono: il Diabete Mellito di tipo 1 (T1DM) che rappresenta circa il 5% della popolazione dei soggetti diabetici e il Diabete mellito di tipo II (T2DM) la restante parte. Il T1DM è caratterizzato principalmente dalla distruzione delle β -cellule pancreatiche per fenomeni autoimmunitari con conseguente deficit della secrezione insulinica. Tale patologia può avere origine autoimmune (1A) oppure essere idiopatico (1B) (con caratteristiche poco note).

Il diabete mellito tipo 2 (T2DM) interessa invece il 90-95% della popolazione con diabete. La nuova fisiopatologia del T2DM coinvolge almeno sette tra organi e tessuti, tra cui pancreas, fegato, muscolo scheletrico, tessuto adiposo, cervello, tratto gastrointestinale e reni [Fig. 1]. I segni distintivi del T2DM sono la ridotta sensibilità all'insulina (insulino-resistenza) da parte del fegato, del muscolo e del tessuto adiposo, in presenza di un progressivo declino della funzione β -cellulare, che nel tempo porta alla ridotta secrezione di insulina.

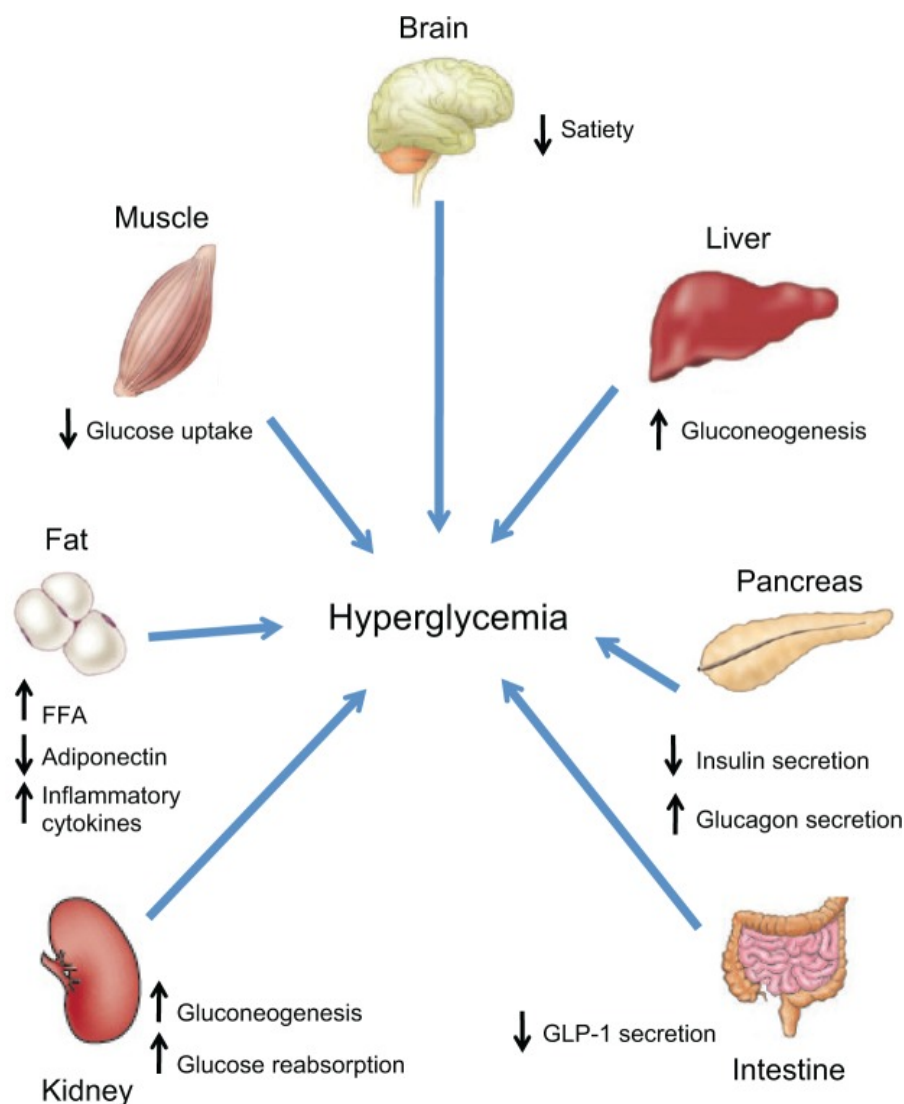


Figura 1 - Fisiopatologia delle disfunzioni multiorgano dovute al T2DM [2].

Questa classificazione, seppur corretta nella divisione eziopatogenetica, presenta dei limiti, perché in ogni categoria patologica esistono sottogruppi di pazienti difficilmente classificabili secondo standard rigidi e ciò è dovuto ad

alcune caratteristiche eterogenee della patologia. Recentemente sono stati riconosciuti gruppi di pazienti con caratteristiche intermedie tra T1DM e T2DM e viceversa. Queste sottoclassi sono riconosciute come categorie indipendenti (diabete autoimmune degli adulti - LADA, oppure diabete autoimmune che non necessita di sostituzione con terapia insulinica - NIRAD) e richiedono trattamenti terapeutici differenziati e personalizzati.

Sono note e riconosciute altre forme di diabete differenti dalle forme comuni, che interessano categorie di popolazioni speciali; tra queste ricordiamo il diabete gestazionale (GDM) che si manifesta in una fase precisa della vita della donna e coinvolge dall'1 al 14% di tutte le gravidanze [3]. Questa forma di solito regredisce al termine della gravidanza.

Altre tipologie di diabete sono dovute a cause specifiche, ad esempio difetti della funzione β -cellulare, difetti dell'attività insulinica su base genetica, malattie del pancreas esocrino (es. fibrosi cistica) e difetti dovuti a danni indotti da farmaci o da sostanze chimiche.

Lo sviluppo della malattia è quindi dovuto a diversi processi patogenetici tra cui i principali sono: distruzione delle β -cellule pancreatiche in seguito all'instaurarsi di fenomeni di stress metabolico, apoptosi accelerata dovuta a danno cellulare o ad autoimmunità, progressiva perdita di funzione e di massa delle β -cellule con conseguente riduzione nella produzione di insulina. A questa condizione spesso si associa un'insensibilità tissutale all'insulina che può essere geneticamente acquisita o determinata dall'interazione dell'organismo con l'ambiente. La vita sedentaria e l'iper-alimentazione vengono ad oggi riconosciuti come componenti determinanti per il peggioramento dell'insulino-resistenza dell'organismo e per il perpetuarsi del diabete. L'instaurarsi del diabete inoltre, determina nel tempo lo sviluppo delle complicanze vascolari croniche che aumentano il rischio cardiovascolare dei pazienti con diabete [4; 5].

Il T2DM è quindi una sindrome complessa con molti modelli eziopatogenetici proposti [Fig. 2]; questa condizione clinica è caratterizzata da interazioni tra il

patrimonio genetico dell'individuo e fattori di rischio ambientale (obesità, elevato apporto calorico e inattività fisica) [6].

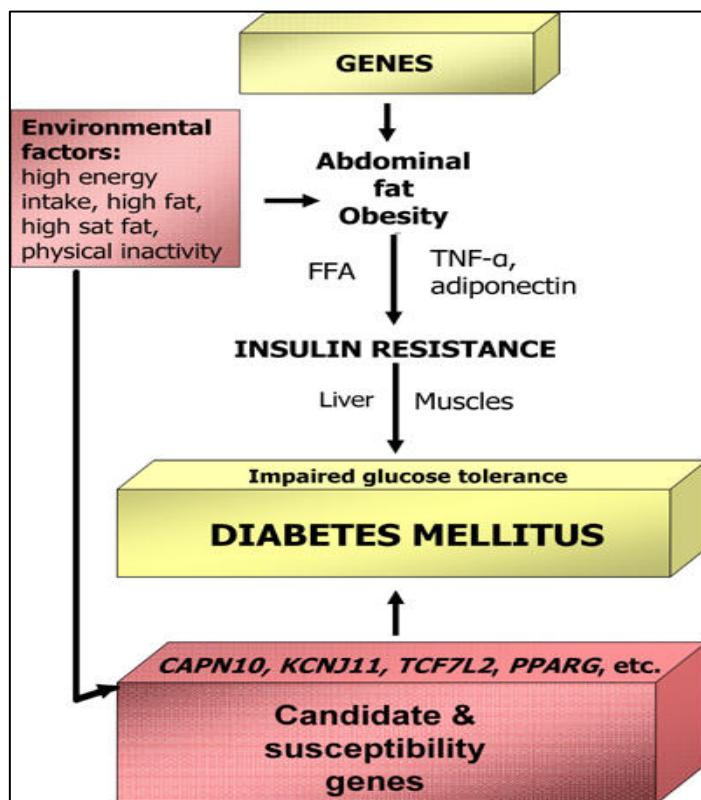


Figura 2 - Interazione tra geni e fattori ambientali, nell'insorgenza del T2DM [6]

Il controllo della glicemia nell'uomo quindi rappresenta un importante fattore di prevenzione nei confronti del diabete. Sono state descritte condizioni di pre-diabete che possono facilitare l'identificazione precoce dei soggetti a rischio, in grado di sviluppare la patologia; ad esempio in soggetti a rischio per lo sviluppo del diabete, un aumento della glicemia a digiuno (impaired fasting glucose, IFG) o una ridotta tolleranza al glucosio dopo carico orale di glucosio (impaired glucose tolerance, IGT), possono essere considerati fattori di rischio per lo sviluppo di diabete.

Si rende quindi necessario attuare programmi di screening precoce, al fine di identificare i soggetti a rischio, il più precocemente possibile per evitare l'insorgenza delle complicanze cardiovascolari croniche. Ciò rappresenta un obiettivo delle società scientifiche internazionali e delle organizzazioni mondiali che si occupano di salute, al fine di ridurre la mortalità e la morbilità generale legata al diabete.

Nuovi aspetti della fisiopatologia del diabete

Negli ultimi anni la fisiopatologia del diabete si è arricchita di nuove scoperte scientifiche e di nuovi aspetti fisiopatologici. In particolare la riscoperta dell'intestino come ghiandola endocrina e la conoscenza del ruolo degli ormoni gastrointestinali hanno riscritto le regole classiche dell'omeostasi glicometabolica dell'organismo. Il GLP-1 (Glucagon Like Peptide 1) in particolare ha fatto riscoprire nuovi obiettivi di terapia per il diabete. Le terapie disponibili in atto, basate sull'utilizzo di questo ormone gastro-intestinale, hanno permesso di rileggere anche i determinanti dell'iperglicemia nel diabete. Il soggetto con diabete mellito, infatti, oltre a mostrare un aumento non controllato della glicemia a digiuno e dopo carico di nutrienti, presenta alterazioni a carico di altri ormoni. Relativamente all'isola pancreatica, non solo l'insulina viene prodotta in maniera deregolata, ma anche gli altri ormoni prodotti dall'isola pancreatica risultano deregolati. Il principale ormone noto per essere deregolato in corso di diabete, oltre l'insulina, è il glucagone. Il glucagone è prodotto principalmente dalle cellule alfa pancreatiche. Questa popolazione cellulare per anni poco valutata e studiata, dopo l'avvento delle incretine nella pratica clinica diabetologica, è stata rivalutata. L'iperglucagonemia dei pazienti con diabete ad oggi rappresenta un obiettivo critico per curare il diabete. Lo studio della disfunzione della cellula alfa pancreatica è quindi a tutto diritto un obiettivo di studio per colmare le conoscenze mancanti della fisiopatologia del diabete.

Isola pancreatica

L'isola pancreatica è un organo centrale per la comprensione della patogenesi del diabete mellito. All'interno del pancreas esocrino dell'uomo sono presenti circa 2 milioni di isole, che rappresentano ognuna un organo endocrino indipendente, capace di riversare il prodotto della secrezione direttamente nel circolo generale. Le cellule che comprendono l'isola pancreatica sono le alfa,

le beta, le delta e le PP [7]. Ogni famiglia cellulare produce un ormone diverso. Per anni solo le beta cellule, e l'ormone da queste prodotto, l'insulina, sono state al centro dell'attenzione per la comprensione della fisiologia del diabete. Tuttavia, all'interno dell'isola, oltre alle beta cellule che costituiscono la quota più rappresentata (circa il 60-70% nell'uomo) [7], sono presenti anche le alfa cellule (circa il 25% della quota totale) che producono glucagone, le cellule delta (circa il 10% del totale) che producono somatostatina, e le cellule PP (meno dell'1%) che producono il polipeptide pancreatico. Benché l'esistenza di un ormone con caratteristiche opposte all'insulina fosse stata ipotizzata nel 1921 [8], epoca in cui Banting e Best eseguivano i loro primi esperimenti su cani resi diabetici, solo nel 1948 Sutherland e de Duve [9] rilevarono che all'interno delle isole pancreatiche erano presenti le alfa cellule in grado di produrre glucagone, un ormone capace di indurre iperglicemia. Era già noto che l'isola pancreatica, fosse deputato non solo alla produzione di insulina, ma che anche altri componenti in qualche modo fossero indispensabili per la normale omeostasi della glicemia [5]. Nel 1975, Unger e Orci [5], per primi, postularono l'ipotesi bi-ormonale, secondo la quale le alfa cellule e le beta cellule, tramite la loro interazione sinergica, influenzavano e regolavano i normali livelli di glucosio nel sangue. Questa affascinante ipotesi negli anni successivi è stata in parte trascurata; solo negli ultimi anni un certo interesse è stato rivolto verso le alfa cellule.

Nelle varie specie animali le quattro popolazioni cellulari all'interno dell'isola pancreatica presentano una distribuzione anatomica differente [10]. Se nelle isole dei roditori è possibile riconoscere un core centrale di beta cellule e un mantello periferico di cellule non beta, nell'uomo le cellule alfa, beta, delta e PP sono allineate lungo i vasi sanguigni senza preciso ordine [11]. Questa differente distribuzione potrebbe essere responsabile di un differente comportamento endocrino di questo organo; infatti, se nei roditori è possibile immaginare un effetto endocrino tra le cellule beta e le non beta, nell'uomo,

oltre all'effetto endocrino mediato dal flusso ematico, potrebbero esistere anche effetti paracrini o merocrini che renderebbero il sistema più complesso [12]. Negli ultimi anni, inoltre è stato evidenziato come le interazioni cellula-cellula all'interno dell'isola rivestono un ruolo importante per la secrezione totale dei polipeptidi provenienti dall'isola e studi praticati in isole intere, o in isole disperse in singole cellule, mostrano profili secretori differenti, in particolare per quanto riguarda la secrezione di glucagone [13]

Nella normale fisiologia, la secrezione di glucagone, rappresenta il più importante evento che accade in corso di ipoglicemia [14]. Livelli troppo bassi di glucosio infatti potrebbero rappresentare un pericolo per il sistema nervoso, poiché il cervello non è in grado di sintetizzare glucosio, né di depositarlo in grandi quantità, e per questo in condizioni fisiologiche l'azione delle alfa cellule si oppone a questa condizione. Quando i livelli di insulina determinano repentini abbassamenti della glicemia nel circolo sistemico, il glucagone e l'epinefrina vengono stimolati e la loro secrezione crea un nuovo equilibrio glicemico. Il glucagone determina a livello epatico glicogenolisi e gluconeogenesi; l'epinefrina aumenta il rilascio epatico di glucosio e rallenta l'utilizzazione dello stesso da parte del muscolo e del tessuto adiposo [15].

Meccanismo di secrezione

È noto che la secrezione insulinica rappresenta un fenomeno dinamico; la secrezione dell'ormone avviene in maniera pulsante e multifasica. La beta cellula produce costantemente insulina con variazioni minime e continue che si potenziano in risposta ad un pasto. Studi in vitro e in vivo, con l'utilizzo di carico endovenoso di glucosio, hanno mostrato la presenza di almeno due fasi della secrezione: la prima fase, o fase acuta che avviene nei primi 5-10 minuti dallo stimolo acuto, e la seconda fase o fase tardiva più prolungata nel tempo [16]. Alcuni studi hanno evidenziato anche una terza fase della secrezione insulinica, che compare dopo 3-4 ore di stimolazione con glucosio, e che consiste in una riduzione della capacità secretoria di oltre il 50% rispetto ai

valori massimali (desensibilizzazione o refrattarietà). Questa cinetica della secrezione, presente in soggetti normali, è alterata nel diabete mellito [16-18]. Negli ultimi anni è emerso che la fase precoce è di fondamentale importanza per la normale omeostasi glucidica, e le sue alterazioni sono tipicamente associate al diabete mellito tipo 2, o comunque a condizioni di alterata tolleranza glucidica. Tuttavia i meccanismi che regolano queste fasi della secrezione insulinica sono ancora poco definiti. Molte sono le ipotesi, anche se non esiste una spiegazione univoca che possa permettere di interpretare tali fenomeni. I meccanismi che regolano la secrezione insulinica sono molteplici e ognuno dei punti del processo sembra un possibile nodo chiave. Da quando la beta cellula entra in contatto con il glucosio, o con altri stimolanti, vengono attivati una serie di processi metabolici che contribuiscono all'esocitosi del granulo secretorio [19]. Se consideriamo il glucosio, lo stimolante fisiologico, dalla sua interazione con il suo trasportatore, il GLUT-2, si attivano alcune tappe enzimatiche regolate dalla glucochinasi o dall'esochinasi, che tramite il metabolismo non ossidativo, conducono al mitocondrio. Qui tramite il metabolismo ossidativo viene prodotto ATP; il rapporto ATP/ADP determina la chiusura dei canali del K^+ ATP-dipendenti, l'attivazione dei canali per il Ca^{2+} e, infine, l'esocitosi del granulo secretorio. Il pool di granuli secretori presenti in ogni singola beta-cellula non sembra essere un fattore limitante. Infatti, ogni beta-cellula possiede un numero di granuli che difficilmente può esaurire [20]. Tuttavia, non tutti i granuli presenti in una beta-cellula potrebbero essere rilasciati allo stesso momento. È necessario prima un processo di maturazione che sembra essere indispensabile per il processo di esocitosi.

Sono stati identificati almeno tre pool differenti di granuli all'interno di ogni beta-cellula: un pool stabile che rappresenta il comparto maggiore con oltre l'80% dei granuli [21-23]; un pool di granuli ancorati e un pool di granuli rapidamente rilasciabili, che rispetto a quelli ancorati hanno subito un ulteriore passaggio di capacitazione che lo rende in grado di fondersi con la

membrana plasmatica e rilasciare il contenuto ormonale all'esterno. Il processo di capacitazione dei granuli è complesso e le vie non sono del tutto note. Esistono tuttavia evidenze a supporto di alterazioni a tali livelli; sono infatti note mutazioni a carico di proteine e molecole di ancoraggio che renderebbero meno efficaci i processi di fusione del granulo alla membrana e quindi di rilascio dell'insulina.

Differenze e analogia tra alfa e beta-cellule

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

Esperimenti di patch-clamp in alfa-cellule isolate di varie specie animali hanno mostrato come, a differenza delle beta cellule, le alfa cellule mostrino un potenziale di membrana spontaneo [24]. Questa attività elettrica spontanea è stata anche dimostrata in alfa cellule presenti sulla superficie di isole di topo ancora intatte. Sulla superficie cellulare delle alfa cellule sono stati riscontrati differenti canali ionici in grado di influenzare l'attività elettrica di queste cellule. Esistono almeno quattro differenti tipi di canali per il potassio, almeno quattro tipologie di canali per il calcio voltaggio-dipendenti, canali per il sodio, per il cloro e per alcuni neurotrasmettitori quali il GABA [24].

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

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

differente sensibilità indica che sono necessarie concentrazioni di ATP molto basse per attivare la chiusura di questi canali, rispetto alle beta cellule.

Alfa cellule

La popolazione alfa cellulare all'interno dell'isola pancreatica rappresenta circa il 20% della quota cellulare totale. Le alfa cellule producono glucagone, un peptide di 29 aminoacidi, prodotto come pro-glucagone e processato successivamente in ormone attivo prima della secrezione finale. Fino al 1955 l'esistenza di questo secondo ormone prodotto dall'isola pancreatica era stata solamente ipotizzata in seguito agli effetti iperglicemizzanti ottenuti in studi effettuati tramite la somministrazione di estratti pancreatici, in particolare da Kimball e Murlin. Questi autori ipotizzarono la presenza di un ormone distinto dall'insulina, in seguito chiamato glucagone, che determinasse iperglicemia transitoria dopo la somministrazione di estratti di insulina. Nel 1957, Straub, purificò questo ormone e ne ottenne la sequenza per primo, descrisse inoltre la capacità di ripristinare l'effetto ipoglicemizzante ottenuto con l'insulina. Tuttavia a causa delle difficoltà di misurazione e dell'instabilità della molecola, le acquisizioni sono avvenute più avanti nel tempo, dopo l'avvento delle metodiche di dosaggio RIA.

Nel corso degli anni è stato riscontrato che gli stimoli che inducono ipoglicemia sono in grado di stimolare la secrezione di glucagone e, inoltre, quando i livelli di glicemia aumentano, la secrezione di glucagone si riduce.

Oggi sono noti gli stimoli in grado di indurre la secrezione di glucagone e le sostanze in grado di inibirne la produzione. Tra questi il glucosio riveste un ruolo importante: l'iperglicemia inibisce la secrezione, l'ipoglicemia la stimola. Tra gli stimolanti vanno citati gli aminoacidi, il piruvato, i polipeptidi gastrointestinali (GIP, VIP, CCK) e in particolare le catecolamine e tutto quello che riguarda la risposta a stimoli da stress; sembrano invece avere un ruolo inibente la secrezione gli acidi grassi liberi, i corpi chetonici, l'insulina, la somatostatina, il GLP-1 (glucagon-like peptide-1) [25]. Tuttavia tutti questi

fattori mostrano effetti diversi o addirittura opposti quando presenti in condizioni particolari. Per esempio è stato rilevato che il glucosio inibisce la secrezione di glucagone, quando però le alfa cellule dissociate dall'isola intera sono esposte a elevati livelli di glucosio, la loro capacità secretoria appare potenziata. Sembra quindi che, anche per le alfa cellule, così come per le beta, il ruolo endocrino dell'isola pancreatica e delle altre popolazioni cellulari presenti al livello dell'organo possa condizionare il risultato finale di tutta la popolazione cellulare che la compone. Le alfa cellule sembrano possedere molti dei sistemi e degli apparati tipici delle beta cellule. Se si analizza il processo embriogenico che porta alla produzione delle alfa e delle beta cellule, queste due distinte popolazioni condividono fasi differenziative comuni. Nelle fasi precoci di differenziazione, alcune cellule riescono a co-esprimere glucagone e insulina nello stesso momento. È probabile che per questo motivo l'apparato funzionale delle alfa cellule ricalchi in molti punti quello delle beta cellule. Le alfa cellule mature presentano canali di membrana simili alle beta cellule, e ancora più importante, sembra essere la presenza di un apparato di granuli molto simili alle beta cellule.

