



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA APPLICATA ALLA BIOMEDICINA

**La DPP-4 è espressa nelle beta cellule pancreatiche umane
e la sua inibizione migliora la funzionalità e la
sopravvivenza beta cellulare nel diabete di tipo 2**

Relatori:

Prof. Piero Marchetti

Dott. Marco Bugliani

Correlatori:

Prof. Aldo Paolicchi

Prof. Roberta Moschini

Candidata:

Francesca Grano

Anno accademico 2014/2015

INDICE

Riassunto	5
Abstract	6
Introduzione	7
1 – Diabete Mellito	7
1.1 – Definizione	7
1.1.1 - Complicanze del Diabete	8
1.2 – Epidemiologia	9
1.3 – Classificazione	10
1.4 - Diabete Mellito di Tipo 2	11
1.4.1 - Eziologia	11
1.4.2 – Patogenesi	12
1.4.3 - Diagnosi del Diabete Mellito di Tipo 2	13
2 - Il Pancreas	14
2.1 - Isola Pancreatica	14
2.2 - Massa Beta Cellulare	15
2.2.1 - Funzione Beta Cellulare	16
3 - Le Incretine	17
3.1 - Cenni Storici	17
3.2 - Effetto Incretinico e Biologia degli Ormoni Incretinici	18
3.3 - Il GLP-1	19

3.3.1 - Regolazione del Rilascio del GLP-1 dalle Cellule L	21
3.3.2 - Recettore e Trasduzione del Segnale del GLP-1	22
3.4 - Controllo dell'Attività delle Incretine: la DPP-4	23
4 - Diabete e Terapie Farmacologiche	26
4.1 - GLP-1 ed Analoghi Farmacologici	27
4.2 - Inibitori della DPP-4	27
4.2.1 - MK-0626	28
Scopo della Tesi	31
Materiali e Metodi	32
1 - Linea Beta Cellulare Umana	32
2 - Immunoistochimica e Microscopia Confocale	32
3 - Microscopia Elettronica	33
3.1 – Immunogold	35
4 - Isolamento e Purificazione delle Isole Pancreatiche Umane	35
4.1 - Preparazione delle Isole Pancreatiche Umane	35
5 - Preparazione del Mezzo di Coltura M199	37
6 - Studi Funzionali in Vitro	37
7 - Dosaggio Immunoradiometrico	39
7.1 - Analisi del Rilascio Insulinico	40
8 - Coltura Isole	40
9 - Valutazione della Sopravvivenza di EndoC- β H1	40

10 - Analisi dell'Espressione Genica	40
11 - Analisi Statistica	45
Risultati.	46
1 - Valutazione della Presenza della DPP-4 nell'Isola Pancreatica	46
2 - Valutazione della Presenza della DPP-4 nella Linea Beta Cellulare Umana EndoC- β H1	48
3 - Effetto dell'Inibizione della DPP-4 sul Danno Indotto da Citochine in Isole Pancreatiche Umane e Cellule EndoC- β H1	48
4 - Effetto dell'Inibizione della DPP-4 nelle Isole Diabetiche di Tipo 2	50
Discussione	52
Bibliografia	54

RIASSUNTO

Recentemente alcuni autori hanno mostrato come le isole pancreatiche umane siano in grado di secernere in maniera regolata il GLP-1. Dal momento che questo ormone viene degradato ad opera dell'enzima DPP-4, ci siamo domandati se anche la DPP-4 fosse presente nell'isola pancreatica e, nel caso, quale fosse il suo ruolo. Nel nostro studio, quindi, abbiamo valutato l'espressione e il ruolo della DPP-4 in isole pancreatiche umane purificate da donatori non diabetici (ND), donatori affetti da diabete di tipo 2 (DT2) e in una linea beta cellulare umana insulino-secernente, la EndoC- β H1.