Sulla superficie delle alfa cellule sono presenti almeno quattro differenti tipologie di canali per il potassio, almeno quattro differenti tipologie di canali per il calcio e inoltre canali per GABA, per il sodio e per il cloro [24]. 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 di ATP intracellulare, rispetto a quanto noto per le beta cellule. Nelle alfa cellule sembra essere necessario molto meno ATP per attivare i canali del potassio ATP-sensibili. Inoltre anche la loro sensibilità si esaurirebbe con molta più velocità rispetto alle beta cellule. Questa differenza pare essere confermata dal differente potenziale di membrana che nelle beta-cellule è -40mV , mentre nelle alfa cellule il potenziale di attivazione registrato si colloca intorno a -60mV . Probabilmente l'azione coordinata dei molti canali presenti sulla superficie rendono più o

meno polarizzate le membrane. Per il resto le due popolazioni cellulari condividono in maniera sorprendente molti aspetti del processo secretorio. Anche per le alfa cellule l'ingresso del calcio, determina secrezione di glucagone, anche se il potenziale è spostato da -60 a -30 mV. Rivedendo l'organizzazione della beta cellula, emerge come anche le alfa possiedono un'unità glucosensoria composta da GLUT e glucochinasi; tuttavia il trasportatore qui presente è l'isoforma 1. Il GLUT-1 ha bassa capacità di trasporto rispetto al 2, e in assoluto è poco presente sulla membrana rispetto al corrispettivo sulla beta cellula, determinando un minore trasporto di glucosio all'interno della cellula. Questo suggerisce che il trasporto del glucosio per l'alfa cellula non deve essere un fattore limitante per la funzione. Il metabolismo del glucosio sembra essere tra il 60 e l'80% inferiore rispetto alla beta cellula, e di conseguenza la generazione di ATP risulta inferiore. Tuttavia come già detto, i canali per il potassio, al contrario, risultano molto più sensibili alle perturbazioni dei livelli di ATP [26]. Va precisato inoltre che probabilmente il piruvato, che origina dal metabolismo muscolare durante l'esercizio fisico, potrebbe contribuire all'aumento della quota metabolica che arriva al mitocondrio per essere scissa dalla catena respiratoria generando ATP. Ricordiamo, infatti, che il piruvato sembra stimolare la secrezione di glucagone, mentre non ha alcun effetto sulla secrezione insulinica. Come per le beta cellule, anche per le alfa il contenuto di calcio intracellulare sembra indispensabile per l'esocitosi dei granuli [24]. Nelle alfa cellule, dopo la depolarizzazione della membrana, il calcio entra rapidamente attraverso canali specifici. I canali per il calcio identificati per l'esocitosi sembrano essere almeno di due tipi; il tipo N, più importante per la secrezione basale o tonica dell'ormone e il tipo L importante per le secrezioni acute. Quando questi canali si chiudono, l'esocitosi si blocca. Inoltre pare che un ruolo importante per l'esocitosi, lo rivestono i livelli di AMPc; questo nucleotide non potenzia la secrezione, ma sembra che velocizzi la mobilizzazione dei granuli, dal comparto del pool stabile alla membrana. Tuttavia è stato visto come

durante la mobilitazione dal comparto centrale alla periferia da parte dell'AMPc, i granuli non si spostano casualmente verso la membrana, ma seguono un preciso percorso che li porta in prossimità dei canali del calcio di tipo L. Si potrebbe quindi ipotizzare che i granuli, sinora descritti come dispersi in pool stabile e in pool localizzati in prossimità della membrana, possano essere divisi in granuli posti vicino ai canali del calcio di tipo L (secrezione acuta) e granuli presenti in vicinanza dei canali per il calcio di tipo N (secrezione tonica) [24].

Da quanto qui esposto, è possibile immaginare anche un effetto sulle alfa cellule di alcuni farmaci in grado di stimolare la secrezione insulinica. È noto infatti che la tolbutamide e la glibenclamide, tramite l'interazione con i canali del potassio ATP-dipendente, sono in grado di stimolare la secrezione di glucagone almeno nelle alfa cellule isolate. Questo naturalmente può apparire paradossale, tuttavia esistono dati a conferma di questa ipotesi, seppur non tutti univoci. Di certo, anche per quest'aspetto, non si può non tenere in considerazione il ruolo dell'isola pancreatica e delle azioni endocrine o paracrine del complesso apparato cellulare; il risultato finale sicuramente risulta da tutte le interazioni cellulari dell'isola e dal prodotto dei vari ormoni che stimolano o inibiscono le cellule vicine [27].

Ruolo dell'insulina sull'alfa cellule

L'insulina è un ormone secreto dalle cellule β del pancreas endocrino in risposta all'elevata concentrazione di glucosio nel sangue e possiede un effetto inibitorio paracrino sulle cellule alfa [28]. Recenti indagini hanno fornito una certa comprensione del meccanismo con cui l'insulina inibisce la secrezione del glucagone grazie al legame con il suo recettore presente sull'alfa cellula. La trascrizione del recettore insulinico è abbondante nelle α cellule di ratto e risulta simile ad un altro importante tessuto target dell'insulina, come il fegato [29]. I recettori per l'insulina sono espressi anche nelle cellule α TC1 clone 6 (linea di glucagonoma di topo) e la secrezione di glucagone diminuisce con

l'aggiunta di insulina [30]. L'insulina inibisce temporaneamente l'attività elettrica e la secrezione di glucagone nelle α cellule isolate di ratto, molto probabilmente grazie all'attivazione del segnale intracellulare che a sua volta innesca l'attivazione dei canali K^+ sensibili all'ATP (canali K_{ATP}), culminando nella iperpolarizzazione della membrana [31]. È stato riportato che l'insulina attiva i recettori $GABA_A$ nelle α -cellule attraverso la via di AKT, ciò determina l'iperpolarizzazione della membrana nelle alfa cellule e la soppressione della secrezione di glucagone [32]. Il contributo relativo dell'attivazione dei canali K_{ATP} , la traslocazione del recettore $GABA_A$ e l'attivazione dell'inibizione indotta dall'insulina sul rilascio del glucagone non è attualmente chiara.

Controllo Paracrino delle α -cellule

Nonostante la patogenesi del T2DM si focalizza principalmente sull'insulino-resistenza e sulla disfunzione delle β -cellule, l'aumento improprio della secrezione da parte delle α -cellule e la conseguente iperglucagonemia è da tempo riconosciuta come un importante fattore nell'iperglicemia diabetica.

Le elevate concentrazioni plasmatiche di glucagone a digiuno, la mancata soppressione del glucagone glucosio-indotta ed il mancato coordinamento tra la secrezione di insulina e di glucagone nel periodo postprandiale, sono condizioni presenti nei pazienti con T2DM. Questi aspetti sono alla base di linee di ricerca recenti, nel tentativo di comprendere le basi molecolari ed ormonali che contribuiscono all'iperglicemia, alla luce dei nuovi ormoni intestinali noti.

La perdita di questo cross-talk tra β e α -cellule potrebbe essere una disfunzione primaria rispetto alla riduzione della secrezione di insulina, e questa alterazione potremmo considerarla alla base dell'iperglucagonemia tipica del paziente diabetico [33].

In condizioni normoglicemiche, durante l'iperglicemia post-prandiale, la secrezione delle δ e delle β -cellule pancreatiche è stimolata dalla presenza di glucosio, queste cellule producono fattori paracrini (somatostatina e insulina)

che inibiscono la secrezione di glucagone da parte delle α -cellule, come dimostrano anche studi in cui l'attivazione selettiva delle β -cellule causa l'inibizione della secrezione di glucagone [34].

Questa inibizione avviene mediante il legame dell'insulina con il suo recettore, presente sulla superficie della membrana della α -cellule [35; 36].

Il recettore insulinico, è un eterotetramero trans-membrana, costituito da due sub-unità α extracellulari, bersagli dell'insulina, legate con ponti disolfuro a due sub-unità β intracellulari con attività tirosin-chinasica.

L'insulina si lega alle sub-unità α e stimola l'autofosforilazione dei residui tirosinici della sub-unità β , che determinano la fosforilazione dei substrati intracellulari che appartengono alle vie del recettore insulinico. Alla via metabolica appartengono le proteine IRS-1, PI-3-K e AKT, mentre alla via proliferativa appartengono le proteine IRS-2 e MAPK. Questa via, comunemente nota come la via di MAPK, è nota per essere in grado di attivare nelle cellule alfa pancreatiche fattori di trascrizione nucleari. Tra i tanti, l'espressione di PAX6, un importante fattore trascrizionale implicato nella differenziazione delle α -cellule e nella trascrizione del gene del glucagone, e ciò sembra legare il segnale insulinico e la funzione delle cellule alfa.

Le alterazioni della trasduzione di questi segnali, determinata dalle condizioni di iperglicemia, iperlipemia e lo sviluppo conseguente di insulino-resistenza, potrebbero essere coinvolte nell'alterazione dell'attività funzionali e proliferative delle α -cellule e potrebbero essere alla base della iperglucagonemia nel diabete.

Ruolo del GABA nel T2DM

Come esposto in precedenza l'insulina non è l'unico regolatore della secrezione di glucagone all'interno dell'isola pancreatica: la secrezione di glucagone è regolata in maniera autocrina e paracrina da numerosi fattori, come il GABA prodotto e secreto dalle β -cellule [37, 38], il glutammato

prodotto dalle stesse α -cellule [11], la somatostatina [39, 40], le incretine [41, 42] e la ghrelina [43, 44].

In condizioni normoglicemiche, l'insulina è il fattore predominante nella soppressione della secrezione di glucagone; l'insulina agisce attraverso l'interferenza diretta sull'attività dei canali K_{ATP} , e sul potenziale di membrana delle α -cellule pancreatiche, che è regolato mediante l'attivazione indotta da insulina sul recettore per l'acido γ -aminobutirrico di tipo A ($GABA_{AR}$) che causa iperpolarizzazione della membrana, blocco della trascrizione del glucagone e soppressione dell'esocitosi delle vescicole contenenti l'ormone [45]. L'insulina, in cooperazione con il GABA, inibisce la secrezione di glucagone mediante la fosforilazione delle subunità β del $GABA_{AR}$, attivata dalla proteina chinasi B (o Akt), proteina chiave nel segnale insulinico, questa probabilmente mediante modifiche indotte sui filamenti di actina e tubulina del citoscheletro, permette la traslocazione dei recettori $GABA_{AR}$ dal pool intracellulare alla superficie cellulare. Il conseguente aumento dell'espressione di $GABA_{AR}$ s sulla superficie delle α -cellule permette l'ingresso di Cl^- con conseguente iperpolarizzazione della membrana associata alla chiusura dei canali del Ca^{2+} -voltage-dipendenti (VDCC) e soppressione della secrezione di glucagone [37].

Nelle β -cellule invece, il GABA induce effetti trofici dovuti al legame con il suo recettore metabotropico ($GABA_{BR}$) e depolarizzazione della membrana mediante il legame con il recettore ionico ($GABA_{AR}$) che è causa dell'aumento della secrezione di insulina, al contrario delle α -cellule dove invece induce iperpolarizzazione [37].

In studi condotti su isole di ratto isolate, si è visto che il trattamento con normali livelli di glucosio, risulta in grado di inibire la secrezione di glucagone. Bloccando in maniera selettiva il segnale insulinico e la via di AKT la capacità di risposta secretoria e la produzione di glucagone aumenta. Queste evidenze indicano come il segnale insulinico IR-Akt sia legato al segnale GABA e come il $GABA_{AR}$ sia fondamentale nella regolazione della

secrezione di glucagone [37]. Questi risultati forniscono quindi un nuovo meccanismo molecolare, mediante il quale la secrezione di glucagone glucosio-indotta possa essere mediata dalla via paracrina, insulina - Akt - GABA_AR.

Difetti di questa via molecolari intracellulari, dovute all'instaurarsi delle condizioni di insulino-resistenza, nelle α -cellule pancreatiche potrebbero spiegare l'iper glucagonemia e l'iperglicemia riscontrata nei pazienti con T2DM [37,46].

Sistema Gabaergico

Acido γ -aminobutirico

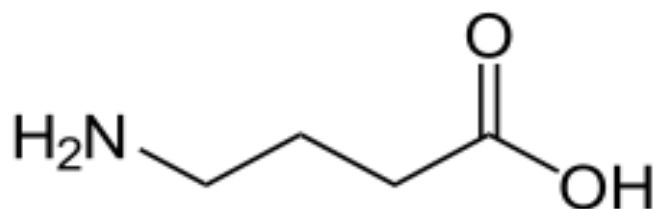


Figura 4 – Acido 4-aminobutanoico o Acido Gamma Aminobutirrico (GABA)

Il GABA o acido γ -aminobutirrico [Fig. 4] è il principale neurotrasmettitore inibitorio del sistema nervoso centrale (SNC) dei mammiferi. Circa il 20 - 50% di tutte le sinapsi utilizza questo neurotrasmettitore [47], al di fuori del sistema nervoso il GABA si comporta come un ormone o come fattore trofico [48]. È formato per decarbossilazione dell'acido glutammico, [Fig. 5] operata da due forme enzimatiche di glutamato decarbossilasi GAD65 e GAD67, a livello dei terminali sinaptici [49].

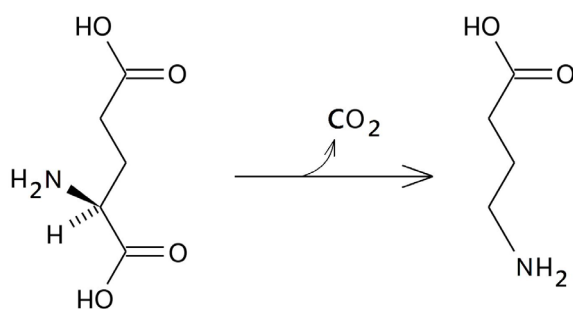


Figura 5 – Biosintesi del GABA a partire dall'Acido Glutammico

Il GABA viene poi degradato ad opera dell'enzima GABA α -chetoglutarato-transaminasi (GABA-T) che catalizzando sulla molecola una reazione di deaminazione ossidativa dà come prodotto la semialdeide succinica; questa viene successivamente ossidata ad opera della semialdeide succinato deidrogenasi NAD-dipendente ad acido succinico [Fig. 6], intermedio del ciclo di Krebs. Il gruppo aminico viene trasferito dalla GABA-T ad una molecola di α -chetoglutarato per formare nuovamente l'acido glutammico, che viene riutilizzato per la sintesi di nuovo GABA. Il GABA-T e la semialdeide succinato deidrogenasi si trovano sempre legati ai mitocondri non solo nell'assone terminale ma anche nelle strutture postsinaptiche.

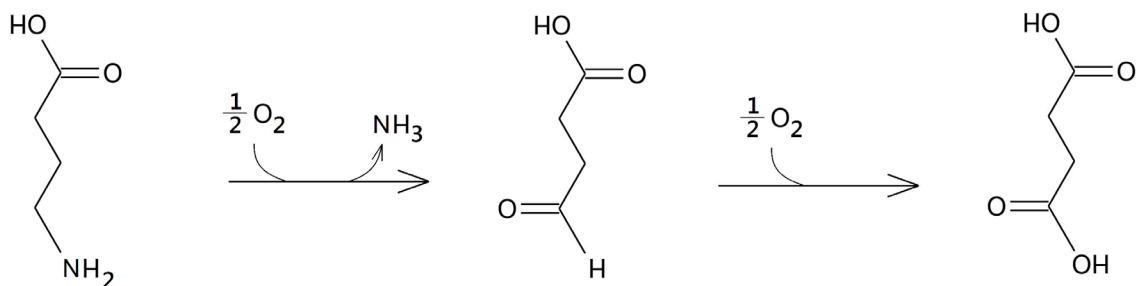


Figura 6 – Degradazione del GABA ad Acido Succinico.

Il neurotrasmettitore viene depositato all'interno di vescicole sinaptiche (mediante il trasportatore VGAT) e rilasciato attraverso un meccanismo di esocitosi Ca^{2+} dipendente [50, 51]. Sono state osservate delle forme di rilascio non vescicolare (attuate sempre da VGAT ma con trasporto opposto) e questo è particolarmente importante durante lo sviluppo fetale [52, 53]. Nelle sinapsi l'azione del GABA è terminata dalle proteine di reuptake (Trasportatori del GABA Na^+ / Cl^- dipendenti o GAT 1-4) presenti nelle membrane citoplasmatiche dei neuroni e delle cellule gliali circostanti [51].

Recettori Gabaergici

Vari studi elettrofisiologici e biochimici hanno dimostrato l'esistenza di due differenti recettori che rispondono all'acido γ -aminobutirrico: i recettori

ionotropici, che comprendono i recettori $GABA_A$ e $GABA_C$ (detto anche $GABA_\rho$ perché formato da subunità omo-oligomeriche di tipo ρ), e i recettori metabotropici accoppiati a proteine G, $GABA_B$, che differiscono fra loro per profilo farmacologico, struttura molecolare e meccanismo di trasduzione del segnale.

Recettore $GABA_A$

Il recettore $GABA_A$ è un canale ionico, permeabile principalmente allo ione cloruro (Cl^-) e leggermente permeabile allo ione HCO_3^- [54], è il principale sito d'interazione del neurotrasmettitore GABA e questa permeabilità è controllata attraverso l'interazione del GABA con il suo sito di riconoscimento [55, 56]. Appartiene alla classe dei recettori ionotropici o canali ionici che rispondono al ligando, e sulla base della propria struttura proteica, è parte della superfamiglia dei recettori Cys-loop; a questa famiglia appartengono anche, i recettori nicotinici neuronali e muscolari, i recettori glicinerici, i recettori serotoninergici 5-HT₃ e i recettori ZAC per lo Zn^{2+} [57]. Le altre famiglie di recettori ionotropici sono costituite da: recettori glutammatergici AMPA, NMDA e Kainato, recettori CNG per i nucleotidi ciclici cAMP e cGMP e dai recettori per le purine P2X.

Il recettore $GABA_A$ è una proteina multimerica (etero-pentamerico) formata da cinque sub-unità glicoproteiche presenti in un rapporto stechiometrico preciso: 2α , 2β e una sub-unità di diverso tipo, che è differente secondo il tessuto in cui è espresso il recettore [58]; queste sub-unità impari possono essere di diverso tipo (γ , δ , ϵ , θ , ρ e π) [54, 58]. Le diverse sub-unità espresse hanno elevata similitudine nella loro struttura primaria oltre che nella loro topologia trans membrana. Le sub-unità recettoriali sono formate da un esteso dominio amminotermine idrofilico extracellulare, quattro domini (M_1 - M_4) trans membrana con forma di α elicae, un esteso dominio citoplasmatico formato da un loop intracellulare di 13 residui amminoacidici localizzato tra M_3 e M_4 [Fig. 7] [59, 60], che contiene le sequenze consenso

per la fosforilazione operata da chinasi Ser/Thr- e Tyr-dipendenti [61]. Questa struttura si ritrova in tutti i membri della superfamiglia dei recettori Cys-loop [62, 63].

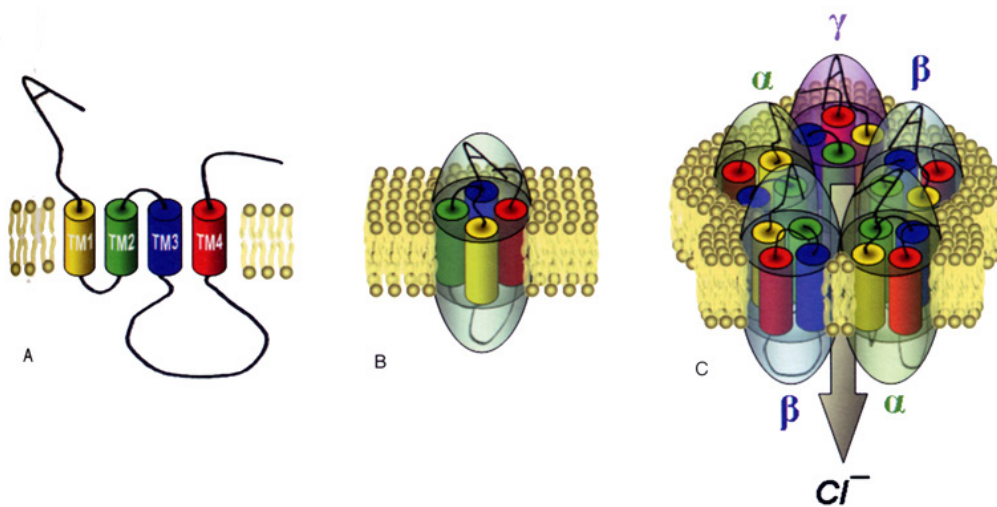


Figura 7 - Struttura del complesso glicoproteico che forma il canale per il Cl⁻ (<http://medicinapertutti.altervista.org/>)

Nel corso degli ultimi anni attraverso analisi dell'mRNA sono state identificate, diverse classi di sub-unità (α , β , γ , δ , ϵ , π , ρ e θ) nel SNC dei mammiferi [64]. Queste presentano tra loro il 30-40% di omologia nella loro sequenza amminoacidica e si ritiene siano derivate da un comune gene ancestrale [55, 56, 59]. Nel recettore GABA_A esistono 19 isoforme delle diverse sub-unità, che sono state raggruppate in otto sottoclassi, per omologia della sequenza amminoacidica: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , θ e ρ_{1-3} [57], codificate da geni distinti e localizzati su differenti cromosomi [65, 66], con un alto grado d'omologia (70-80%) fra le diverse isoforme [67]. Inoltre meccanismi di splicing e di editing dell'RNA promuovono l'espressione di altre sub-unità [68].

Studi d'immunoistochimica e di ibridazione molecolare in situ hanno mostrato come le diverse combinazioni recettoriali differiscono in modo marcato, per la loro sensibilità al GABA, per la co-operatività dell'azione del GABA (indicata dal coefficiente di Hill), per la differente conduttanza a livello dei singoli canali e per la loro sensibilità ai diversi modulatori allosterici [69].

Struttura del recettore GABA_A

Il complesso recettoriale macromolecolare GABA_A è un canale ionico formato dall'appaiamento delle seconde porzioni trans membrana M₂, le α-eliche di queste porzioni presentano estroflessioni amminoacidiche idrofobiche non cariche che formano le pareti del canale, alle quali si aggiungono a varie altezze, gruppi di tre anelli amminoacidici selettivi per gli ioni Cl⁻, il primo e il terzo sono carichi e il secondo è neutro. Completa il canale, un'estroflessione della sub-unità α1 che lo chiude quando questo ha conformazione inattiva [70]. Le altre quattro porzioni (M₁, M₃, M₄ e M₅) circondano la sub-unità M₂ e mediano le interazioni con la membrana e con le molecole presenti nei liquidi intra ed extra cellulari [71]. Le varie sub-unità sono unite mediante forze non covalenti e sono disposte attorno ad un asse centrale, perpendicolare alla superficie della membrana cellulare [72].

Il recettore GABA_A è modulato da una serie di composti che si vanno a legare nelle diverse cavità, localizzate sulla porzione del recettore che si trova sulla parte esterna della membrana cellulare [73]:

- 1) Sito di legame per il GABA, per i farmaci GABA mimetici (muscimolo) e GABA-antagonisti (bicucullina). Questo sito di legame è situato sulla sub-unità β del complesso macromolecolare. L'interazione con il GABA o con un GABA mimetico si traduce nell'apertura del canale ionico con conseguente iperpolarizzazione della membrana. La bicucullina blocca con meccanismo competitivo l'interazione GABA-recettore [74].
- 2) Sito di legame per le benzodiazepine ed altre molecole benzodiazepino-mimetiche (imidazopiridine, triazolopiridine, β-carboline). Questo sito è posto tra le sub-unità α e γ ed è riconosciuto anche da ligandi ad azione agonista inversa (β-carboline) cioè molecole capaci di ridurre l'interazione del GABA col proprio sito di riconoscimento [75]. Il sito di

legame delle benzodiazepine è riconosciuto anche da farmaci antagonisti competitivi (flumazenil), privi di attività intrinseca ma capaci di antagonizzare sia l'azione degli agonisti che quella degli agonisti inversi. Questo sito, ha la capacità di mediare effetti opposti (ansiolitico-ansigenico; anticonvulsivante-convulsivante; ipnotico-sonnolitivo) quando viene attivato rispettivamente dagli agonisti o dagli agonisti inversi. Questi effetti opposti sono dovuti alla modulazione allosterica dell'interazione del GABA col proprio sito di riconoscimento (facilitazione per gli agonisti, inibizione per gli agonisti inversi) e la conseguente attivazione o riduzione di attività del canale ionico [76].

- 3) Il recettore $GABA_A$ è un importante sito d'azione per i neurosteroidi; questi si comportano da modulatori allosterici a basse concentrazioni e da agonisti ad alte concentrazioni. I neurosteroidi sembrano possedere dei siti di legame specifici a livello del canale ionico [77].

I siti di legame per il GABA, per le benzodiazepine, per i barbiturici e per gli steroidi [Fig. 8], pur essendo entità distinte sono legati tra loro in modo funzionale: l'attivazione e l'inibizione di uno di questi siti da parte di uno specifico agonista o antagonista determina una variazione nella capacità degli altri siti ad interagire con i propri ligandi.

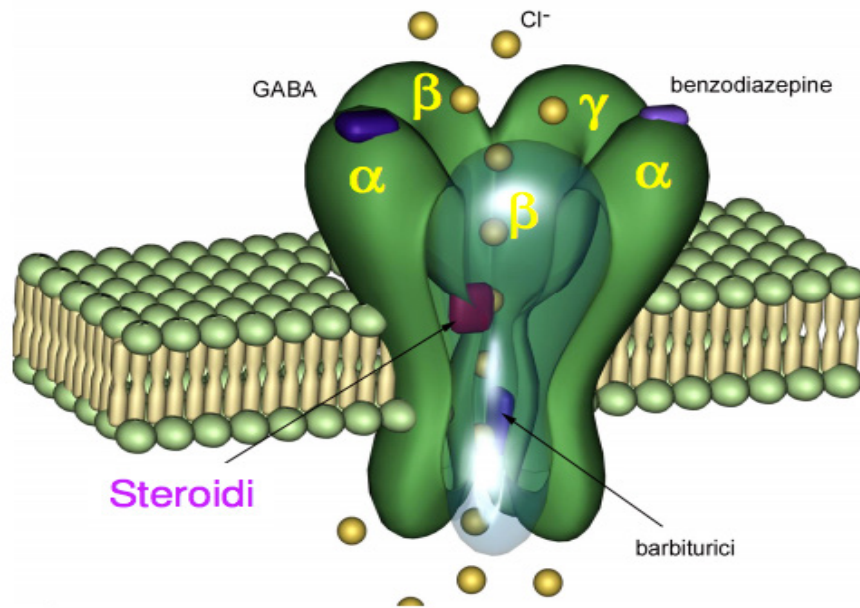


Figura 8 - Struttura 3D del recettore GABA_A e vari siti di interazione [78]

Il risultato è una modulazione positiva (facilitazione) o negativa (inibizione) dell'attività del recettore-canale.

Inoltre le molteplici sub-unità, le loro possibili combinazioni e la varietà della loro distribuzione nei mammiferi, suggeriscono che differenti sottopopolazioni di recettori possono controllare funzioni diverse e presentare differente sensibilità all'azione dei farmaci. Questo può portare in futuro allo sviluppo di farmaci capaci di intervenire in modo selettivo sulle differenti funzioni del sistema gabaergico [74, 81].

Recettore GABA_B

I recettori metabotropici GABA_B, sono recettori accoppiati a proteine G, sono attivati selettivamente dal baclofene e, al contrario dei recettori GABA_A, sono insensibili a bicucullina e muscimolo [81, 61]. Sono composti da due sub-unità fondamentali B₁ e B₂ [79] e hanno azione lenta e prolungata accoppiata ad attività sui canali del Ca²⁺ e del K⁺.

La funzione principale dei recettori GABA_B a livello presinaptico è quella di autoregolare il rilascio di GABA. Quando questi recettori sono attivati dal legame con il GABA reprimono il flusso intracellulare di Ca²⁺, inibendo così il rilascio del neurotrasmettitore e del glutammato a livello postsinaptico.

L'attivazione del recettore GABA_B a livello postsinaptico causa invece l'apertura dei canali del K⁺, che causa iperpolarizzazione della membrana, con conseguente riduzione dell'attività dell'adenilato ciclasi. Ciò previene l'apertura dei canali del Na⁺ e dei canali del Ca²⁺ voltaggio-dipendenti [79].

Recettori GABA_C o GABA_ρ

Il recettore GABA_C è un recettore ionotropo permeabile al Cl⁻, venne considerato inizialmente come una sottopopolazione dei recettori GABA_A, con struttura omomerică, in quanto costituita solo dalla sub-unità ρ [81]. Si è deciso di considerarli indipendenti poiché le sub-unità ρ non sono mai state trovate sui recettori GABA_A [80]. Sono stati localizzati nella retina [81], dove sono coinvolti nella fotorecezione e inoltre sono espressi sulla membrana delle cellule bipolari. Diversamente dai recettori GABA_A, questi sono insensibili alla bicucullina e al baclofen, ma sono molto sensibili al blocco da parte della picrotossina [80].

Le Incretine

Nell'uomo l'assunzione di glucosio per via orale, causa una maggiore secrezione insulinica rispetto alla somministrazione delle stesse quantità di glucosio per via endovenosa. Questo fenomeno, noto come "effetto incretinico" è responsabile di quasi il 70% della secrezione postprandiale d'insulina, ed è dovuto all'azione di ormoni gastrointestinali, prodotti dall'intestino e rilasciati in circolo dopo un pasto.

Nei pazienti con T2DM l'effetto incretinico è ridotto [82] e i meccanismi molecolari responsabili di quest'alterazione sono sconosciuti e non si è ancora stabilito se sono genetici o secondari a difetti acquisiti.

Sebbene l'identificazione degli ormoni gastrointestinali, in grado di influenzare i livelli di glucosio nel sangue, risalga al 1932, l'introduzione della loro definizione come INtestine seCREtion INSulin, risale al 1978.

Il primo ormone incretinico ad essere individuato è stato il GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide) un ormone di 42 aminoacidi rilasciato dalle cellule K, localizzate prevalentemente nel duodeno, solo nel 1987, invece, sono state identificate le L cellule intestinali ed è stato scoperto il loro prodotto, l'ormone GLP-1 [83, 84].

Il GLP-1 è un prodotto di clivaggio dal gene del proglucagone [Fig. 9], che non è espresso solo nelle α cellule pancreatiche, ma anche nelle cellule L della mucosa intestinale [85], così come in certi neuroni del tronco cerebrale [86].

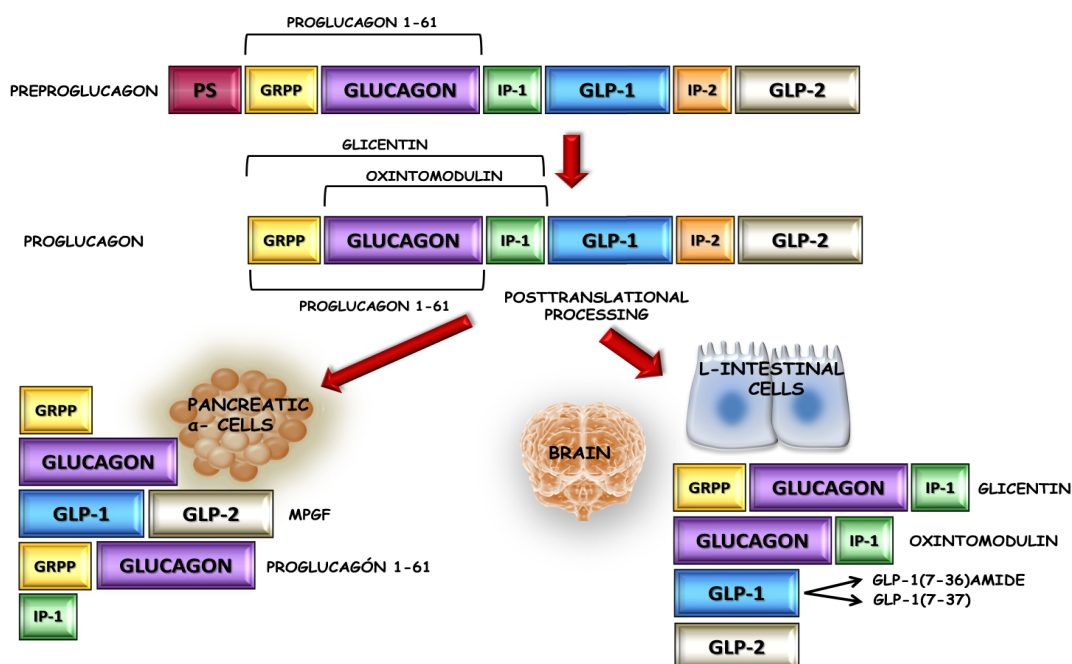


Figura 9 - Processamento del proglucagone nel pancreas, nel SNC e nel GUT [86].

Dati ottenuti in vitro e su modelli animali hanno dimostrato che il GLP-1 ha azione trofica e anti-apoptotica sulle β cellule, inoltre in soggetti non diabetici ai quali è stato somministrato GLP-1, si è osservato un aumento della secrezione di insulina.

Nel T2DM l'effetto incretinico è ridotto, e ciò è dovuto probabilmente alla diminuzione dell'azione stimolatoria del GLP-1 sulla secrezione di insulina e alla contemporanea perdita dell'azione inibitoria sulla secrezione di glucagone [87], anche se la perdita dell'effetto incretinico sembra essere secondaria alle alterazioni glicemiche o all'insulino-resistenza presenti in questi pazienti; e ciò indica la probabile reversibilità del fenomeno [88]. Queste evidenze pongono

quindi le basi per lo studio delle L cellule intestinali come componenti importanti nella patogenesi del T2DM e come possibile target terapeutici.

Effetti del GLP-1

Il GLP-1 attivo è sintetizzato nelle L cellule intestinali in 2 forme principali, il GLP-1 (7-36) ammide e il GLP-1 (7-37). Gli studi iniziali sull'attività biologica del GLP-1 utilizzavano la molecola intera (forme estese del GLP-1 7-37 e 7-36 amide) che però è priva di attività biologica.

Nel 1987, gruppi di ricerca indipendenti hanno dimostrato come la rimozione dei primi 6 aminoacidi determina la formazione di una molecola con attività biologica, associata alla secrezione di insulina.

La maggior parte di GLP-1 circolante biologicamente attivo, si trova sotto forma di GLP-1 (7-36) ammide, mentre sono poche le quantità rilevabili della forma attiva GLP-1 (7-37) [89]. L'emivita del GLP-1 attivo è molto breve (\cong 2 minuti); una volta secreto, l'ormone è rapidamente degradato dalle Dipeptidil-peptidasi-4 (DPP-IV) [90], serino-proteasi ubiquitarie [91, 92] 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) ammide[93]. 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, come linfociti, enterociti, fegato, polmoni, e producono metaboliti derivati dalle molecole originali, la cui funzione è in fase di valutazione.

L'attività biologica del GLP-1 si espleta in molti sistemi e apparati: nelle β cellule (Fig. 10), il GLP-1 lega il suo recettore (recettore a sette domini transmembrana, accoppiato a proteina Gs), causando l'aumento dei livelli di AMP ciclico (cAMP), e contribuendo così alla secrezione insulinica [94]; inoltre il GLP-1 regola l'inibizione della secrezione di glucagone (preservando però la risposta dell'ormone in caso di ipoglicemia), la velocità di svuotamento

gastrico, e la stimolazione del senso di sazietà, inoltre sembra avere attività sul SNC. [95, 96].

Il recettore del GLP-1 (GLP-1R) è espresso nel cervello, nell'apparato gastrointestinale, nei reni, nei polmoni; si discute invece se il GLP-1R sia presente sulle α cellule pancreatiche. Recentemente tuttavia, la possibilità di utilizzare anticorpi monoclonari contro il GLP-1R ha dimostrato come le cellule alfa, o alcune sottopopolazioni dell'isola pancreatica possiedono GLP-1R. Il GLP-1R è stato trovato in linee immortalizzate e nelle alfa cellule [86]. Inoltre, evidenze ottenute in soggetti con T1DM, privi di attività β cellulare residua, l'effetto inibitorio del GLP-1 sulla secrezione di glucagone è mantenuto. In questi soggetti quindi l'azione del GLP-1 appare diretta sulle alfa cellule pancreatiche [100].

L'attivazione del GLP-1R nelle beta cellule pancreatiche causa l'aumento dei livelli di cAMP e questo porta all'innescamento della cascata di PKA (protein chinasi A), del fattore Epac2 (o cAMP-GEFII) che è in grado di causare chiusura dei canali K_{ATP} , con conseguente depolarizzazione della membrana, apertura dei canali VDCC e degranulazione delle vescicole contenenti insulina. Attraverso queste vie molecolari sono state descritte attivazioni di vie che determinano proliferazione [98] e inibizione dell'apoptosi nelle β cellule [99] con potenziamento della trascrizione del gene dell'insulina [95]; nelle cellule alfa pancreatiche invece queste vie determinano inibizione della secrezione di glucagone [99].

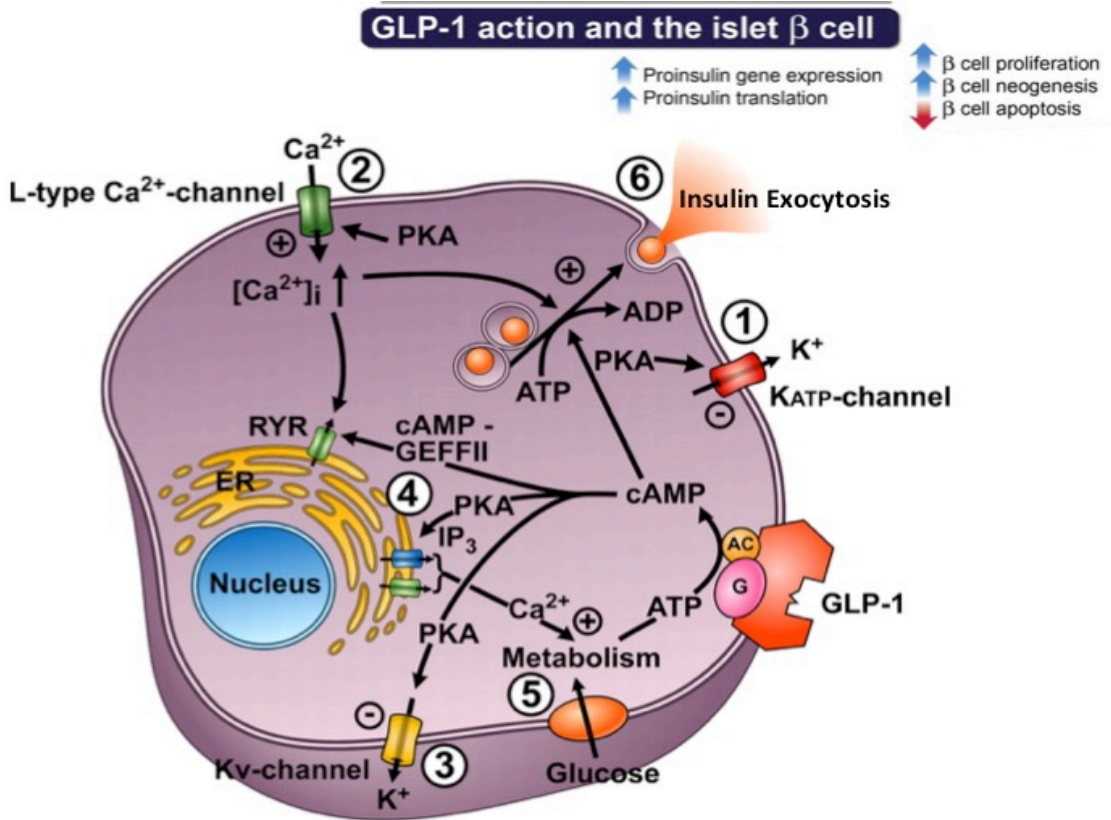


Figura 10 - Effetto del GLP-1 sulla β cellula pancreatica [101]

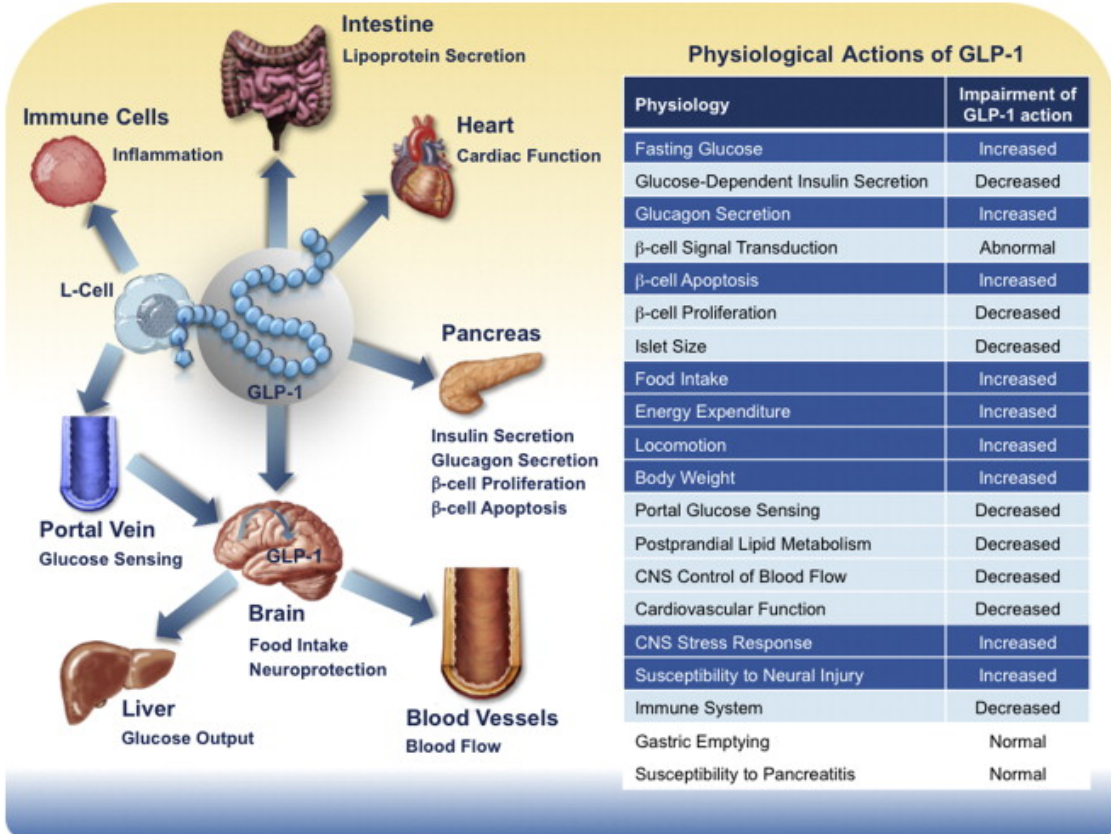


Figura 11 – Fisiologia e meccanismo d'azione degli ormoni incretinici [101]

Analizzando questi dati si evince chiaramente l'importanza dell'asse incretinico sulla patogenesi del diabete e delle sue complicanze; le incretine svolgono funzioni critiche per l'omeostasi glicemica del soggetto sano e la loro alterazione nel paziente diabetico contribuisce in maniera rilevante alla mancata omeostasi glicemica.

Analoghi Strutturali del GLP-1

Negli ultimi anni, la ricerca scientifica ha prodotto risultati notevoli riguardanti l'utilizzo degli ormoni incretinici nella terapia del T2DM. L'utilizzo di analoghi strutturali del GLP-1 (liraglutide, albiglutide, semaglutide, taspoglutide, dulaglutide), di farmaci incretino mimetici exendina-simili (exenatide, exenatide LAR, lixisenatide) e di inibitori delle DPP-IV (sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin, alogliptin, dutogliptin, linagliptin) nella terapia diabetica nella pratica clinica e per alcuni dei prodotti citati in fase pre-clinica, riveste molta importanza nel migliorare il compenso glicemico agendo da un punto di vista diverso rispetto alle terapie classiche in nostro possesso. [Fig. 12 e 13].