Su questi modelli sono state effettuate analisi morfologiche, ultrastrutturali, funzionali, di sopravvivenza e molecolari in varie condizioni sperimentali. L'analisi immunoistochimica e la microscopia confocale hanno mostrato come la DPP-4 fosse presente nell'isola pancreatica e più dettagliatamente come questa colocalizzasse con glucagone e in misura minore con alcune cellule contenenti insulina. L'analisi mediante *immunogold* da un lato confermava la presenza della DPP-4 sia nelle cellule alfa che nelle cellule beta, mentre dall'altro mostrava come la proporzione delle cellule alfa e beta DPP-4-positive risultasse significativamente ridotta nel diabete di tipo 2; in accordo, anche l'espressione genica risultava essere inferiore nei campioni DT2. In aggiunta, l'esposizione ad un inibitore della DPP-4 era in grado di proteggere sia le isole umane che la linea beta cellulare dal danno indotto da citochine. L'inibizione, inoltre, era in grado di aumentare la secrezione insulinica, ridurre l'apoptosi e migliorare l'ultrastruttura di isole DT2. Questo studio quindi, dimostra che 1) la DPP-4 è presente nelle beta cellule umane; 2) la sua espressione è ridotta nelle isole DT2 e 3) la sua inibizione ha effetti positivi sia nelle isole pancreatiche isolate che nella linea beta cellulare. Tutto questo suggerisce che la DPP-4, oltre a giocare un ruolo nell'effetto incretinico, è in grado di influenzare in maniera diretta la fisiopatologia delle beta cellule.

ABSTRACT

Regulated GLP-1 secretion from pancreatic islets has been reported, and a role for locally expressed DPP-4 suggested. Here we comprehensively evaluated the expression and role of DPP-4 in islets from human non-diabetic (ND) and type 2 diabetic (T2D) individuals, as well as in human insulin-producing EndoC- β H1 cells. Morphological (including confocal microscopy), ultrastructural (electron microscopy, EM), functional (glucose-stimulated insulin secretion), survival (EM and nuclear dyes) and molecular (qPCR gene expression) studies were performed under several different conditions. Expression of DPP-4 was demonstrated by immunohistochemistry and confocal microscopy, co-localizing with glucagon, and to a less extent also with insulin, in islet cell subsets. Immunogold labeling/EM analysis confirmed the presence of DPP-4 in alpha and beta cells. The proportion of DPP-4 positive alpha and beta cell were significantly lower in T2D samples. Accordingly, DPP-4 gene expression was markedly reduced in T2D islets. The use of a DPP-4 inhibitor protected EndoC- β H1 cells and primary non-diabetic human beta cells against cytokine-induced toxicity. DPP-4 inhibition also augmented glucose-stimulated insulin secretion, reduced apoptosis and improved ultrastructure in T2D beta cells. The present results demonstrate the presence of DPP-4 in human beta cells, with reduced expression in T2D islets, and show that DPP-4 inhibition has beneficial effects on human ND and T2D beta cells. This suggests that DPP-4 directly affects beta cell pathophysiology besides its role in incretin effects.

INTRODUZIONE

1 - Diabete Mellito

1.1 - Definizione

Il Diabete Mellito, DM, è un disordine metabolico, ad eziologia multipla, caratterizzato da iperglicemia cronica con alterazioni del metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine, conseguente ad un difetto di secrezione o di azione dell'insulina o ad entrambi (IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015). Quando il grado di iperglicemia è lieve, i sintomi associati al diabete possono non manifestarsi, tuttavia se la concentrazione di glucosio nel sangue supera la capacità dei reni di riassorbirlo completamente, il glucosio viene perso nelle urine (ricordiamo che il glucosio a livello del tubulo contorto prossimale del nefrone viene completamente riassorbito con un meccanismo di cotrasporto del sodio) provocando una forza osmotica tale da aumentare il volume di urina e la frequenza di escrezione (poliuria) (Blackman S M et al, 2013); la glicosuria conferisce alle urine un sapore dolciastro da cui il termine mellito.

Oltre a ciò, la carenza o la mancata azione di insulina nei tessuti periferici porta ad aumento della produzione di glucosio epatica (gluconeogenesi) con peggioramento dell'iperglicemia.