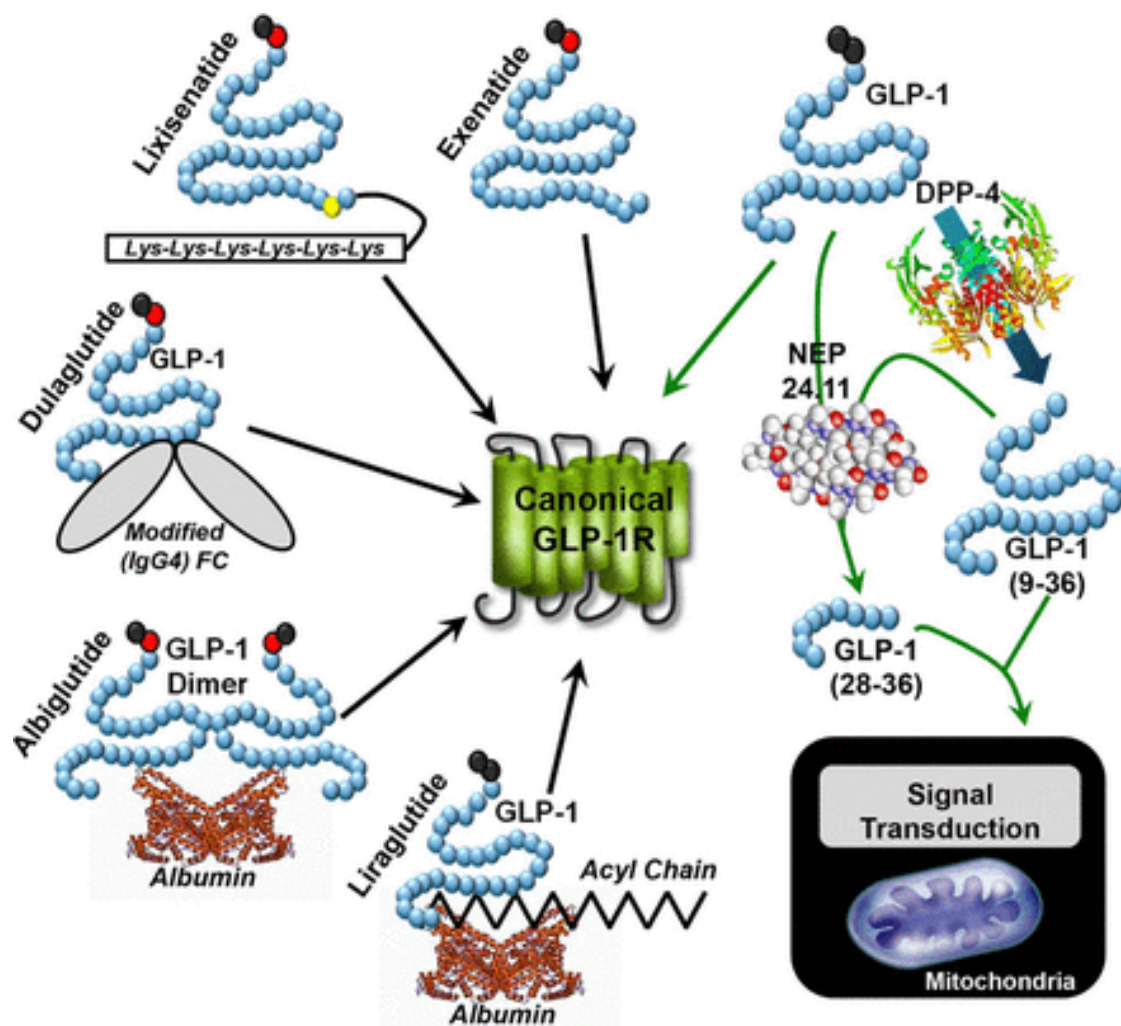


Figura 12 - Analoghi Strutturali del GLP-1 [102]

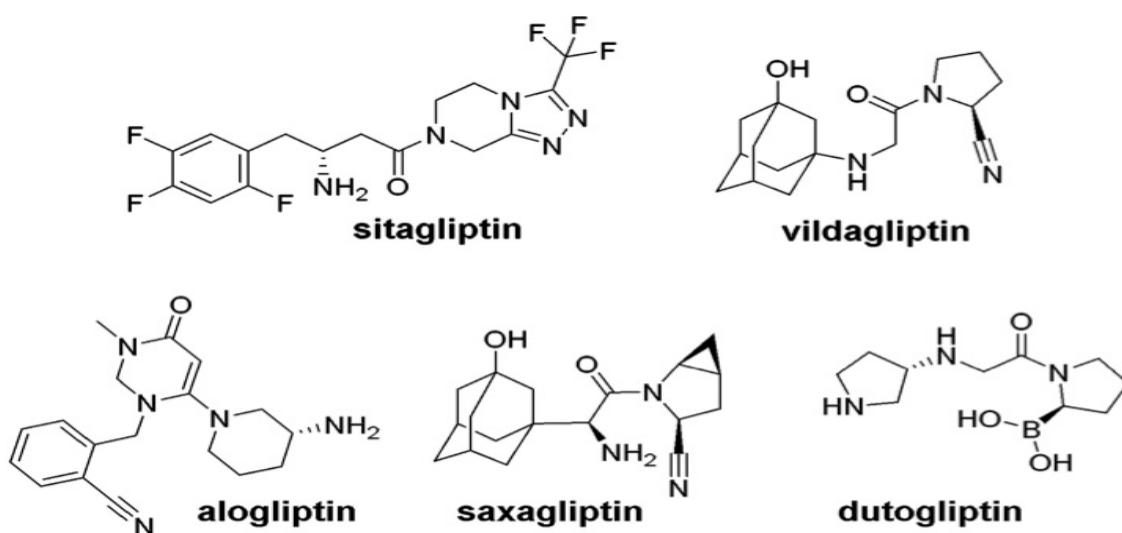


Figura 13 - Gliptine [103]

Scopo del Lavoro

Lo scopo del mio lavoro ha avuto come obiettivo lo studio delle alfa cellule pancreatiche dal punto di vista funzionale, in condizioni normali e in corso di lipotossicità. È noto, infatti, come i pazienti con diabete di tipo 2 presentano comunemente elevati livelli plasmatici di acidi grassi [104, 105] e questi sono responsabili in parte della ridotta sensibilità all'insulina dei tessuti. È stato dimostrato che gli acidi grassi liberi, ed in particolare il palmitato, sono in grado di determinare danno alle beta cellule pancreatiche e alterazioni della sensibilità insulinica a livello generalizzato. Gli effetti del palmitato sulle cellule alfa pancreatiche sono poco noti. Secondo la nostra ipotesi il palmitato potrebbe determinare insulino resistenza specifica a livello delle alfa cellule pancreatiche e questa alterazione molecolare potrebbe essere alla base della iper glucagonemia che si riscontra nei pazienti con diabete. Secondo quanto esposto sopra noi riteniamo inoltre che queste alterazioni del segnale insulinico indotto dal palmitato potrebbero determinare riduzione della attivazione di AKT e potrebbero determinare quindi alterazioni della via del recettore GABA_A. Secondo la nostra ipotesi quindi, la riduzione di espressione del GABA_AR, causato dall'insulino resistenza intracellulare, potrebbe essere prevenuto o revertito dall'utilizzo di GLP-1.

Per questo studio quindi abbiamo utilizzato un modello di alfa cellule pancreatiche esposte in maniera prolungata al palmitato. In questo modello in presenza o in assenza di GLP-1 o di suoi analoghi abbiamo studiato la via intracellulare del segnale insulinico, l'espressione del recettore GABA_A ed il comportamento secretorio dell'alfa cellula pancreatica.

Il modello cellulare utilizzato, cellule α TC-1 clone 6 è ampiamente usato in letteratura per studiare la secrezione di glucagone e rappresenta un modello validato per lo studio in vitro delle cellule pancreatiche [106-108].

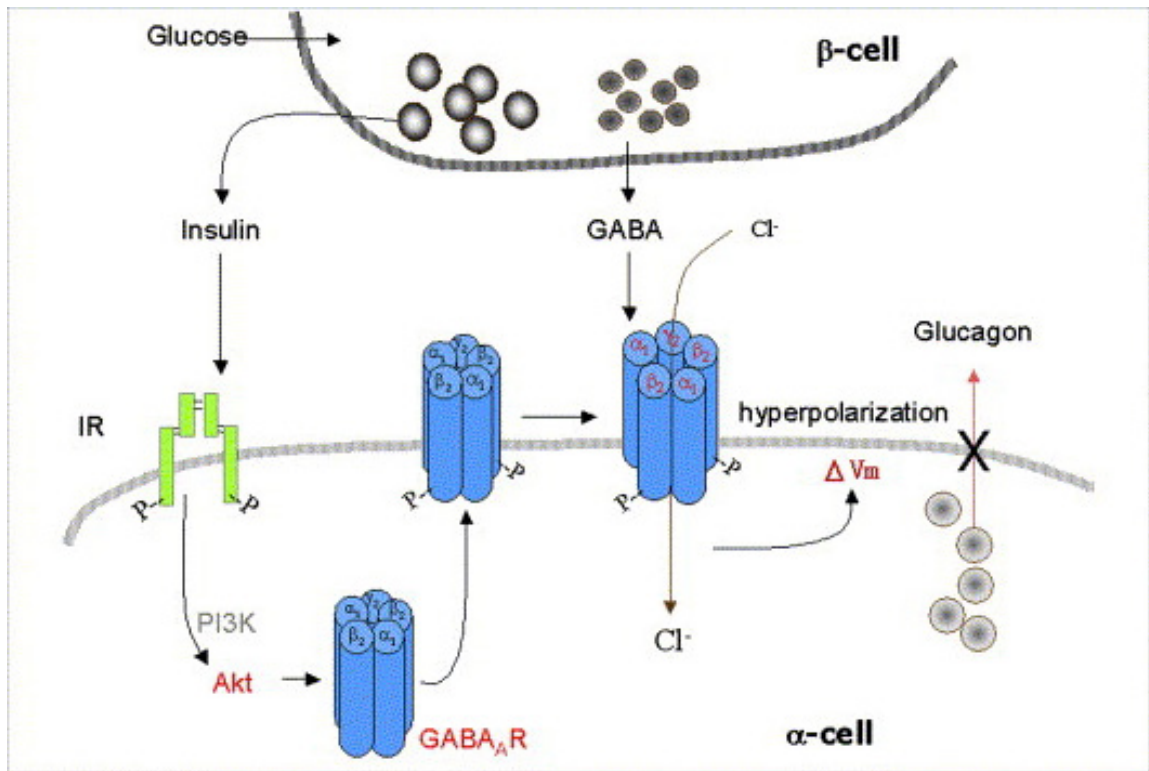


Figura 14 – Rappresentazione grafica dell'attività del GABA_AR [37]

Materiali e Metodi

Linea cellule α-TC1 e condizioni di coltura

Per gli esperimenti di questa tesi è stata utilizzata la linea cellulare Alpha TC1 (clone 6), acquistata dall'American Type Culture Collection (ATCC). Queste cellule sono alfa cellule pancreatiche clonate da una linea originale murina (AlphaTC1), derivate da un adenoma indotto su topi trans-genici infettati con virus SV40 sotto il controllo del promotore del gene del pro-glucagone di ratto. Anche se la linea cellulare α-TC1 produce glucagone, una certa quantità di insulina e l'mRNA della preproinsulina, le linee clonali (clone 6 e clone 9) sono altamente differenziate e producono solamente glucagone ma non insulina o mRNA della preproinsulina.

Il clone 6, da noi utilizzato per gli esperimenti, mostra un fenotipo più differenziato rispetto al clone 9 ed inoltre esprime livelli più alti di glucagone [108, 109].

Le cellule sono state utilizzate tra i passaggi 20-45 e sono state cresciute in terreno D-MEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium (modificato appositamente e contenente 16.7mmol/L di glucosio e 1.5g/L di bicarbonato di sodio) supplementato con 10% di FBS, 1% di L-glutamina e 1% di Penicillina/Streptomicina; sotto controllo atmosferico: 95% di umidità e 5% di CO₂ a 37°C.

Le cellule sono state tripsinizzate due volte la settimana.

Preparazione del palmitato

La soluzione di palmitato è stata preparata come descritto da Zhou H. [110, 111, 112]. Il palmitato è stato preparato miscelando e riscaldando concentrazioni uguali di NaOH e palmitato in acqua distillata per ottenere una concentrazione finale di 500 mmol/L. Questa soluzione è stata diluita con il 5% di BSA (priva di acidi grassi) per ottenere una concentrazione finale di 50 mmol/L. La soluzione stock è stata filtrata, aliquotata e conservata a -20°C. La soluzione di palmitato è stata preparata fresca prima di ogni esperimento.

Esposizione cronica al Palmitato e al GLP-1

24 ore dopo l'impianto, le cellule αTC1-6 sono state coltivate per 48 ore in terreno DMEM completo, in presenza o assenza di Palmitato (500 μmol/l) e di GLP-1 (100 nmol/L). Il Palmitato e il GLP-1 sono stati sostituiti ogni 24 ore. Per studiare l'effetto dell'insulina e del GABA le cellule, per le 2 ore precedenti la stimolazione acuta (5 min) con insulina 10⁻⁸ M, sono state coltivate in terreno privo di FBS, supplementato con BSA 0.1%.

In alcuni esperimenti, al fine di analizzare in dettaglio gli effetti del GABA, durante le ultime 2 ore le cellule sono state coltivate in presenza o assenza di GABA (10 $\mu\text{mol/l}$).

Secrezione di Glucagone

Dopo 48 ore di crescita in presenza o assenza di Palmitato (500 $\mu\text{mol/L}$) e di GLP-1 (100 nmol/L), le cellule sono state sottoposte a deprivazione di siero (FBS) per 2 ore e successivamente sono state lavate due volte ed incubate per 1 ora in Krebs-Ringer buffer (KRB) contenente 25,4 mmol/L di glucosio e 0.5% di BSA a pH 7.4 in presenza o in assenza di Palmitato (500 $\mu\text{mol/L}$), GLP-1 (100 nmol/L) e GABA (10 $\mu\text{mol/L}$) e per 1 ora in Krebs-Ringer buffer (KRB) contenente 16.7 mmol/L di glucosio e 0,5% di BSA a pH 7.4 in presenza o in assenza di Palmitato (500 $\mu\text{mol/L}$), GLP-1 (100 nmol/L), Insulina (10^{-8} M) e GABA (10 $\mu\text{mol/L}$). Alcuni esperimenti sono stati condotti in assenza di stimolazione per 2h al fine di valutare la risposta secretoria delle cellule in termini di glucagone.

Il surnatante è stato aliquotato in provette contenenti aprotinina (0.1 mg/mL) e conservato a -20°C fino al dosaggio del glucagone, effettuato tramite metodica RIA (radioimmunoassay) (Farilla et al., 2003) (Millipore, Millipore Corporation, Billerica, MA).

Preparazione dei lisati proteici cellulari

Dopo il periodo di trattamento le cellule sono state lavate due volte con PBS (pH 7.4), incubate con terreno (privo di FBS) per 2h e successivamente sono state trattate in base agli esperimenti da condurre. La stimolazione è stata bloccata con tre lavaggi in PBS freddo (pH 7.4), il liquido in eccesso è stato aspirato ed aggiunto Buffer di lisi freddo (150 mm NaCl , 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxycholate, 0,1 % Di sodio dodecil solfato (SDS), 50 mM Tris HCl

(pH 7,4), 10 mM sodio pirofosfato, 100 mM NaF, 2 mM PMSF, 2 mM di ortovanadato di sodio, 1 mg di pepstatina per mL, 1 mg di aprotinina per mL, 1 mg di leupeptina per mL). Dopo la lisi, i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 4 °C, al termine del quale il materiale insolubile è stato separato dal materiale solubile. La concentrazione di proteine è stata quantificata tramite BCA (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA).

Western blot

I Western blots sono stati effettuati come descritto precedentemente [121]. Brevemente, dopo normalizzazione con BCA, le proteine sono state eluite in gel di acrilamide, trasferite su membrane di nitrocellulosa ed una volta incubate con specifici anticorpi rilevate con metodo ECL. Per la normalizzazione dei lisati, le membrane di nitrocellulosa sono state trattate con Restore stripping buffer (Pierce) per 10 minuti a temperatura ambiente e successivamente incubate con anticorpo anti-actina.

Misurazione del glucagone tramite Metodica RIA

La determinazione dei livelli di glucagone prodotti dalle cellule è stata misurata mediante metodica RIA. I procedimenti condotti sono stati effettuati in accordo con le istruzioni del Kit di dosaggio (Millipore Corporation). Brevemente, il materiale da analizzare è stato incubato con anticorpo specifico per 20-24 ore a 4°C; al termine dell'incubazione in ogni tubo è stata inserita una concentrazione fissa di antigene tracciante marcato e nuovamente incubato per 22-24 ore a 4°C. Trascorso il periodo di incubazione è stato aggiunto l'agente precipitante ed i campioni sono stati centrifugati a 4°C per 20 minuti a 2000-3000 x g. Il risultante sedimento è stato lasciato decantare al fine di eliminare ogni possibile traccia di antigene marcato residuo. Per ogni esperimento condotto una curva standard è stata impostata con

concentrazioni crescenti di antigene standard non marcato, al fine poter effettuare le relative misurazioni.

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

Saggi di vitalità ed MTT

Il saggio colorimetrico a base di sali di tetrazolio (MTT test) è stato usato per determinare la citotossicità dei trattamenti effettuati.

Per tali valutazioni le cellule sono state impiantate in multiwell da 96 (circa 60×10^3 αTC1-6/well) e dopo 48 ore di crescita in presenza o assenza di Palmitato (500 μmol/L) e GLP-1 (100 nmol/L) sono state aggiunti 150 μL di MTT al 10% (15 μL di soluzione 5 mg/mL in 135 μL in phosphate-buffered saline (PBS) per 2-4 ore a 37°C.

Dopo l'incubazione, il surnatante è stato sciolto in 100 μL di dimetil solfossido (DMSO) per dissolvere i cristalli di formazano generato dalla reazione dell'MTT con le cellule. L'assorbanza dei campioni è stata misurata a 570nm e il background è stato misurato a 640nm utilizzando un apposito lettore di piastre (microplate reader BioRad Model 680). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato o quadruplicato e la vitalità cellulare è stata calcolata sottraendo l'assorbanza del background all'assorbanza del campione correlando così l'attività ottica alla densità cellulare.

Cells activity = (Absorbance sample - Absorbance background)

Immunofluorescenza

Per lo studio di Imaging le cellule, dopo 48 ore di crescita in presenza o assenza di Palmitato (500 μmol/L) e di GLP-1 (100 nmol/L), sono state deprivate dal siero (FBS) per 2 ore, successivamente sono state trattate con

insulina (10^{-8} M * 5 min) e quindi lavate con phosphate-buffered saline (PBS) e fissate usando formaldeide al 4%. Dopo il fissaggio le cellule sono state incubate con anticorpo monoclonale (antiGABA_AR_{β2/3} UBI 1:20) in grado di legare l'epitopo specifico del recettore GABA_A e successivamente con un anticorpo secondario coniugato (Alexa Fluor 594 Donkey Anti-Mouse IgG H&L by Abcam) al fine di rivelare il segnale in fluorescenza. Per la colorazione dei nuclei è stato usato Hoechst33258 (Sigma-94403). Tutte le immagini sono state acquisite in sequenza e i singoli canali RGB sono stati separati digitalmente. Per le analisi microscopiche è stato utilizzato un microscopio confocale (Olympus FV1000 Confocal Laser Scanning Biological Microscope).

La quantificazione della colorazione superficiale è stata effettuata usando il software Fiji by ImageJ analysis software (<http://.fiji.sc/Fiji>) utilizzando la conta dell'intensità totale dei pixel. Le soglie di colore delle immagini è stata settata in modo da risultare uguale per tutte le condizioni sperimentali e il background è stato sottratto dal numero totale di pixels delle varie immagini.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con il software Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, U.S.A.). Il test X_2 , o il test ANOVA con susseguente analisi di Bonferroni è stata performata per valutare la significatività tra i gruppi. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Secrezione di glucagone

Per lo studio della secrezione di glucagone le cellule sono state cresciute in DMEM a 16,2 mmol/L di glucosio in presenza o in assenza di palmitato 0,5 mmol/L per 48 ore. Dopo tale periodo di esposizione le cellule sono state lavate due volte in Krebs e quindi condizionate e preparate per la secrezione, effettuando una pre-incubazione con elevati livelli di Glucosio 25 mmol/L [37]. Dopo tale periodo la secrezione di glucagone è stata effettuata, esponendo le cellule a glucosio 16,2 mmol/L in presenza o in assenza di insulina (10^{-8} M) e GABA (10 μ mol/L).

Alla fine di tale periodo è stato prelevato il surnatante per le determinazioni dei livelli di glucagone secreti. Dopo l'esposizione prolungata per 48h al palmitato e dopo la stimolazione acuta le cellule pre-esposte cronicamente al palmitato mostravano un maggiore rilascio di glucagone rispetto ai gruppi di controllo. [Fig.16].

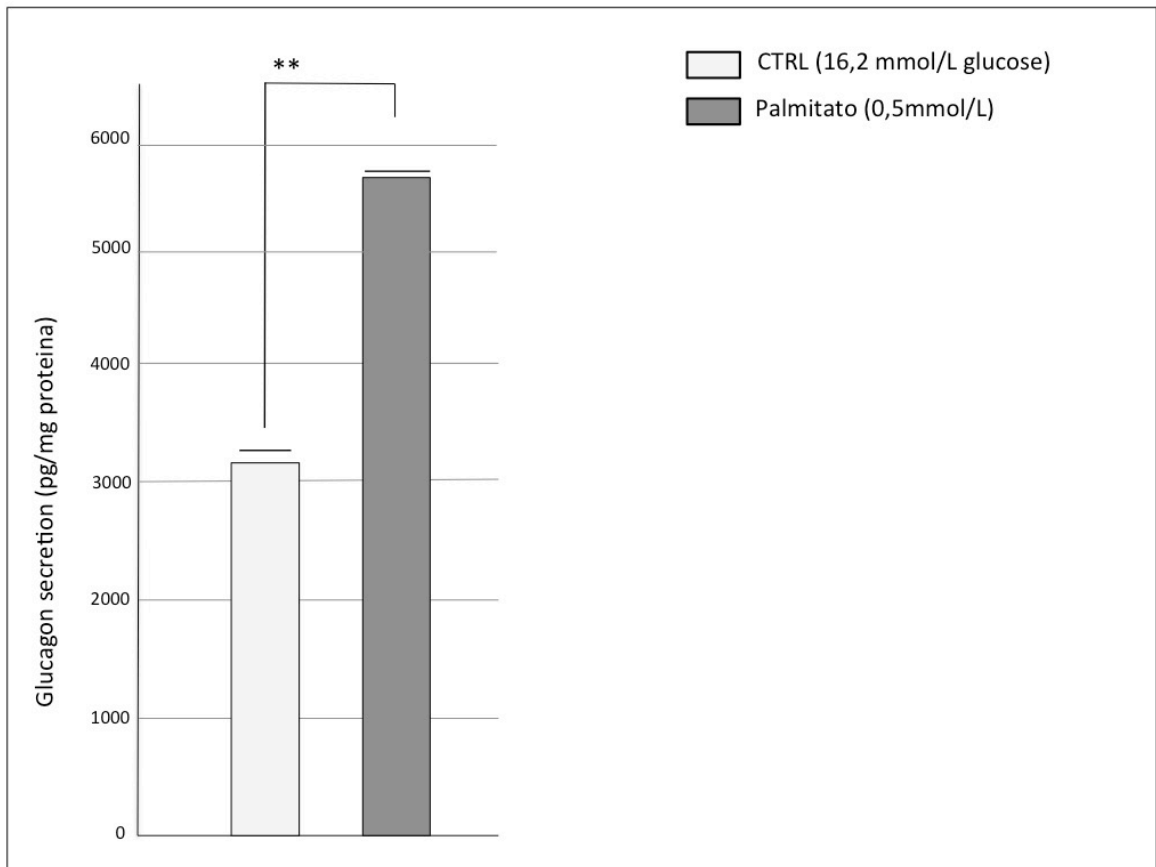


Figura 16. Secrezione del Glucagone in cellule α -TC1 di controllo e in cellule coltivate palmitato (0,5 mmol/L) per 48 ore. Le cellule sono state coltivate in DMEM con o senza palmitato (0,5 mmol/L) per 48 ore, lavate e rimesse in coltura per un'ora in KRB (glucosio 25 mmol/l) e un'ora in KRB (glucosio 16,2 mmol/l). I dati sono espressi in pg/mg di proteina; media \pm errore standard (SE), n=5; ** p< 0.001 vs. gruppo di controllo

Quando le stesse cellule venivano acutamente stimulate con insulina o GABA, nelle cellule di controllo si verificava una fisiologica inibizione della secrezione di glucagone. Lo stesso non era visibile nelle cellule pre-esposte al palmitato.

[Fig.17]

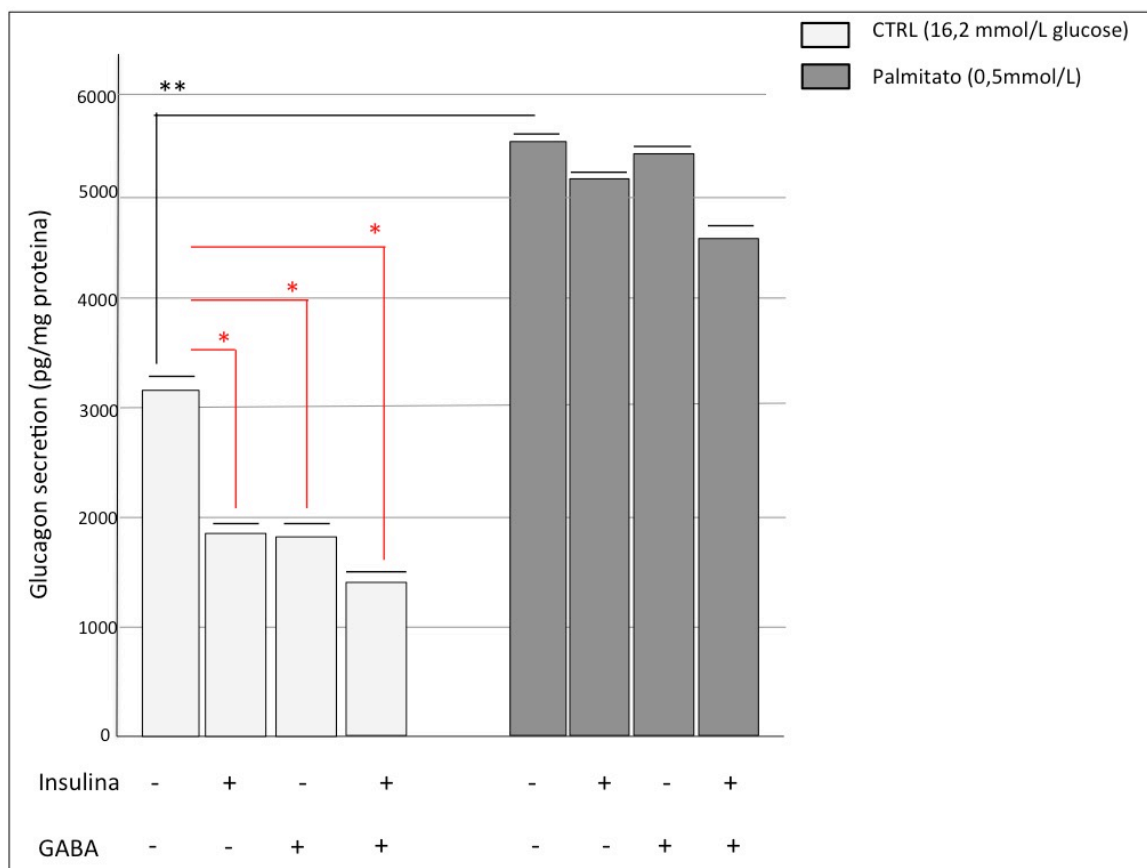


Figura 17. Secrezione del Glucagone in cellule α -TC1 di controllo e in cellule coltivate palmitato (0,5 mmol/L) per 48 ore. Le cellule sono state coltivate in DMEM con con o senza palmitato (0,5 mmol/L) per 48 ore, lavate e rimesse in coltura per un'ora in KRB (glucosio 25 mmol/l) e un'ora in KRB (glucosio 16,2 mmol/l) in presenza o assenza di insulina (10^{-8} M) per 10 minuti e/o GABA (10 μ mol/L) per 1 ora. I dati sono espressi in pg/mg di proteina; media \pm errore standard (SE), n=5; * p< 0.05 vs. gruppo di controllo; ** p< 0.001 vs. gruppo di controllo.

Via del segnale insulinico

Poiché i dati ottenuti con gli esperimenti di secrezione hanno dimostrato come l'effetto dell'insulina fosse compromesso, al fine di studiare ulteriormente il ruolo dell'insulina e del suo segnale intracellulare, abbiamo valutato le tappe intracellulari coinvolte nel segnale insulinico nel nostro sistema cellulare.

Nel nostro modello, dopo esposizione cronica al palmitato, la stimolazione cronica con insulina (10^{-8} M per 5 minuti) non era in grado di attivare la stessa fosforilazione di IRS-1 che era ottenuta nelle cellule di controllo[Fig. 18]; nei gruppi di controllo come atteso, la stimolazione acuta con insulina era in grado di attivare la fosforilazione di IRS-1.

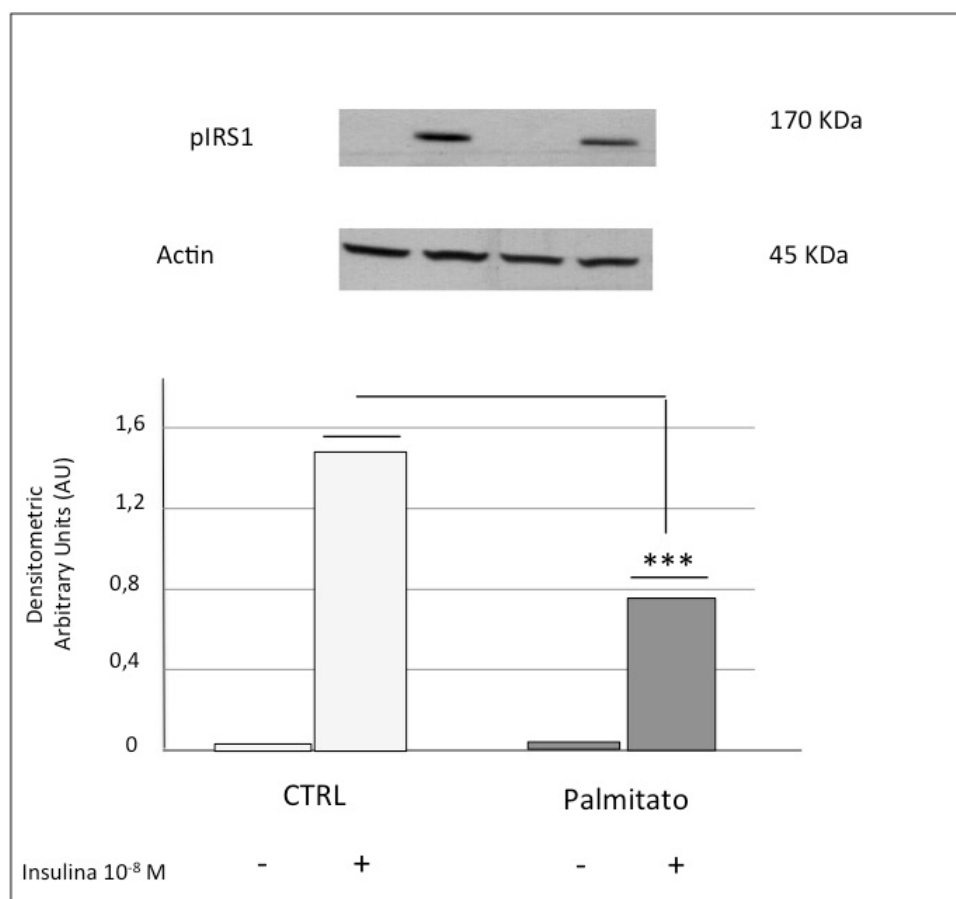


Figura 18. Analisi di Western blot per IRS-1 P (Tyr 612) e actina. Il pannello superiore mostra un esperimento rappresentativo per pIrs-1 (Tyr 612), in cellule coltivate in presenza o assenza di palmitato (0,5mmol/L) e/o insulina (10^{-8} M) per 5 minuti.. Il pannello inferiore mostra media \pm SE dell'analisi densitometrica di 5 diversi esperimenti; *** $p < 0,001$ vs gruppi di controllo.

Poichè un altro importante punto di interesse del segnale intracellulare dell'insulina è rappresentato da AKT e poiché AKT potrebbe rappresentare il punto di collegamento tra il segnale insulinico intracellulare, la iperpolarizzazione della membrana plasmatica nella cellula alfa pancreatica, l'ipersecrezione di glucagone e il recettore GABA, nel nostro sistema abbiamo voluto valutare la fosforilazione di AKT.

Nel nostro modello, dopo esposizione prolungata al palmitato, la stimolazione acuta con insulina determinava attivazione di pAKT nei gruppi di controllo; nei gruppi pre-esposti a palmitato tale attivazione, seppur presente appariva ridotta rispetto al controllo.

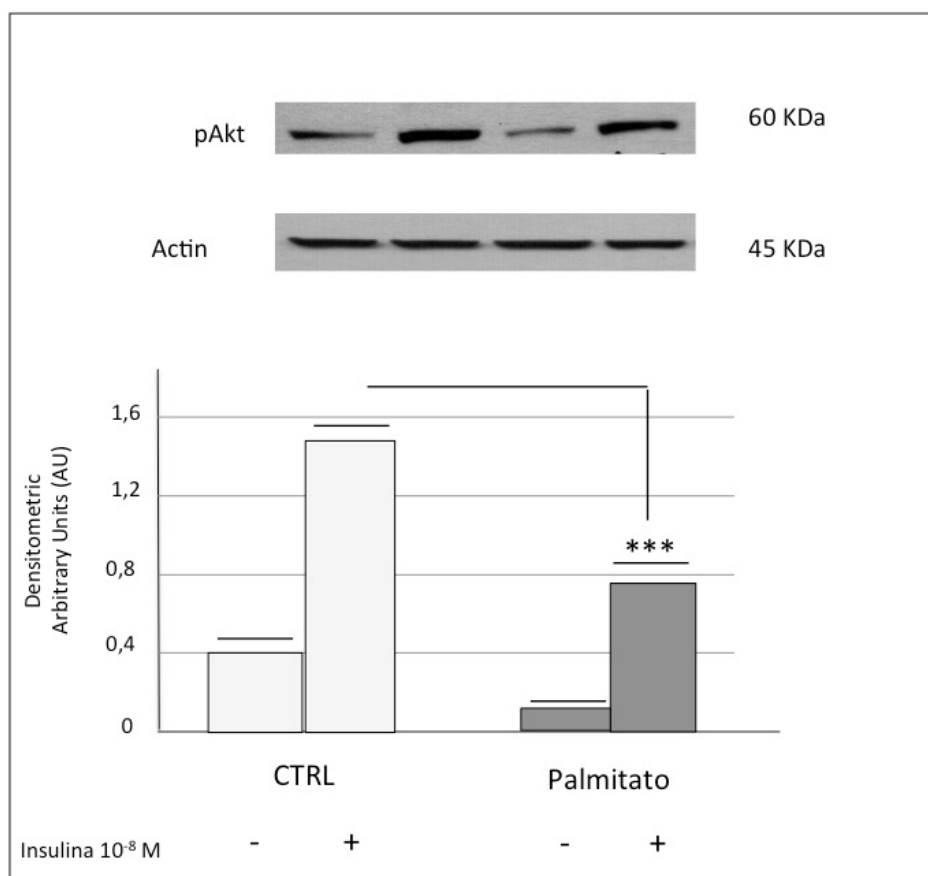


Figura 19. Analisi Western blot per la fosforilazione di pAKT (Ser 473). Il pannello superiore mostra un esperimento rappresentativo per pAKT (Ser 473), in cellule coltivate in presenza o assenza di palmitato (0,5mmol/L) e/o insulina (10^{-8} M) per 5 minuti. Il pannello inferiore mostra media \pm SE dell'analisi densitometrica di 5 diversi esperimenti; *** $p < 0,001$ vs gruppi di controllo.

Essendo pAKT uno snodo determinante della via del segnale GABAergico, nel nostro modello abbiamo valutato l'espressione del recettore GABA_A. Come atteso nei gruppi pre-esposti a palmitato l'espressione del recettore GABA_A appariva ridotta rispetto ai gruppi di controllo. [Fig. 20].

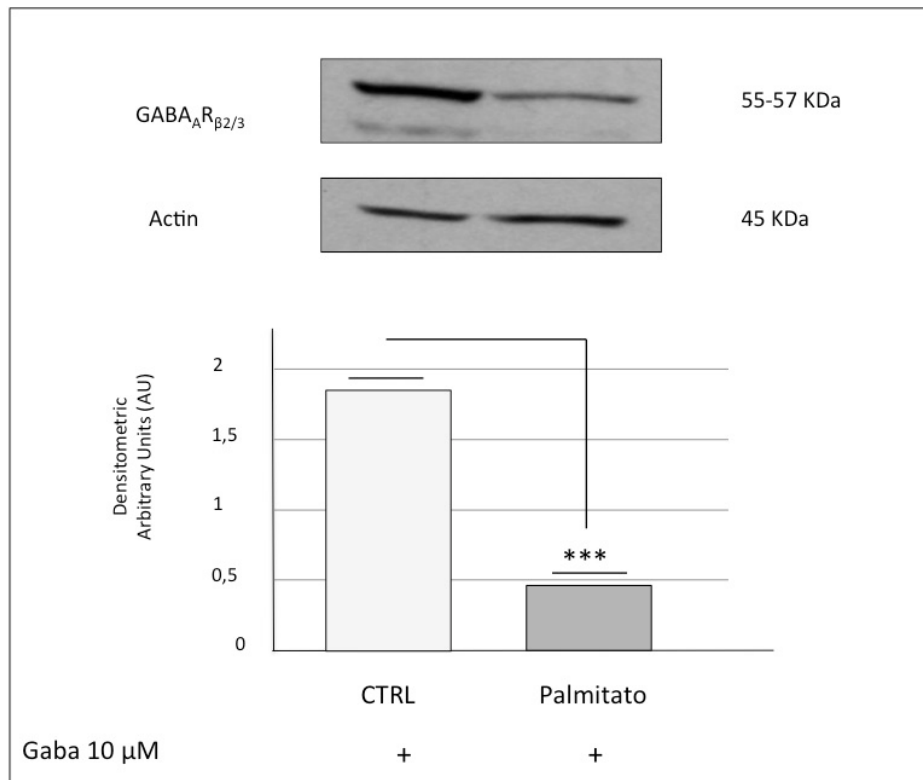


Figura 20. Analisi Western blot per la fosforilazione di pGABA_{A-β3} (Ser 408/409) e Actina. Il pannello superiore mostra un esperimento rappresentativo per pGABA_{A-β3} (Ser 408/409), in presenza o assenza di palmitato (0,5mmol/L) e/o GABA (10 μmol/L) per 5 minuti. Il pannello inferiore mostra media ± SE dell'analisi densitometrica di 5 diversi esperimenti; *** p < 0,001 vs gruppi di controllo.

Al fine di verificare questo dato, sono stati effettuati esperimenti di immunofluorescenza, per studiare la localizzazione del recettore nel contesto cellulare. Tramite l'utilizzo di microscopia confocale, è stato possibile verificare l'espressione e la localizzazione del recettore GABA_A nel nostro sistema. Nelle cellule pre-esposte cronicamente al palmitato l'espressione di base del recettore GABA_A appariva ridotta rispetto alle cellule di controllo. Inoltre la stimolazione acuta determinava maggiore presenza di tale recettore nelle cellule di controllo mentre l'espressione non si modificava nelle cellule pre-esposte a palmitato. Questo dato appare concorde con quanto noto riguardo la funzione del recettore GABA_A nelle cellule alfa pancreatiche. [Fig. 21 e 22].

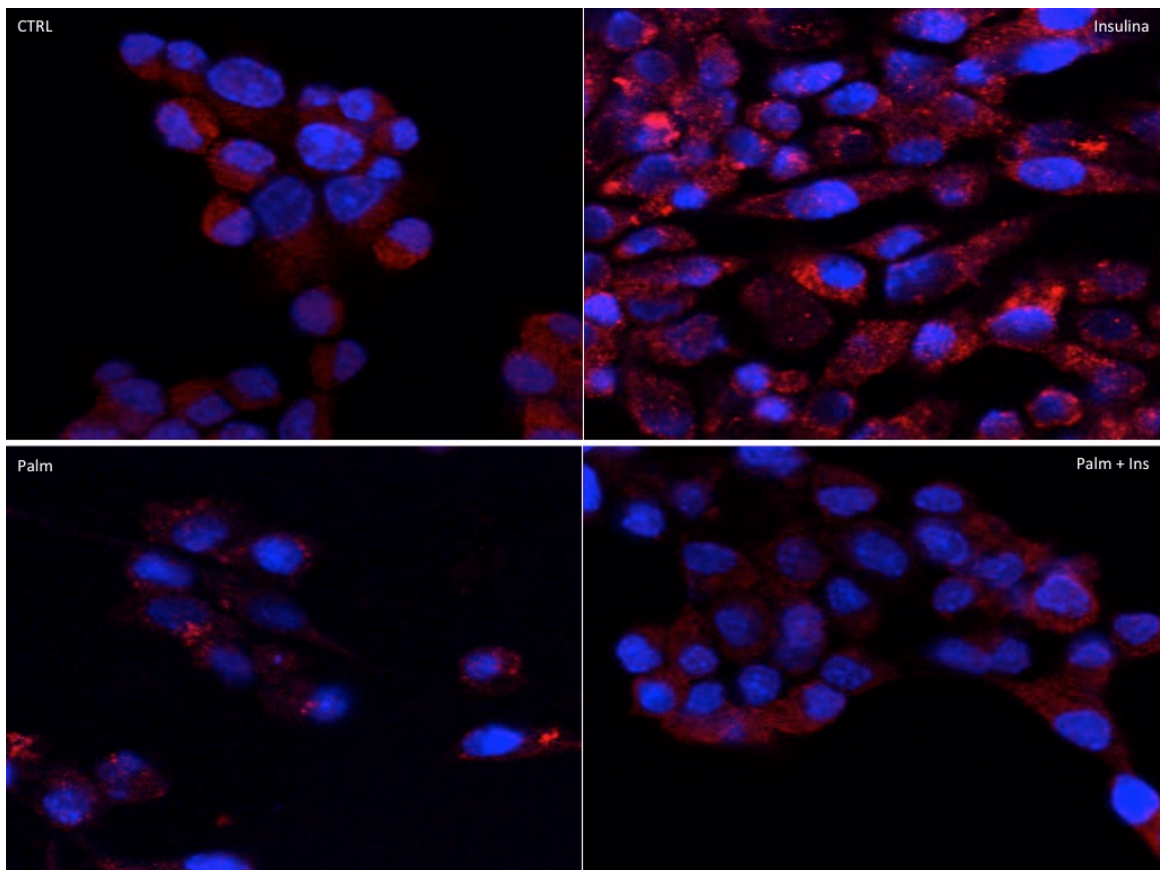


Figura 21. Immagini ad alta risoluzione della traslocazione del recettore $GABA_A$ (rosso) immunoreattivo, in cellule α -TC1-6. In blu i nuclei, visualizzati con Hoechst 33258.