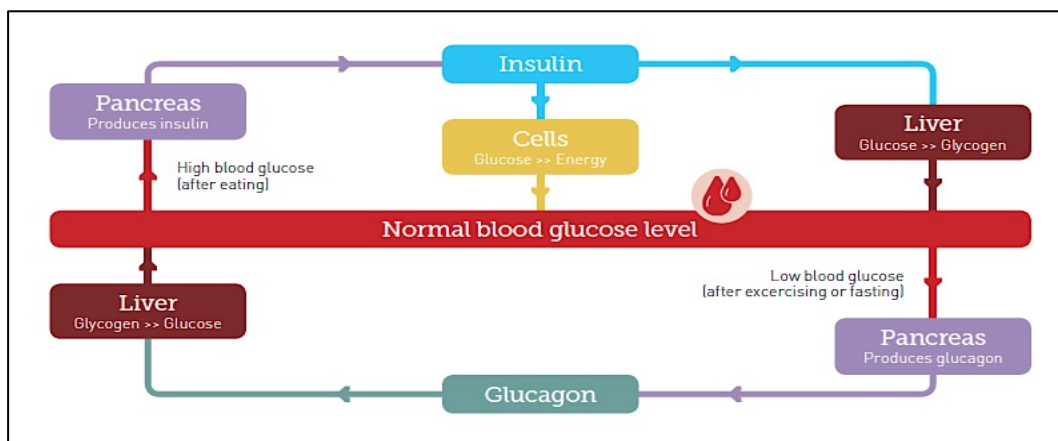


Figura 1: meccanismi che consentono il normale livello di glucosio nel sangue (IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015)

1.1.1 - Complicanze del diabete

Le complicanze del diabete sono spesso legate al compenso metabolico e si distinguono in acute e croniche (Blackman S M et al, 2013).

I quadri acuti tipici sono rappresentati dalle crisi ipoglicemiche, dalla chetoacidosi e dalla sindrome iperglicemica iperosmolare. Le crisi ipoglicemiche sono frequenti nel Diabete mellito di tipo 1 (DT1) come conseguenza alla somministrazione di dosi inadeguate di insulina rispetto al reale fabbisogno oppure a causa di un'attività fisica eccessiva; la condizione di chetoacidosi, è un fenomeno che si verifica quando il fegato in carenza di glucosio utilizza i lipidi per produrre i corpi chetonici, cioè acetone, acetoacetato e D- β -idrossibutirrato che in stati di ipoglicemia prolungata si accumulano quindi nel sangue. Mentre queste prime due complicanze si osservano principalmente nei pazienti con DT1, nelle persone affette da diabete mellito di tipo 2 (DT2) si può incorrere nel coma iperosmolare non chetoacido, una sindrome caratterizzata da iperglicemia, disidratazione estrema e iperosmolarità plasmatica, che provoca una compromissione dello stato di coscienza, accompagnata talora da convulsioni (Blackman S M et al, 2013).

Le complicanze croniche sono quelle che occorrono dopo molti anni dalla comparsa del diabete e comprendono malattie a carico dell'apparato cardiocircolatorio sia macrovascolari che microvascolari. Tra quest'ultime ricordiamo:

- la retinopatia diabetica caratterizzata da molteplici lesioni a carico della retina che hanno un quadro clinico molto differente tra loro. In genere un buon controllo della glicemia e della pressione sono una prevenzione primaria per questa complicanza;
- la nefropatia diabetica che culmina con l'insufficienza renale e quindi la perdita totale di funzionalità renale;
- la neuropatia diabetica che consiste in una compromissione neurologica che si manifesta in un soggetto affetto da malattia diabetica conclamata in assenza di altre cause palesi di neuropatia periferica.

Una delle complicanze macrovascolari associate al diabete è l'aterosclerosi, una forma di infiammazione cronica dovuta al deposito di materiale lipidico che con il passare del tempo, si accumula riducendo così il diametro del lume dei vasi di grande e medio calibro. Questa complicanza si verifica con una frequenza maggiore da 2 a 5 volte in giovani pazienti diabetici; più della metà dei pazienti con diabete di tipo 2 muoiono per malattie cardiovascolari. Non è ancora del tutto chiara la relazione tra diabete ed aterosclerosi, ma i fattori che ne sono implicati comprendono l'iperglicemia, acidi grassi liberi in eccesso ed

aumento di fattori pro-trombotici e pro-infiammatori. In più la presenza di altri fattori di rischio quali l'ipertensione, il fumo, e l'obesità non possono far altro che aumentare il rischio di eventi cardiovascolari come infarto del miocardio, ischemia cerebrale e periferica.

1.2 - Epidemiologia

Il diabete è una patologia in continuo aumento, tanto che l'IDF (International Diabetes Federation), definisce il diabete come un'emergenza mondiale.

Ad oggi si stima che nel mondo siano circa 415 milioni gli adulti affetti da diabete conclamato mentre circa 318 milioni sono gli adulti che hanno una tolleranza al glucosio compromessa, condizione quest'ultima che rappresenta uno dei fattori di rischio che potrebbe indurre diabete. Più dettagliatamente, l'IDF stima che nel 2040 il numero di persone affette da diabete con età compresa tra 20 e 79 anni, passerà dai 415 milioni stimati nel 2015 a 642 milioni.

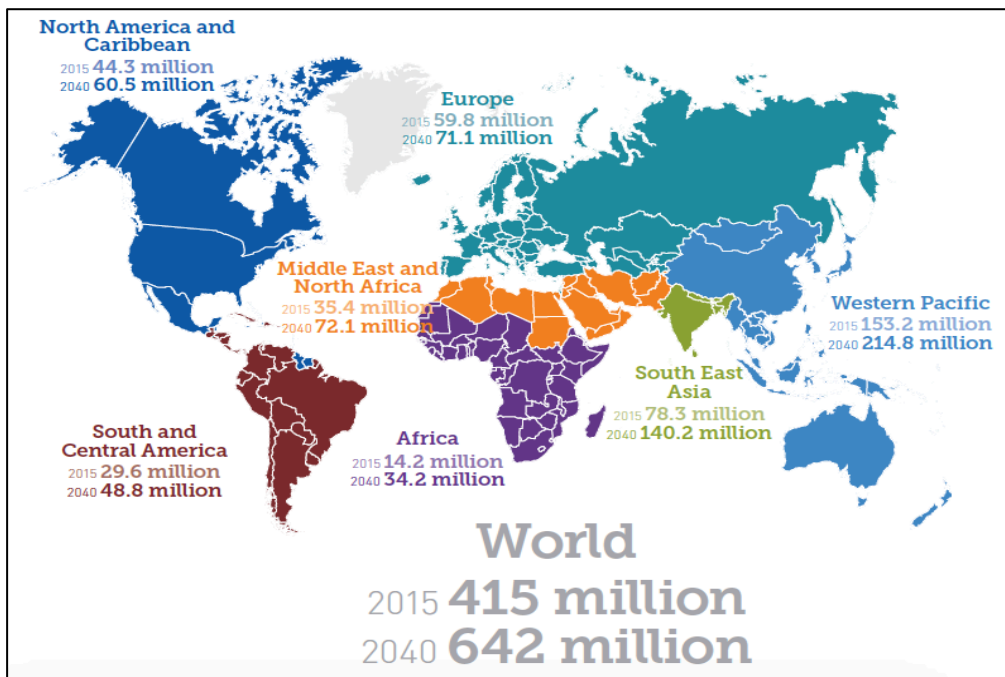


Figura 2: IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015

1.3 - Classificazione

L'American Diabetes Association (ADA) ha elaborato una classificazione delle varie forme di diabete, tra cui le principali sono:

- *Diabete di Tipo 1 (DT1)*: definito in passato come “diabete giovanile” a causa del suo esordio precoce, è una malattia autoimmune nella quale le cellule β delle isole pancreatiche vengono distrutte dalle CD4+ e CD8+, cellule T e infiltrazione dei macrofagi nelle isole pancreatiche. Le persone che ne sono affette sono trattate con insulina esogena per tutto il corso della loro vita. Si manifesta tra i 5-7 anni di età ed è caratterizzata dalla perdita di massa e funzionalità β -cellulare (Cabrera SM et al. 2015). È una forma di diabete molto complessa nella quale sono coinvolti aspetti genetici e fattori ambientali (ad esempio infezioni virali) descritta dallo studio condotto da Steck, A.K. and Rewers M.J. nel lavoro: “Genetics of type 1 diabetes (2011)”. Il maggior contributo per tale patologia è di natura genetica ed in particolare al locus dei geni HLA che codificano per le proteine sulla superficie delle cellule che sono responsabili per la regolazione del sistema immunitario nell'uomo. L'assenza di trattamento porta ad un rapido declino metabolico, chetoacidosi e nei casi più gravi anche alla morte.
- *Diabete Tipo 2 (DT2)*: è la forma più comune di diabete ed è tipica dell'età adulta, sebbene negli ultimi anni si sia verificato un aumento anche in età adolescenziale. È caratterizzata da insulino-resistenza e di conseguenza da elevata glicemia. Per il diabete di tipo 2 sarà dedicato un paragrafo a seguire.
- *Diabete gestazionale*: si manifesta durante la gravidanza, intorno alla 24^a settimana di gestazione. L'iperglicemia, diagnosticata per la prima volta in qualsiasi momento durante la gravidanza, è classificata come diabete mellito gestazionale se queste donne hanno i livelli di glucosio leggermente elevati, mentre si definisce diabete mellito in gravidanza se i livelli di glucosio nel sangue sono molto elevati (IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015). L'iperglicemia ed i sintomi ad essa associati, sono difficili da diagnosticare durante la gravidanza perché tendono ad essere sovrapponibili ai sintomi della gravidanza stessa, come ad esempio l'alta frequenza di urinazione. In molti casi il diabete gestazionale è semplicemente una condizione dovuta all'intolleranza al glucosio della quale non si era a conoscenza e che è stata diagnosticata grazie allo screening durante la gravidanza, oppure è un temporaneo sviluppo di diabete (sia di tipo 1 che di tipo 2) che la gravidanza ha accelerato e che comunque si sarebbe

manifestato in futuro. Nella maggior parte dei casi, il controllo glicemico torna alla normalità al termine della gravidanza. La gravidanza è caratterizzata da una riduzione alla sensibilità insulinica a causa di altri ormoni quali la prolattina, progesterone, cortisolo, ed ormone lattogeno-placentale che hanno un effetto antagonistico nei confronti dell'insulina (Blackman S M et al, 2013). Le donne alle quali è stata diagnosticata l'iperglicemia, hanno un rischio più alto di complicanze durante la gravidanza come ad esempio l'aumento della pressione sanguinea ed la macrosomia fetale. Quest'ultima si presenta quando il feto alla nascita ha un peso di circa 4 kg ed è associata ad un aumento della mortalità infantile perinatale, ma generalmente non è associata a problemi futuri per la salute del neonato.

Esistono infine altre forme di diabete che possono essere legate a terapie farmacologiche o difetti genetici.

1.4 - Diabete Mellito di tipo 2

Il Diabete Mellito di tipo 2 (DT2) è un complesso eterogeno di disordini metabolici caratterizzato da iperglicemia cronica come conseguenza della ridotta azione dell'insulina, oppure a causa di una sua ridotta secrezione da parte delle β cellule pancreatiche (D. Elbein et al. 2006).

1.4.1 - Eziologia

Le cause del diabete mellito di tipo 2 ancora non sono state del tutto chiarite, ma è possibile ricondurle ad aspetti sia genetici che ambientali, i quali insieme concorrono allo sviluppo di questo disordine metabolico. Il rischio di diabete varia considerevolmente tra le diverse popolazioni ed etnie, supportando così l'idea di una componente genetica per questa malattia. Tra i geni che ne sono coinvolti, ritroviamo quelli che fanno parte della cascata del segnale per il rilascio dell'insulina, quelli che codificano proteine importanti per la trasduzione del segnale dell'insulina sui tessuti bersaglio, oppure quelli coinvolti nel metabolismo glucidico. I fattori ambientali rivestono un ruolo primario nello sviluppo del diabete, tra questi ricordiamo l'obesità, la ridotta attività fisica, il fumo e un'alimentazione scorretta (Blackman S M et al, 2013).

1.4.2 - Patogenesi

Nel diabete mellito di tipo 2 sono due le principali alterazioni che si manifestano: l'insulino-resistenza e ridotta secrezione insulinica.