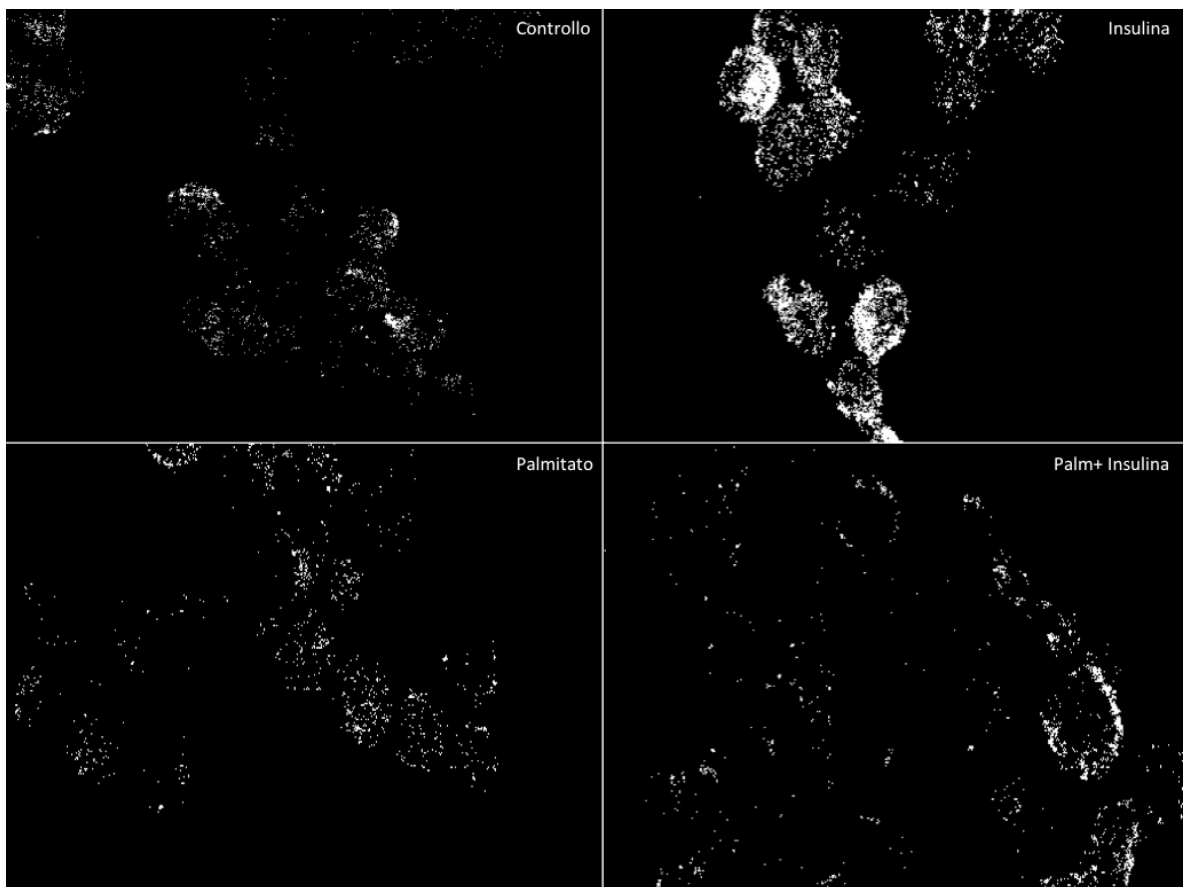


Figura 22: L'immagine in falsi colori ci permette di notare la notevole differenza di espressione del recettore $GABA_A$ nelle cellule di controllo, rispetto a quelle pre-esposte a palmitato

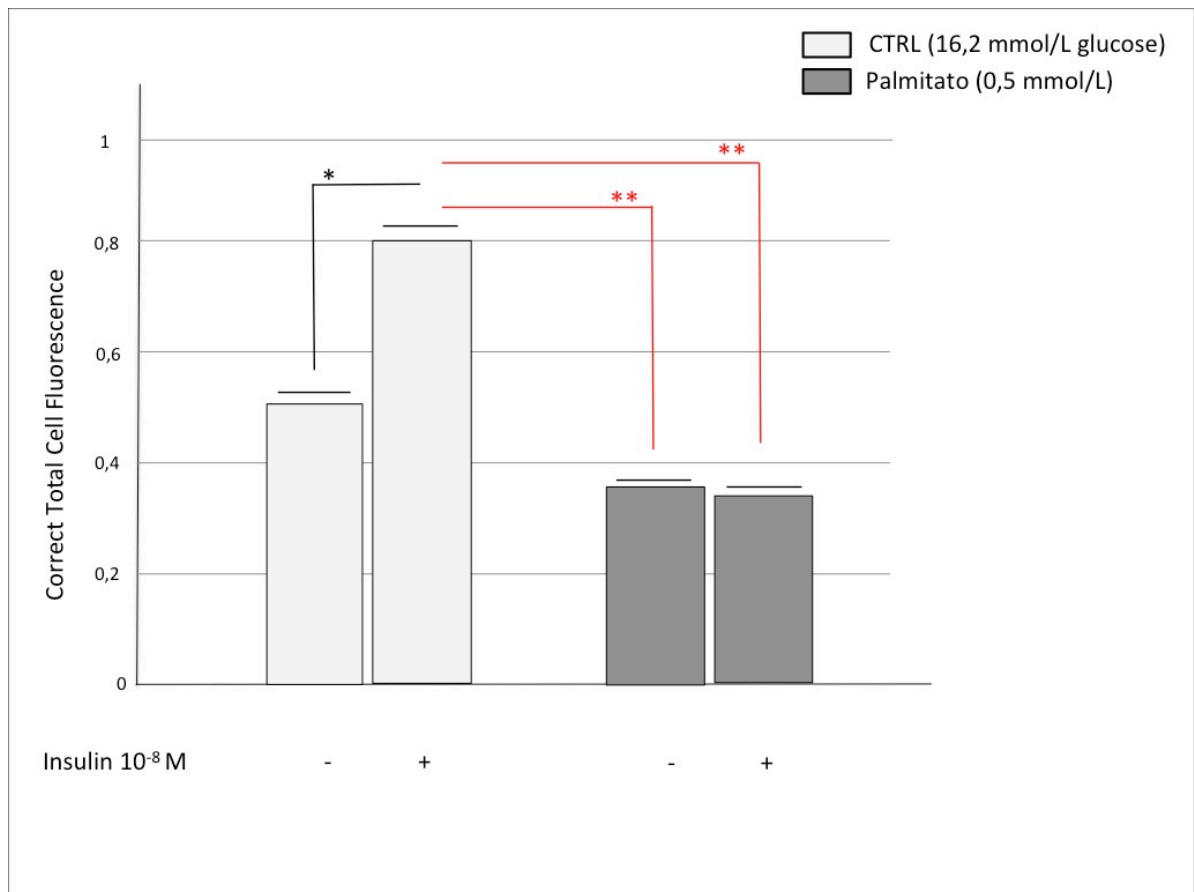


Figura 23: Analisi delle Fluorescenza del recettore GABA_A in cellule α -TC1 di controllo e in cellule coltivate palmitato (0,5 mmol/L) per 48 ore. Le cellule sono state coltivate in DMEM con o senza palmitato (0,5 mmol/L) per 48 ore, lavate e rimesse in coltura per un'ora in KRB (glucosio 25 mmol/l) e un'ora in KRB (glucosio 16,2 mmol/l) in presenza o assenza di insulina (10^{-8} M) per 5 minuti. I dati sono espressi in correct total cell fluorescence; media±errore standard (SE), n=5; * p< 0.05 vs. gruppo di controllo; ** p< 0.001 vs. gruppo di controllo

Conclusioni della Prima Parte

I dati ottenuti in questa parte del lavoro indicano che l'esposizione cronica al palmitato induce insulino-resistenza in un modello di cellule alfa pancreatiche in coltura continua. Tale dato è supportato dalla ridotta fosforilazione di IRS-1, dalla ridotta fosforilazione di AKT e dalla incapacità di queste cellule a risentire dell'azione inibitoria dell'insulina quando presente acutamente. Questo dato appare utile ed importante per la comprensione della fisiopatologia del diabete. Il soggetto con diabete di tipo 2 infatti, oltre a presentare iperglicemia a digiuno e dopo i pasti, presenta spesso elevati livelli di glucagonemia. Il glucagone, essendo un ormone iperglicemizzante, rappresenta un componente essenziale nell'instaurarsi dell'iperglicemia.

Quindi lo studio della disfunzione delle cellule alfa potrebbe rappresentare un obiettivo di ricerca nel campo del diabete. Aver identificato che il palmitato, acido grasso libero che risulta aumentato nel diabete, possa determinare insulino-resistenza a livello della cellula alfa pancreatica potrebbe rappresentare un utile campo di ricerca per il diabete.

Inoltre la correlazione tra alterazione della via intracellulare dell'insulina, l'insensibilità di queste cellule all'ormone e il riscontro di alterata espressione del recettore GABA_A in questo modello, potrebbe rappresentare una possibile spiegazione del fenomeno.

L'esposizione cronica ad acidi grassi potrebbe inoltre contribuire all'alterazione della secrezione di glucagone.

Nella seconda parte dello studio verranno analizzate le possibili strategie di prevenzione di tali alterazioni.

Risultati: Seconda Parte

In cellule pre-esposte per 48 ore a palmitato la secrezione di glucagone appariva aumentata e la stimolazione acuta con insulina (10^{-8} M) e di GABA ($10 \mu\text{mol/L}$) non era in grado di riportare tale risposta ai valori dei gruppi di controllo. Al fine di prevenire tali alterazioni alcuni gruppi esposti cronicamente al palmitato venivano coltivati e in presenza di GLP-1 (100 nmol/L). Il GLP-1 era in grado di riportare la risposta secretoria ai livelli dei gruppi di controllo; inoltre la stimolazione acuta con insulina e GABA determinava una risposta inibitoria paragonabile a quella dei gruppi di controllo [Fig.24].

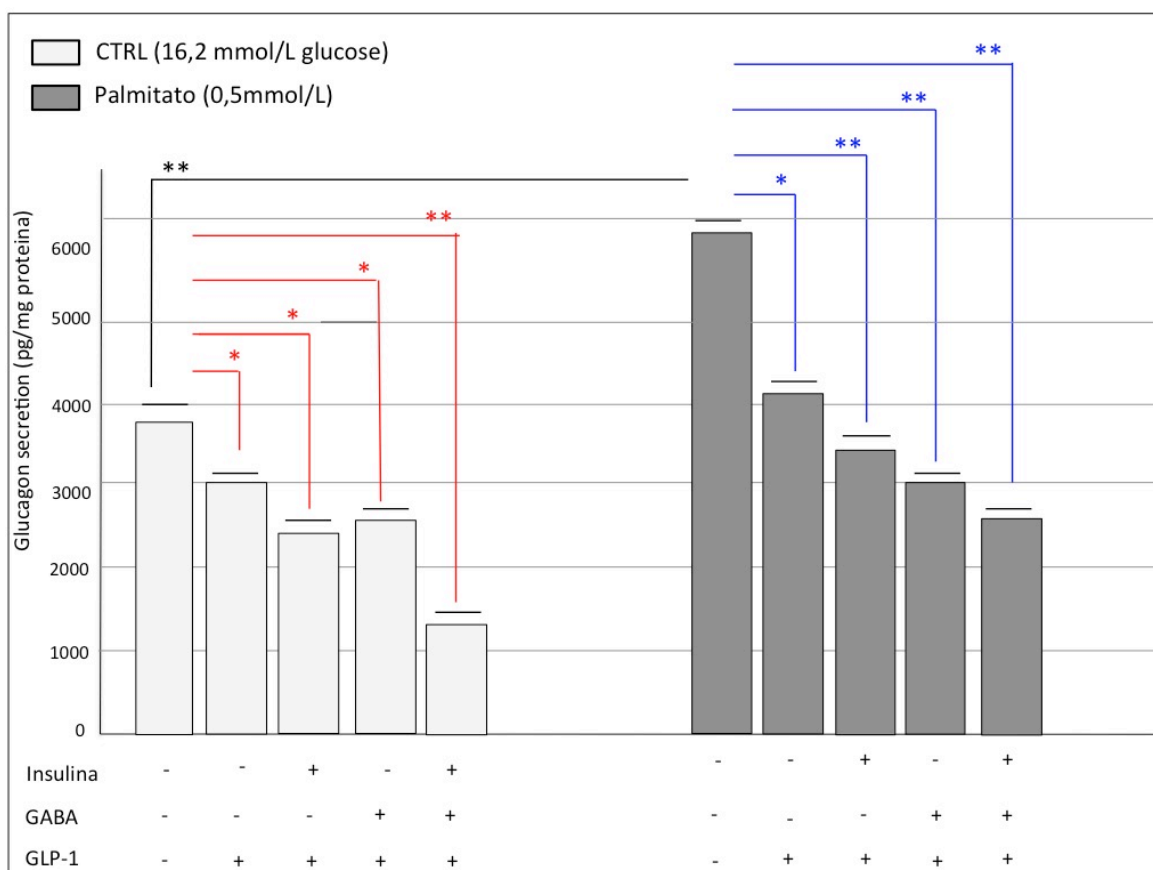


Figura 24. Secrezione del Glucagone in cellule α -TC1 di controllo e in cellule coltivate con GLP-1 (100 nmol/l) per 48 ore in presenza ed in assenza di palmitato ($0,5 \text{ mmol/L}$) per 48 ore. Le cellule sono state coltivate in DMEM con o senza GLP-1 (100 nmol/l) per 48 ore e con o senza palmitato ($0,5 \text{ mmol/L}$) per 48 ore, lavate e rimesse in coltura per un'ora in KRB (glucosio 25 mmol/l) e un'ora in KRB (glucosio $16,2 \text{ mmol/l}$) in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l) e/o insulina (10^{-8} M) per 5 minuti e/o GABA ($10 \mu\text{mol/L}$) per 1 ora. I dati sono espressi in pg/mg di proteina; $\text{media} \pm \text{errore standard (SE)}$, $n=5$; * $p < 0.05$ vs. gruppo di controllo; ** $p < 0.001$ vs. gruppo di controllo.

Segnale Insulinico Intracellulare

Al fine di comprendere l'effetto del GLP-1 sul segnale insulinico intracellulare, nelle cellule di controllo e quelle pre-esposte cronicamente al palmitato in presenza o in assenza di GLP-1 è stato valutato il segnale insulinico intracellulare.

Nelle cellule pre-esposte cronicamente al palmitato e al GLP-1 la fosforilazione di IRS-1 (pIRS-1^{Tyr612}) dopo stimolazione acuta con insulina (10^{-8} M) appariva conservata ed i valori di attivazione erano paragonabili ai gruppi di controllo. Il GLP-1 da solo non era in grado di determinare nessuna attivazione di IRS-1 [Fig. 25].

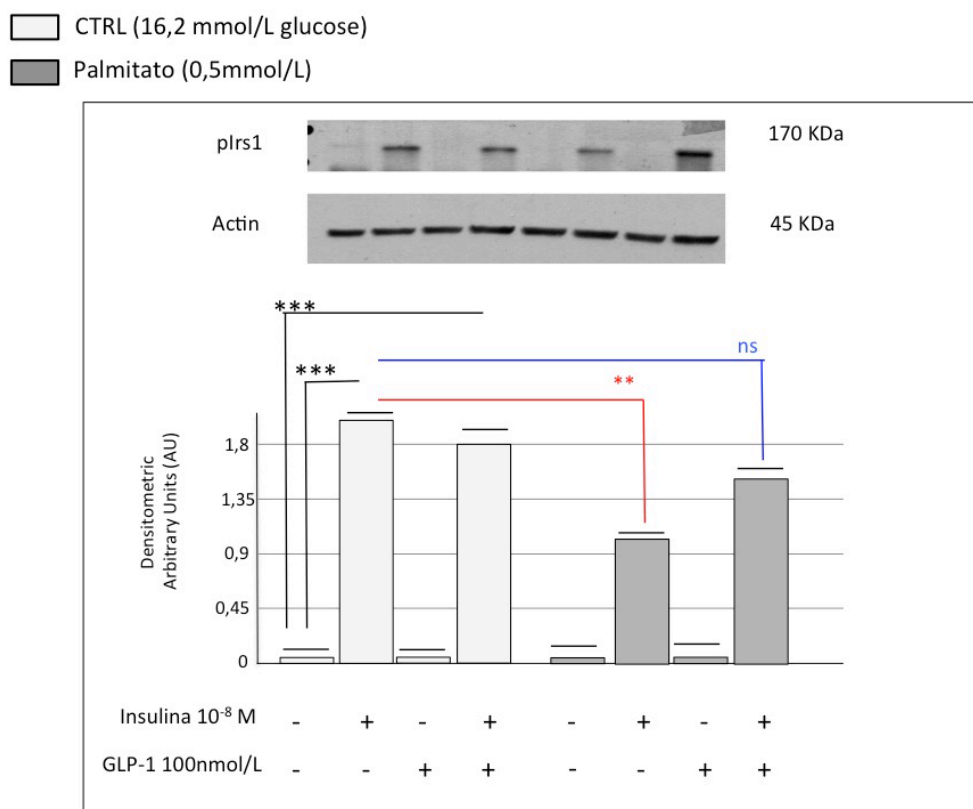


Figura 25. Analisi di Western blot per IRS-1 P (Tyr 612) e Actina. Il pannello superiore mostra un esperimento rappresentativo per IRS-1 P (Tyr 612), in cellule coltivate in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l), in presenza o assenza di palmitato (0,5mmol/L) e/o insulina (10^{-8} M) per 5 minuti. Il pannello inferiore mostra media \pm SE dell'analisi densitometrica di 5 diversi esperimenti; ns – non significativo; ** p < 0,05, *** p < 0,001 vs gruppi di controllo.

Al fine di analizzare l'effetto del GLP-1 sulla capacità di prevenire le alterazioni di espressione del recettore GABA_A, nel nostro modello è stata valutata l'espressione della fosforilazione di AKT e il grado di espressione del recettore GABA_A. Nel nostro modello, la contemporanea esposizione cronica delle cellule al palmitato ed al GLP-1 era in grado di prevenire il danno indotto dal palmitato sia sulla fosforilazione di AKT che sull'espressione di GABA_AR.

[Fig.26 e 27].

□ CTRL (16,2 mmol/L glucose)
 ■ Palmitato (0,5mmol/L)

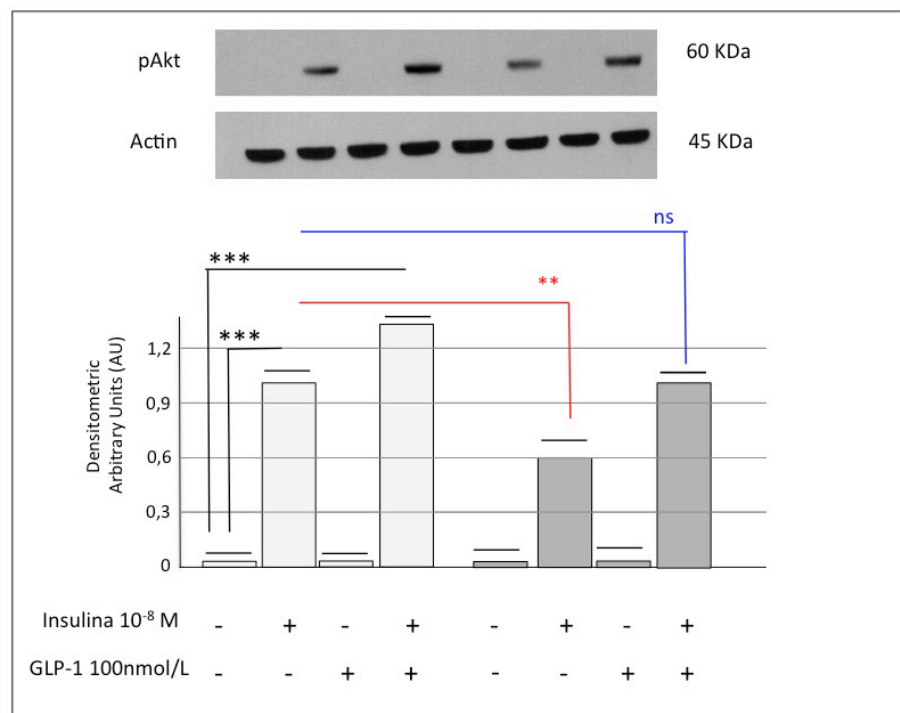


Figura 26. Analisi Western blot per la fosforilazione di pAKT (Ser 473) e Actina. Il pannello superiore mostra un esperimento rappresentativo per pAKT (Ser 473), in cellule coltivate in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l), in presenza o assenza di palmitato (0,5mmol/L) e/o insulina (10⁻⁸ M) per 5 minuti. Il pannello inferiore mostra media ± SE dell'analisi densitometrica di 5 diversi esperimenti; ns – non significativo * p <0.05, ** p <0,001 vs gruppi di controllo.

- CTRL (16,2 mmol/L glucose)
- Palmitato (0,5mmol/L)

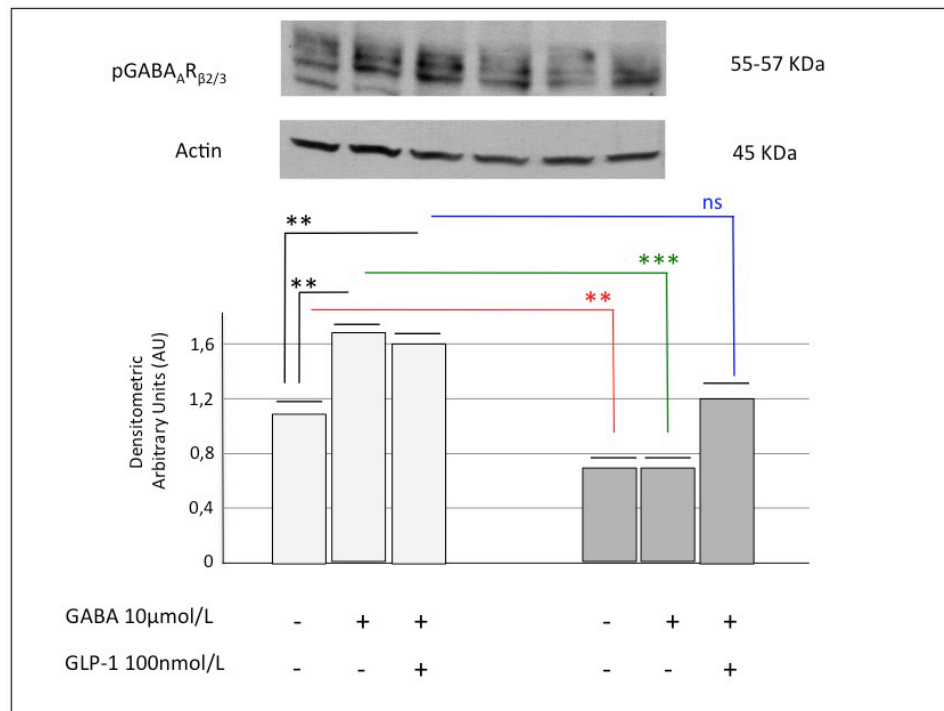


Figura 27. Analisi Western blot per la fosforilazione di pGABA_{A-β3} (Ser 408/409) e Actina. Il pannello superiore mostra un esperimento rappresentativo pGABA_{A-β3} (Ser 408/409), in cellule coltivate in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l), in presenza o assenza di palmitato (0,5mmol/L) e/o GABA (10 μmol/L) per 5 minuti. Il pannello inferiore mostra media ± SE dell'analisi densitometrica di 5 diversi esperimenti; ns – non significativo ** p < 0.05, *** p < 0,001 vs gruppi di controllo.

Per valutare se l'espressione proteica del recettore GABA_A corrispondesse ad un ripristino dell'espressione a livello della membrana cellulare, sono stati condotti esperimenti di immunofluorescenza al fine di studiare la localizzazione cellulare di GABA_AR. Nelle nostre condizioni la contemporanea esposizione cronica al palmitato e al GLP-1 era in grado di ripristinare l'espressione del recettore GABA_A a livello della membrana cellulare. In questi gruppi quindi l'espressione del recettore GABA_A appariva simile ai gruppi di controllo e significativamente differente rispetto alle cellule esposte solo al palmitato [Fig. 28 e 29].