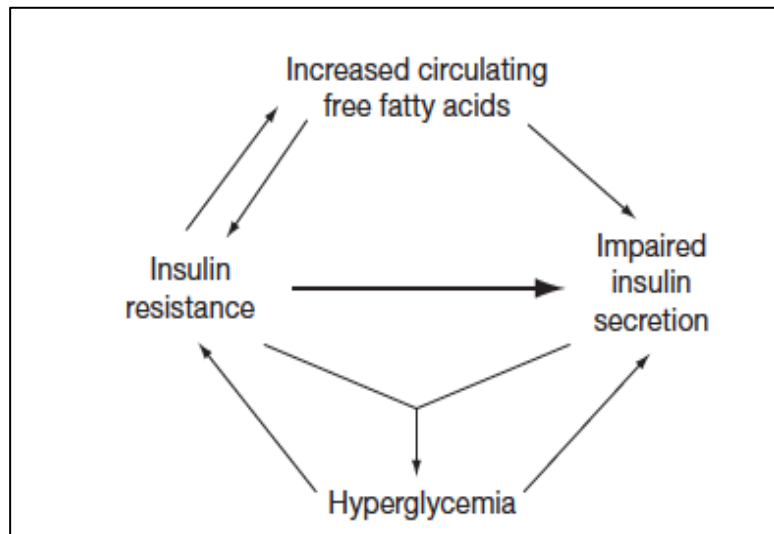


Figura 3: Fattori che contribuiscono all'insulino resistenza (Blackman S M et al, 2013)

Per *insulino-resistenza* si intende l'incapacità da parte delle cellule degli organi periferici di rispondere all'insulina, anche se questa viene prodotta nella giusta quantità; essa ha cause ormonali (alcuni ormoni come ad esempio il cortisolo e i glucocorticoidi sono antagonisti dell'insulina), cause genetiche (difetti del recettore dell'insulina) e cause farmacologiche (utilizzo di corticosteroidi e GH). Nelle fasi precoci della malattia, la condizione di insulino-resistenza viene compensata da una maggiore attività da parte delle cellule β che producono più insulina e aumentando la massa. Quando la situazione si aggrava, l'aumento della secrezione insulinica non basta per far fronte a questa situazione e si manifesta il diabete mellito di tipo 2.

L'insulino-resistenza può essere sia centrale (a livello epatico) che periferica (muscoli e tessuto adiposo) (Blackman S M et al, 2013); a livello epatico provoca un aumento del rilascio di glucosio (gluconeogenesi) per ovviare alla mancata captazione del glucosio circolante, mentre a livello periferico, i muscoli e tessuto adiposo riducono la glicogeno sintesi con conseguente aumento della glicolisi e della produzione di lattato che attraverso il circolo sanguigno raggiunge il fegato ed agisce come substrato per la gluconeogenesi. I meccanismi dell'insulino-resistenza restano tuttora poco chiari, sebbene sia stato osservato che alcuni dei fattori che contribuiscono a tale condizione sono gli acidi grassi circolanti ed altri fattori secreti dagli adipociti, come ad esempio le adipochine (Cefalu WT, 2001).

Quando la beta cellula non riesce più a compensare il fabbisogno di insulina si passa dal primo stadio definito come intolleranza al glucosio, con livelli di glicemia superiori alla media ma inferiori al limite della diagnosi, fino al diabete clinicamente diagnosticato con livelli di glicemia superiori a 126 mg/dl. Durante questo passaggio, l'insulina è comunque prodotta, ma non a livelli tali da mantenere la glicemia a livelli normali. Il deficit beta cellulare è indotto sia da una riduzione della funzionalità che da una riduzione della massa.

1.4.3 - Diagnosi di diabete mellito di tipo 2

Lo studio UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) che è il più ampio e prolungato studio clinico randomizzato, multicentrico, dedicato al diabete di tipo 2 condotto tra il 1977 e il 1997 (con un'appendice a 10 anni dalla fine dello studio, nel 2007) ha mostrato come in realtà alla diagnosi di diabete .si abbia già una riduzione della massa e della funzione beta cellulare.