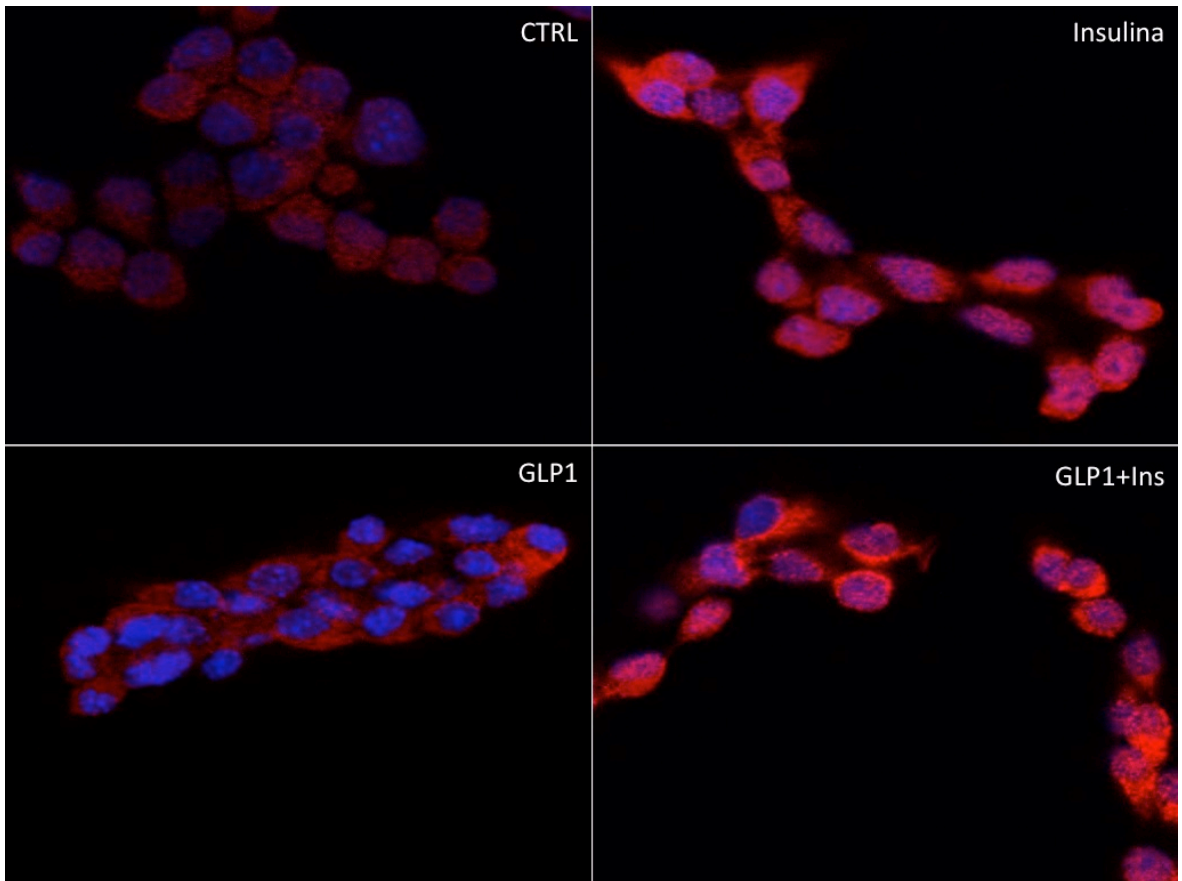


Figura 28. Immagini della traslocazione del recettore $GABA_A$ in cellule di controllo

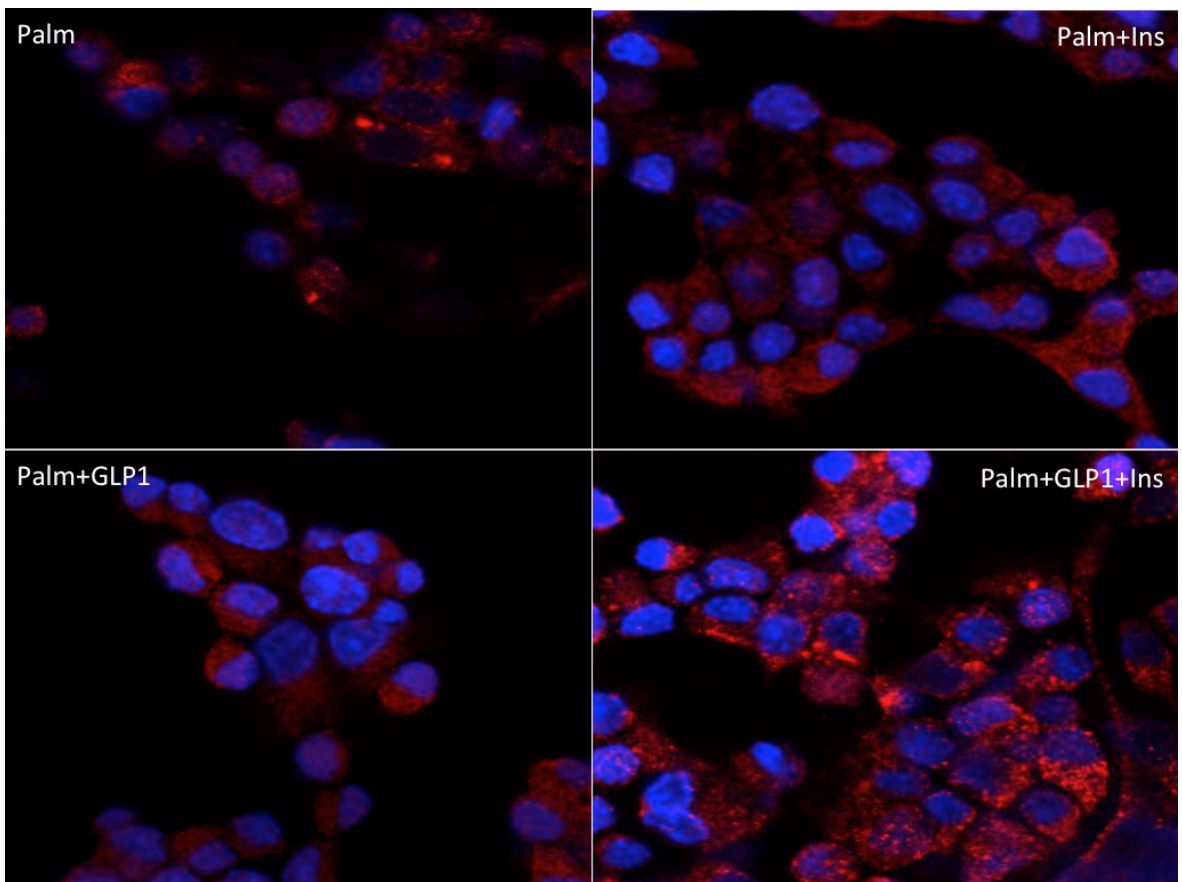


Figura 29. Immagini della traslocazione del recettore $GABA_A$ in cellule esposte a palmitato e Liraglutide

[Fig. 30 e 31].

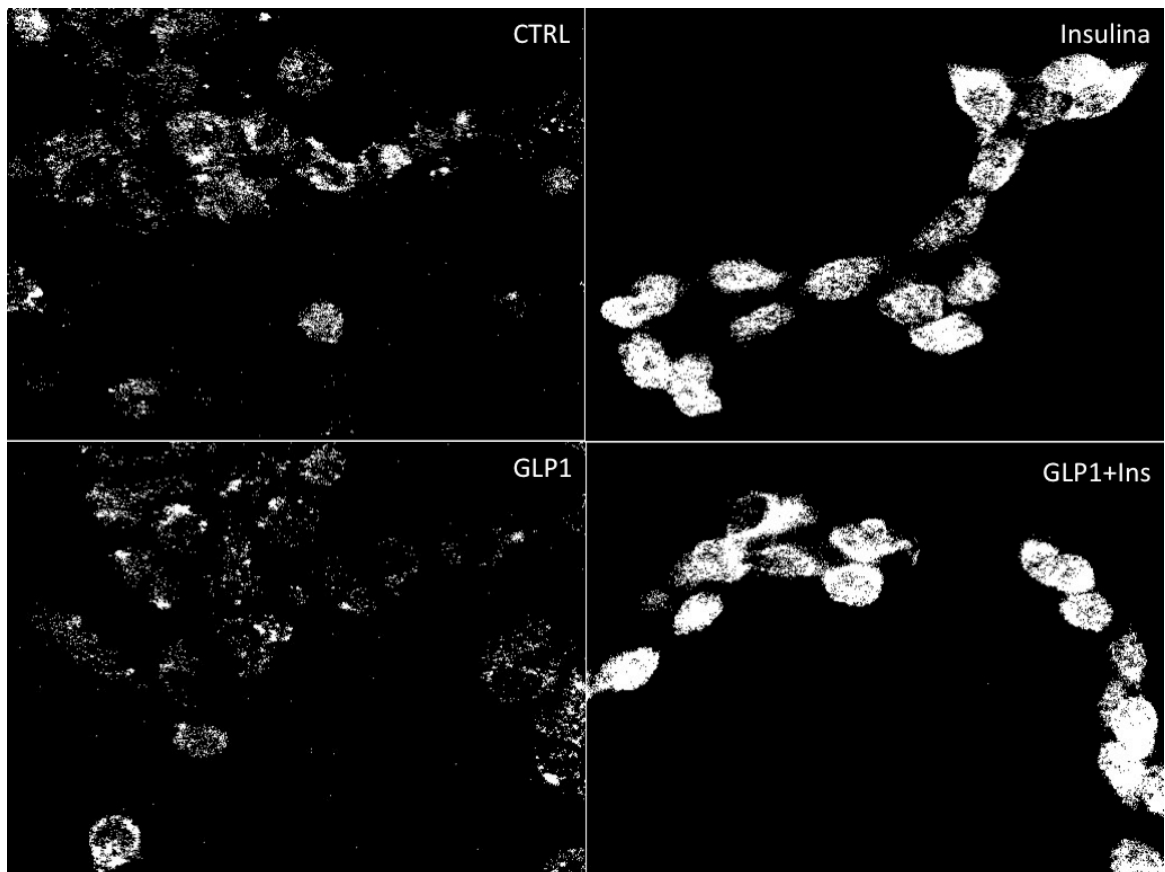


Figura 30: Densitometria in falsi colori del recettore GABA_A in cellule di controllo

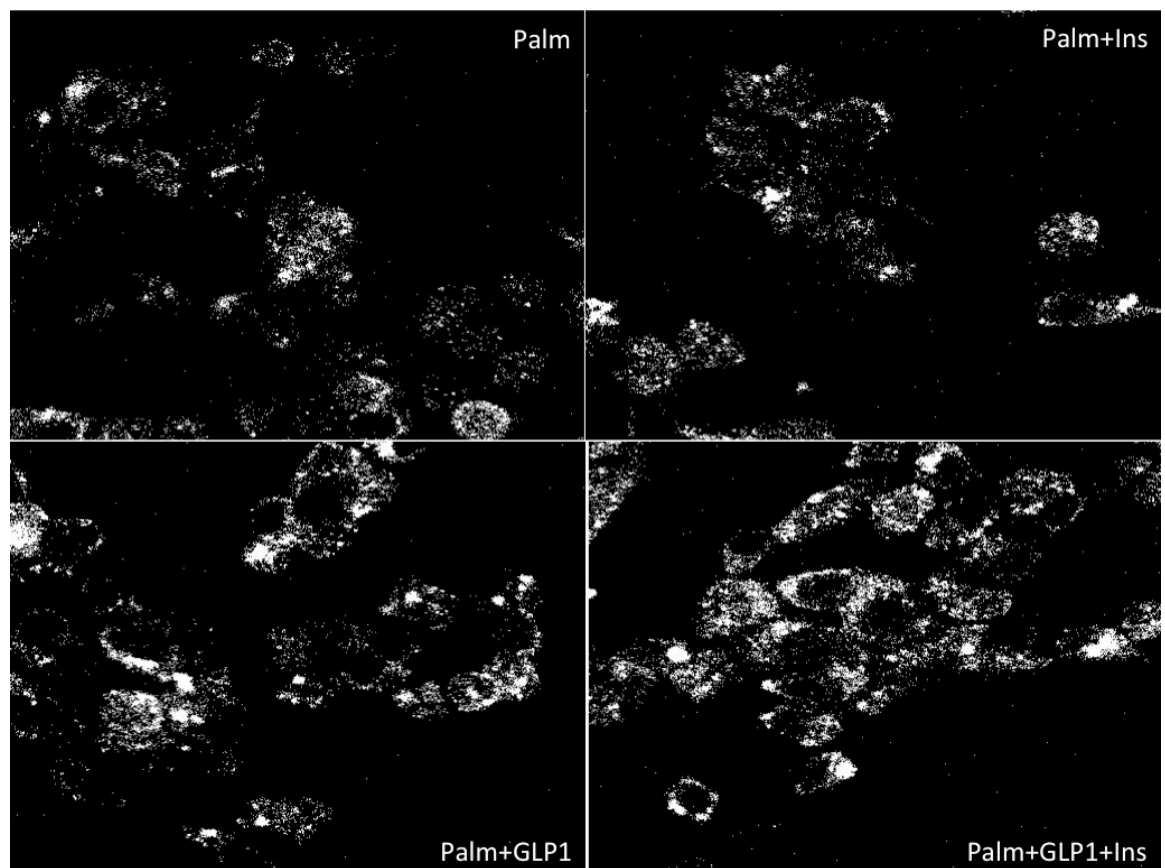


Figura 31: Densitometria in falsi colori del recettore GABA_A in cellule trattate con Liraglutide

[Fig. 32]

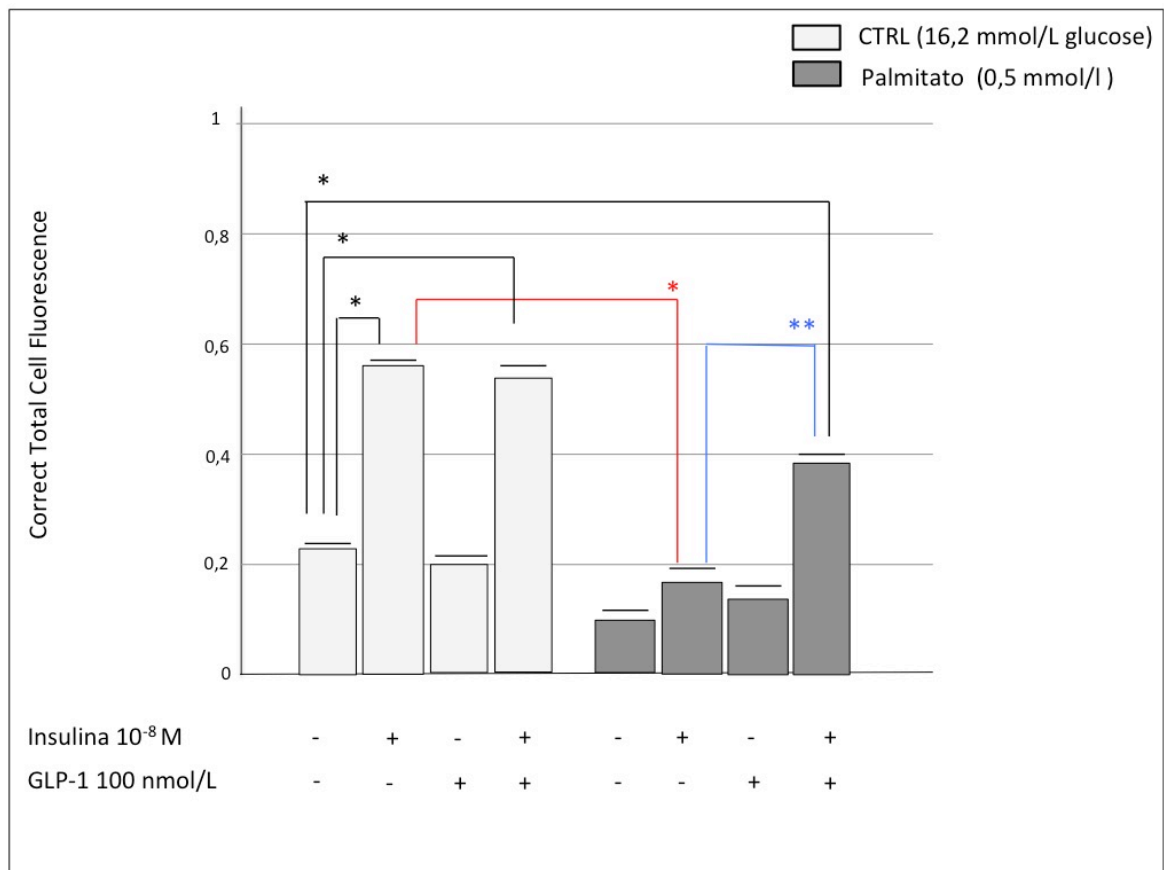


Figura 32. Analisi delle Fluorescenza del recettore $GABA_A$ in cellule α -TC1 di controllo e in cellule coltivate con GLP-1 (100 nmol/l) per 48 ore e palmitato (0,5 mmol/L) per 48 ore. Le cellule sono state coltivate in DMEM con o senza GLP-1 (100 nmol/l) per 48 ore e con o senza palmitato (0,5 mmol/L) per 48 ore, lavate e rimesse in coltura per un'ora in KRB (glucosio 25 mmol/l) e un'ora in KRB (glucosio 16,2 mmol/l) in presenza o assenza di GLP-1 (100 nmol/l) e/o insulina (10^{-8} M) per 10 minuti e/o GABA (10 μ mol/L) per 1 ora. I dati sono espressi in correct total cell fluorescence; media \pm errore standard (SE), n=5; * p< 0.05 vs. gruppo di controllo; ** p< 0.001 vs. gruppo di controllo.

Conclusioni della Seconda Parte

Questi dati indicano che il GLP-1 risulta in grado di prevenire le alterazioni metaboliche e funzionali indotte dall'esposizione cronica al palmitato. In questo gruppo di esperimenti infatti abbiamo riprodotto i dati della prima parte, cercando di comprendere come poter prevenire le alterazioni funzionali indotte dall'esposizione cronica al palmitato.

Nel nostro modello, la contemporanea esposizione al palmitato e al GLP-1 è risultata in grado di prevenire il difetto a carico del segnale insulinico intracellulare. Prevenendo il difetto a livello del segnale dell'insulina e quindi di fatto prevenendo l'instaurarsi dello stato di insulino-resistenza, queste

cellule erano in grado di rispondere allo stimolo inibitorio dell'insulina e mostravano inoltre un profilo di espressione del recettore GABA_A a livello della membrana cellulare paragonabile alle cellule di controllo.

Questi dati potrebbero rappresentare un valido contributo per la comprensione della fisiopatologia del diabete, un contributo per lo sviluppo di strategie mirate alla prevenzione dell'iperglicagonemia nel diabete e un valido supporto per la comprensione dei meccanismi di azione del GLP-1 a carico della cellula alfa pancreatica.

Discussioni

Lo scopo del nostro progetto è stato quello di studiare la secrezione di glucagone e le condizioni che possano determinare disfunzioni funzionali delle cellule alfa pancreatiche. Per questi studi abbiamo utilizzato una linea di alfa cellule pancreatiche murine, α -TC1, esposte cronicamente (48 h) ad alte concentrazioni di palmitato (0.5 mmol/L). Queste cellule possiedono il vantaggio, rispetto alle isole primarie, di essere una popolazione cellulare omogenea e di essere state utilizzate in precedenza per studiare la secrezione di glucagone e l'espressione genica [110, 111, 112-114]. L'esposizione al palmitato è stata scelta poiché è noto in letteratura che questo acido grasso libero è presente ad elevate concentrazioni nell'uomo e in modelli murini all'insorgenza del diabete [7].

I nostri dati mostrano che nel nostro modello è presente una maggiore secrezione di glucagone nelle cellule pre-esposte a palmitato rispetto alle condizioni basali ed inoltre è stato evidenziato una diminuzione dell'effetto inibitorio dell'insulina sulla secrezione di glucagone. Questi dati funzionali sono concordi con quanto si osserva nell'uomo in corso di diabete; iperglicemia ed inappropriati livelli di glucagone.

Lo studio inoltre ha voluto analizzare se questi aspetti funzionali fossero determinati da cambiamenti molecolari. L'analisi di alcuni componenti chiave della via intracellulare dell'insulina (IRS-1 e AKT) ha inoltre evidenziato una mancanza dell'attivazione indotta dall'insulina nei gruppi pre-esposti cronicamente al palmitato.

Poiché è noto in letteratura [37] che AKT controlla la polarizzazione delle membrane cellulari nelle alfa cellule pancreatiche, la mancata attivazione di AKT nel nostro modello potrebbe spiegare l'iper-glucagonemia che noi riscontriamo e potrebbe contribuire a spiegare questo stesso fenomeno riscontrato in clinica nei pazienti con diabete. Questi dati a nostro avviso

rappresentano punti importanti per la comprensione della fisiopatologia del diabete.

La presenza dei recettori insulinici sull'alfa cellula pancreatica e la loro importanza è stata descritta ampiamente in letteratura [115,116]. L'attivazione del recettore insulinico infatti permette la fosforilazione e la conseguente attivazione di diversi substrati molecolari intracellulari, tra questi IRS-1 e IRS-2, che sembrano essere le principali molecole adattatrici implicate sia nel legame con PI3K sia nel segnale intracellulare di MAPK. L'insulina inibisce la secrezione di glucagone probabilmente tramite l'attivazione dei canali K^{+}_{ATP} dipendenti (K_{ATP} -channel); ciò determina l'iperpolarizzazione della membrana plasmatica ed il blocco della secrezione di glucagone [117]. Nelle alfa cellule murine, l'insulina agisce riducendo la sensibilità dei canali K^{+}_{ATP} , i quali si attivano a concentrazioni più alte di ATP, attraverso un segnale mediato dall'attivazione di PI3K-Akt (phosphatidylinositol 3-kinase) [118, 119]. Inoltre è stato riportato che nelle cellule alfa, l'insulina attiva i recettori $GABA_A$ attraverso la via dipendente dall'AKT Kinase; ciò determina l'iperpolarizzazione e l'inibizione della secrezione di glucagone [120]. Anche se non è stato univocamente dimostrato il contributo relativo dei canali K_{ATP} e dell'attivazione del recettore $GABA_A$ nell'inibizione del rilascio di glucagone, è probabile che questo effetto sia mediato dalla via PI3K/AKT chinasi. Per meglio chiarire questo aspetto nella seconda parte del nostro progetto abbiamo voluto analizzare il contributo specifico del sistema del GABA ($GABA/GABA_A R$) nelle nostre condizioni. In presenza di palmitato, dopo una esposizione cronica prolungata in grado di mimare condizioni cliniche tipiche del paziente con diabete, nel nostro modello era possibile osservare una riduzione della traslocazione del recettore $GABA_A$ nelle superfici delle cellule. Questo dato, assieme alla riduzione della fosforilazione di AKT conferma l'ipotesi che lega il segnale insulinico intracellulare, l'insulino-resistenza delle alfa cellule, la via del GABA, la iperpolarizzazione delle membrane e l'aumento della secrezione del

glucagone. Il GABA e il suo recettore potrebbero essere responsabili della facilitazione o dell'inibizione della secrezione ormonale ed una riduzione dei recettori a livello della membrana potrebbe essere alla base di questa alterazione funzionale. L'esposizione cronica al palmitato potrebbe determinare tali alterazioni.

I nostri studi sono proseguiti nel tentativo di comprendere eventuali meccanismi di prevenzione di tale danno. Poiché nella pratica clinica l'avvento delle terapie a base di incretine, in particolare con analoghi del GLP-1 o con agonisti recettoriali, hanno mostrato effetti favorevoli sul miglioramento dell'ipoglucagonemia nei soggetti diabetici, abbiamo voluto valutare cosa il GLP-1 potesse determinare nel nostro sistema. Nel nostro modello la contemporanea esposizione cronica al palmitato e al GLP-1 era in grado di prevenire le alterazioni indotte dal palmitato. In particolare la via del segnale insulinico appariva preservata e l'espressione del recettore GABA_A appariva paragonabile alle cellule di controllo. A nostro avviso questi dati rappresentano un avanzamento importante per la comprensione della fisiopatologia del diabete di tipo 2 e per la comprensione delle basi farmacologiche di queste nuove terapie a base di ormoni intestinali. In letteratura tuttavia si discute sulla reale presenza dei recettori per il GLP-1 a livello delle cellule alfa pancreatiche e sull'effetto diretto o mediato del GLP-1 sulla secrezione di glucagone. Per meglio chiarire questo aspetto il mio gruppo ha analizzato l'espressione del recettore per GLP-1 in questo modello [122]. Nel nostro modello è presente il recettore per il GLP-1 e questo recettore risulta funzionante. Questi nostri dati hanno contribuito nel mondo scientifico alla comprensione del segnale del GLP-1 nelle cellule alfa pancreatiche.

In conclusione i nostri dati indicano che le a-TC1 clone 6, una linea cellulare di alfa cellule pancreatiche, coltivate per 48 ore in presenza di acidi grassi ad alte concentrazioni di palmitato (0.5 mmol/l) mostrano insulino-resistenza (IRS-1 e Akt); questa via normalmente controlla la secrezione di glucagone

nelle alfa cellule pancreatiche. Questo segnale risulta critico per la traslocazione del recettore $GABA_A$ sulle membrane cellulari e per la polarizzazione delle cellule. Il GLP-1 appare capace di prevenire tali alterazioni indotte dal palmitato. Questi risultati supportano l'ipotesi che l'esposizione cronica ad acidi grassi potrebbe contribuire all'alterazione della regolazione del rilascio di glucagone e le terapie a base di incretine avrebbero un effetto positivo su tali aspetti della fisiopatologia. In questo modo, sebbene questi risultati siano stati ottenuti in cellule immortalizzate, essi supportano la possibilità che le alfa cellule pancreatiche potrebbero aggiungersi alla lista di tessuti insulino-resistenti, rendendo ancora più complessa la relazione tra insulino-resistenza e alterazione della funzione dell'isola pancreatica in corso di diabete.

Bibliografia

1. **American Diabetes Association** - Etiologic classification of diabetes mellitus – Diabetes Care no37, Jan 2014
2. **DeFronzo RA**. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 2009;58:773–795
3. **Reece EA, Leguizamon G, Wiznitzer A**. Gestational diabetes: the need for a common ground. *Lancet* 2009, 373(9677):1789-1797.
4. **Faglia G., Beck-Peccoz P**. Malattie del Sistema Endocrino e del Metabolismo. IV edizione. McGraw Hill, 2006; 393-397.
5. **Unger RH, Orci L**. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet* 1975; 1:14–16.
6. **Dedoussis GVZ, Kaliora AC, Panagiotakos DB**. Genes, Diet and type 2 diabetes mellitus: a review. *The review of diabetic studies*, 2007; 4: 13-24.
7. **Kulkarni RN**. The islet beta-cell. *Int J Biochem Cell Biol.* ;36(3):365- 71. Review 2004.
8. **Best CH**. The internal secretion of the pancreas. *Can Med Assoc J.* 17;87:1046-51 1962.
9. **Sutherland EW, de Duve C.**: Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of pancreas. *J. Biol. Chem.* 175: 663-674. 1948
10. **Lane MA.**: The cytological characters of the areas of Langerhans. *Am. J. Anat.* 7: 409-422. 1907
11. **Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A.**: The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;103(7):2334-9. 2006
12. **Bonner-Weir S, Orci L.**: New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes*.31(10):883-9. 1982
13. **Orci L, Baetens D, Rufener C, Amherdt M, Ravazzola M, Studer P, Malaisse-Lagae F, Unger RH.**: Hypertrophy and hyperplasia of somatostatin-containing D-cells in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*;73(4):1338-42. 1976
14. **Rahier J, Goebbels RM, Henquin JC.**: Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia.* 24(5):366-71. 1983
15. **Bolli GB, Fanelli CG.**: Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 28(3):467-93, v. Review. 1999
16. **Lang DA, Matthews DR, Burnett M, Turner RC.**: Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes.* 30(5):435-9. 1981
17. **Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, Frank BH, Galloway JA, Van Cauter E.**: Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 12;318(19):1231-9. 1988
18. **Brunzell JD, Robertson RP, Lerner RL, Hazzard WR, Ensink JW, Bierman EL, Porte D Jr.**: Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab.* 42(2):222-9. 1976
19. **Malaisse WJ.**: Metabolism of D-glucose anomers in pancreatic islets (review). *Int*

- J Mol Med.* 12(6):911-6. Review. 2003
20. **Maechler P, Carobbio S, Rubi B.:** In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell Biol.*;38(5-6):696-709. Review. 2006
 21. **Antinozzi PA, Ishihara H, Newgard CB, Wollheim CB.:** Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: a survey of four fuel secretagogues. *J Biol Chem.*277(14):11746-55. 2002
 22. **Barg S, Eliasson L, Renström E, Rorsman P.:** A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first- phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes*;51 Suppl 1:S74- 82. Review. 2002
 23. **Patanè G, Anello M, Piro S, Vigneri R, Purrello F, Rabuazzo AM.:** Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor- gamma inhibition. *Diabetes.*;51(9):2749-56. 2002
 24. **MacDonald PE, De Marinis YZ, Ramracheya R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, Cox R, Eliasson L, Rorsman P.:** A KATP channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans. *PLoS Biol.* 5(6):e143. 2007
 25. **Persaud SJ, Howell SL.:** The biosynthesis and secretion of insulin. *Williams G. Textbook of diabetes; Blackwell Publishing company* 13: 11-17. 2003
 26. **Rutter GA, Hill EV.:** Insulin vesicle release: walk, kiss, pause ... then run. *Physiology* (Bethesda). ;21:189-96. Review. 2006
 27. **Lang J.:** Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem.* ;259(1-2):3-17. Review. 1999
 28. **MacDonald PE, Rorsman P.:** The ins and outs of secretion from pancreatic beta-cells: control of single-vesicle exo- and endocytosis. *Physiology* (Bethesda). 22:113-21. Review. 2007
 29. **Rorsman P, Renström E.:** Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia.*;46(8):1029-45. Epub 2003 Jul 17. Review. 2003
 30. **Fridlyand LE, Philipson LH.:** Reactive species, cellular repair and risk factors in the onset of type 2 diabetes mellitus: review and hypothesis. *Curr Diabetes Rev.* 2(2):241-59. Review. 2006
 31. **Wiederkehr A, Wollheim CB.** Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology.* 147(6):2643-9. Review. 2006
 32. **Dunning BE, Gerich JE.:** The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev.*28(3):253-83. Review. 2007
 33. **Menge BA, Gruber L, Jorgensen SM, Deacon CF, Schmidt WE, Veldhuis JD, Holst JJ, Meier JJ:** Loss of inverse relationship between pulsatile insulin and glucagon secretion in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2011, 60:2160–2168.
 34. **Takahashi R, Ishihara H, Tamura A, Yamaguchi S, Yamada T, Takei D, et al.** Cell type-specific activation of metabolism reveals that b-cell secretion suppresses glucagon release from a-cells in rat pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E308–16

35. **Quoix N, Cheng-Xue R, Mattart L, Zeinoun Z, Guiot Y, Beauvois MC, Henquin JC, Gilon P:** Glucose and pharmacological modulators of ATP-sensitive K⁺ channels control [Ca²⁺]_i by different mechanisms in isolated mouse alpha-cells. *Diabetes* 2009,
36. **Bhathena SJ, Oie HK, Gazdar AF, Voyles NR, Wilkins SD, Recant L:** Insulin, glucagon, and somatostatin receptors on cultured cells and clones from rat islet cell tumor. *Diabetes* 1982, 31(6 Pt 1):521-531
37. **Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, Liu S, Wendt A, Deng S, Ebina Y, Wheeler MB, Braun M, Wang Q:** Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metab* 2006, 3:47–58.
38. **Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Clark, A., Walker, J.N., Johnson, P. R., et al.** (2010). Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an autocrine excitatory transmitter in human pancreatic beta-cells. *Diabetes* 59, 1694–1701
39. **Hauge-Evans, A. C., King, A. J., Carmignac, D., Richardson, C. C., Robinson, I. C., Low, M. J., et al.** (2009). Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes* 58, 403–411.
40. **Cejvan, K., Coy, D. H., and Efendic, S.** (2003). Intra-islet somatostatin regulates glucagon release via type 2 somatostatin receptors in rats. *Diabetes* 52, 1176–1181.
41. **Gromada, J., and Rorsman, P.** (2004). New insights into the regulation of glucagon secretion by glucagon-like peptide-1. *Horm. Metab. Res.* 36, 822–829.
42. **Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, Grieco FA, Del Guerra S, D'Aleo V, Piro S, Marselli L, Boggi U, Filipponi F, Tinti L, Salvini L, Wollheim CB, Purrello F, Dotta F:** A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia* 2012, 55:3262–3272
43. **Zhou, H., Zhang, T., Harmon, J. S., Bryan, J., and Robertson, R. P.** (2007). Zinc, not insulin, regulates the rat alpha-cell response to hypoglycemia in vivo. *Diabetes* 56, 1107–1112.
44. **Salehi, A., Dornonville de la Cour, C., Hakanson, R., and Lundquist, I.** (2004). Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regul. Pept.* 118, 143–150.
45. **Larsson, H., and Ahren, B.** (2000). Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 23, 650–657
46. **Bansal P, Wang Q:** Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008, 295:E751–E761.
47. **Gladkevich A, Korf J, Hakobyan VP, Melkonyan KV.** The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders. *Auton Neurosci.* 2006 Jan 30;124(1-2):1-8. Epub 2005 Dec 7.
48. **Ong J, Kerr DI, Capper HR, Johnston GA** Cortisone: a potent GABAA antagonist in the guinea-pig isolated ileum *J Pharm Pharmacol.* 1990 Sep;42(9):662-4.
49. **Thomas-Reetz AC, De Camilli P** A role for synaptic vesicles in non-neuronal cells: clues from pancreatic beta cells and from chromaffin cells. *FASEB J.* 1994 Feb;8(2):209-16.

50. **Glykys J, Mody I.** Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron*. 2007 Dec 6;56(5):763-70.
51. **Owens DF, Kriegstein AR.** Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci*. 2002 Sep;3(9):715-27.
52. **Represa A, Ben-Ari Y.** Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci*. 2005 Jun;28(6):278-83
53. **Olsen RW, Tobin AJ.** Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB J*. 1990 Mar;4(5):1469-80.
54. **Lüddens H, Korpi ER, Seeburg PH.** GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. *Neuropharmacology*. 1995 Mar;34(3):245-54.
55. **Kaila K, Pasternack M, Saarikoski J, Voipio J.** Influence of HCO₃⁻ on the postsynaptic actions of GABA at the crayfish neuromuscular synapse. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1989;582:18.
56. **Olsen RW, Sieghart W.** International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev*. 2008 Sep;60(3):243-60. doi: 10.1124/pr.108.00505. Epub 2008 Sep 12.
57. **Boileau AJ, Pearce RA, Czajkowski C.** Tandem subunits effectively constrain GABAA receptor stoichiometry and recapitulate receptor kinetics but are insensitive to GABAA receptor-associated protein. *J Neurosci*. 2005 Dec 7;25(49):11219-30.
58. **Rudolph U, Knoflach F.** Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Jul 29;10(9):685-97. doi: 10.1038/nrd3502.
59. **Finer-Moore J, Stroud RM.** Amphipathic analysis and possible formation of the ion channel in an acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Jan;81(1):155-9.
60. **Tasneem A, Iyer LM, Jakobsson E, Aravind L.** Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome Biol*. 2005;6(1):R4. Epub 2004 Dec 20.
61. **McDonald BJ, Moss SJ.** Conserved phosphorylation of the intracellular domains of GABA(A) receptor beta2 and beta3 subunits by cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin type II-dependent protein kinase. *Neuropharmacology*. 1997 Oct;36(10):1377-85.
62. **Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA, et al.** Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*. 1987 Jul 16-22;328(6127):221-7.
63. **Sine SM, Engel AG.** Recent advances in Cys-loop receptor structure and function *Nature*. 2006 Mar 23;440(7083):448-55.
64. **Steiger JL, Russek SJ.** GABAA receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters, and cognate transcription factors. *Pharmacol Ther*. 2004 Mar;101(3):259-81.
65. **Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdellès B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Thompson SA,**

- Wafford KA.** Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Apr 30;868:645-53.
66. **Sieghart W, Sperk G** Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem.* 2002 Aug;2(8):795-816.
 67. **Barnard EA.** Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biochem Sci.* 1992 Oct;17(10):368-74.
 68. **Daniel C, Ohman M.** RNA editing and its impact on GABAA receptor function. *Biochem Soc Trans.* 2009 Dec;37(Pt 6):1399-403. doi: 10.1042/BST0371399.
 69. **Berezhnoy D, Gibbs TT, Farb DH.** Docking of 1,4-benzodiazepines in the alpha1/gamma2 GABA(A) receptor modulator site. *Mol Pharmacol.* 2009 Aug;76(2):440-50. doi: 10.1124/mol.109.054650. Epub 2009 May 29.
 70. **Akabas MH, Kaufmann C, Archdeacon P, Karlin A.** Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the alpha subunit. *Neuron.* 1994 Oct;13(4):919-27.
 71. **Blanton MP, Cohen JB.** Identifying the lipid-protein interface of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications. *Biochemistry.* 1994 Mar 15;33(10):2859-72.
 72. **Jacob TC, Moss SJ, Jurd R.** GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci.* 2008 May;9(5):331-43. doi: 10.1038/nrn2370.
 73. **Ernst M, Bruckner S, Boretsch S, Sieghart W.** Comparative models of GABAA receptor extracellular and transmembrane domains: important insights in pharmacology and function. *Mol Pharmacol.* 2005 Nov;68(5):1291-300. Epub 2005 Aug 15.
 74. **Sieghart W.** Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* 1995 Jun;47(2):181-234.
 75. **Sigel E, Lüscher BP.** A closer look at the high affinity benzodiazepine binding site on GABAA receptors. *Curr Top Med Chem.* 2011;11(2):241-6.
 76. **Twyman RE, Rogers CJ, Macdonald RL.** Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann Neurol.* 1989 Mar;25(3):213-20.
 77. **Shu HJ, Bracamontes J, Taylor A, Wu K, Eaton MM, Akk G, Manion B, Evers AS, Krishnan K, Covey DF, Zorumski CF, Steinbach JH, Mennerick S.** Characteristics of concatemeric GABA(A) receptors containing $\alpha 4/\delta$ subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol.* 2012 Apr;165(7):2228-43. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01690.x.
 78. **Murru, Luca,** UniCa, 2009: Modificazioni nella funzionalità , nell'espressione dei recettori GABA_A extrasinaptici e nella plasticità sinaptica nell'ippocampo di ratto durante la gravidanza
 79. **White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH.** Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature.* 1998 Dec 17;396(6712):679-82.
 80. **Shimada S, Cutting G, Uhl GR.** Gamma-Aminobutyric acid A or C receptor? gamma-Aminobutyric acid rho 1 receptor RNA induces bicuculline-,

- barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive gamma-aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol*. 1992 Apr;41(4):683-7.
81. **Feigenspan A Bormann** GABA-gated Cl⁻ channels in the rat retina. *J Prog Retin Eye Res*. 1998 Jan;17(1):99-126.
 82. **Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W**. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986, 29(1):46-52.
 83. **Baggio LL, Drucker DJ: Biology of incretins. GLP-1 and GIP**. *Gastroenterology* 2007, 132(6):2131-2157.
 84. **Kreymann B, Williams G, Ghatel MA, Bloom SR**. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 1987, 2(8571):1300-1304.
 85. **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.
 86. **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.
 87. **Veronica Hurtado, Isabel Roncero, Enrique Blazquez, Elvira Alvarez and Carmen Sanz**; Glucagon-Like Peptide-1 and Its Implications in Obesity; *Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases*; doi 10.5772/54221
 88. **Salvatore Piro, Loriana G. Mascali, Francesca Urbano, Agnese Filippello, Roberta Malaguarnera, Salvatore Calanna, Agata M. Rabuazzo, Francesco Purrello** Chronic Exposure to GLP-1 Increases GLP-1 Synthesis and Release in a Pancreatic Alpha Cell Line (a-TC1): Evidence of a Direct Effect of GLP-1 on Pancreatic Alpha Cells, *PLoS One*. 2014 Feb 28;9(2):e90093
 89. **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.
 90. **Cathrine Ørskov, Lise Rabenhøj, André Wettergren, Hans Kofod and Jens J Holst**. Tissue and Plasma Concentrations of Amidated and Glycine-Extended Glucagon-Like Peptide I in Humans. *Diabetes* April 1994 43:4 535-539
 91. **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
 92. **Demuth HU, McIntosh CH, Pederson RA**. Type 2 diabetes--therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Biochimica et biophysica acta* 2005; 1751(1):33-44.
 93. **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.

94. **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.
95. **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.
96. **Daniel J. Drucker** Deciphering Metabolic Messages From the Gut Drives Therapeutic Innovation: The 2014 Banting Lecture *Diabetes* 2015;64:317–326,
97. **Campbell JE, Drucker DJ.** Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab*. 2013 Jun 4;17(6):819-37
98. **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.
99. **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.
100. **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.
101. **JJ Holst.** The Physiology of Glucagon-like Peptide 1 *Physiological Reviews* 1 October 2007 Vol. 87 no. 4, 1409-1439
102. **Ussher JR, Drucker DJ.** Cardiovascular Actions of Incretin-Based Therapies. *Circ Res*. 2014 May 23;114(11):1788-803
103. **Koen Jansen, Hans De Winter, Leen Heirbaut, Jonathan D. Cheng, Jurgen Joossens, Anne-Marie Lambeir, Ingrid De Meester, Koen Augustyns and Pieter Van der Veken;** Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a xanthine scaffold; *Med. Chem. Commun.* 12 Aug 2014,5, 1700-1707
104. **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.
105. **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
106. **Hamaguchi K, et al.** Cellular Interaction Between Mouse Pancreatic alpha-Cell and beta-Cell Lines: Possible Contact-Dependent Inhibition of Insulin Secretion. *Exp. Biol. Med.* 228:1227-1233, 2003
107. **Powers AC, et al.** Proglucagon processing similar to normal islets in pancreatic alpha-like cell line derived from transgenic mouse tumor. *Diabetes* 39: 406-414, 1990.
108. **Hamaguchi K, Leiter EH.** Comparison of cytokine effects on mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines. Viability, secretory function, and MHC antigen expression. *Diabetes* 39: 415-425, 1990.
109. **Hamaguchi K, Utsunomiya N, Takaki R, Yoshimatsu H, Sakata T** 2003 Cellular interaction between mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines: possible contact-dependent inhibition of insulin secretion. *Exp Biol Med* (Maywood) 228:1227–1233

110. **Hong J, Abudula R, Chen J, Jeppesen PB, Dyrskog SE, Xiao J, Colombo M, Hermansen K** 2005 The short-term effect of fatty acids on glucagon secretion is influenced by their chain length, spatial configuration, and degree of unsaturation: studies in vitro. *Metabolism* 54:1329–1336
111. **Sarbasov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM** 2005 Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098–1101
112. **McGirr R, Ejbick CE, Carter DE, Andrews JD, Nie Y, Friedman TC, Dhanvantari S** 2005 Glucose dependence of the regulated secretory pathway in α -TC1-6 cells. *Endocrinology* 146:4514–4523
113. **Mizusawa N, Hasegawa T, Ohigashi I, Tanaka-Kosugi C, Harada N, Itakura M, Yoshimoto K** 2004 Differentiation phenotypes of pancreatic islet β - and δ -cells are closely related with homeotic genes and a group of differentially expressed genes. *Gene* 331:53–63
114. **Wang J, Webb G, Cao Y, Steiner DF** 2003 Contrasting patterns of expression of transcription factors in pancreatic β - and δ -cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12660–12665
115. **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- γ inhibition. *Diabetes*;51(9):2749-56. 2002
116. **Kisanuki K, Kishikawa H, Araki E, Shirotani T, Uehara M, Isami S, Ura S, Jinnouchi H, Miyamura N, Shichiri M** 1995 Expression of insulin receptor on clonal pancreatic β -cells and its possible role for insulin-stimulated negative regulation of glucagon secretion. *Diabetologia*38:422–429
117. **Rorsman P, Salehi SA, Abdulkader F, Braun M, MacDonald PE** 2008 K(ATP)-channels and glucose-regulated glucagon secretion. *Trends Endocrinol Metab* 19:277–284
118. **Leung YM, Ahmed I, Sheu L, Gao X, Hara M, Tsushima RG, Diamant NE, Gaisano HY** 2006 Insulin regulates islet β -cell function by reducing KATP channel sensitivity to adenosine 5'-triphosphate inhibition. *Endocrinology* 147:2155–2162
119. **Khan FA, Goforth PB, Zhang M, Satin LS** 2001 Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic β -cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Diabetes* 50:2192–2198
120. **Kisanuki K, Kishikawa H, Araki E, Shirotani T, Uehara M, Isami S, Ura S, Jinnouchi H, Miyamura N, Shichiri M**: Expression of insulin receptor on clonal pancreatic cells and its possible role for insulin-stimulated negative regulation of glucagon secretion. *Diabetologia* 38:422–429. 1995
121. **Calanna S, Urbano F, Piro S, Zagami RM, Di Pino A, Spadaro L, Purrello F, Rabuazzo AM.** Elevated plasma glucose-dependent insulinotropic polypeptide associates with hyperinsulinemia in metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2012 May;166(5):917-22. doi: 10.1530/EJE-11-0765. Epub 2012 Mar
122. **Piro S, Mascali LG, Urbano F, Filippello A, Malaguarnera R, Calanna S, Rabuazzo AM, Purrello F.** 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. *PLoS One.* 2014 Feb 28;9(2):e90093. doi: 10.1371/journal.pone.0090093. eCollection 2014.