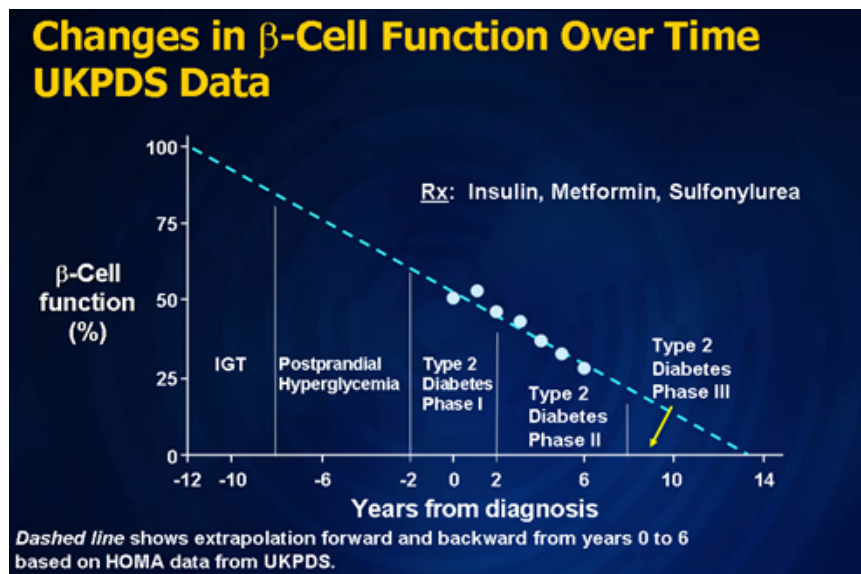


Figura 4: Grafico UKPDS (Lebovitz H, Diabetes Rev. 1999)

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 2006 ha stabilito le linee guida ed i criteri per la diagnosi del diabete così da distinguerlo dalle condizioni di IGT ed IFG. La diagnosi di diabete si fa allorquando si presenti glicemia a digiuno ≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dl) o un valore di glicemia in seguito ad ingestione di 75g di glucosio per via orale dopo due ore ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dl) o entrambe queste condizioni. Se si presentano contemporaneamente una glicemia a digiuno < 7.0 mmol/L (126 mg/dl) ed un valore di glicemia in seguito ad

ingestione di 75g di glucosio per via orale dopo due ore di 7.8-11.1 mmol/L (140 -200 mg/dl) si parla di IGT, mentre se si manifestano contemporaneamente un valore per la glicemia a digiuno di 6.1-6.9 mmol/L (110-125 mg/ dl), ed il valore della glicemia dopo 2 ore da ingestione orale di 75 g di glucosio sia < 7.8 mmol/L (140 mg/dl) si ha IGF (IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015).

2 - Il Pancreas

Il pancreas è una ghiandola annessa all'apparato gastrointestinale che produce e secerne enzimi digestivi che attraverso i dotti pancreatici che si riuniscono a formare il dotto pancreatico principale si riversano nella parte superiore del duodeno. Oltre a questa componente esocrina, nel pancreas è presente anche una componente endocrina che produce e secerne ormoni importanti per il controllo e bilancio del metabolismo energetico. Anatomicamente si suddivide in tre parti ovvero la testa (che è la parte più voluminosa), il corpo e la coda. Quando si fa riferimento al pancreas, spesso si fa la distinzione in:

- *Pancreas esocrino*: porzione del pancreas che produce gli enzimi preposti al processo digestivo e che vengono riversati nel duodeno. Esso comprende gli acini pancreatici, ed i dotti. La parte esocrina occupa circa il 95% della massa pancreaticata totale.
- *Pancreas endocrino*: comprende le cosiddette isole pancreatiche o isole di Langerhans che producono e secernano insulina, glucagone, somatostatina ed il polipeptide pancreatico (PP). Le isole pancreatiche occupano circa l'1-2% della massa pancreaticata.

2.1 - Isola pancreaticata

Le isole pancreatiche nell'uomo hanno tra di loro grandezza diversa con un diametro che va da 50 a 250 μm ; le isole più piccole sono disperse nel tessuto acinare, mentre quelle di diametro maggiore si trovano nelle vicinanze dei dotti interlobulari del pancreas. L'isola pancreaticata è un ottimo modello di studio in quanto rappresenta una struttura endocrina indipendente (Hellman, B, 1959). La maggior concentrazione di isole pancreatiche si trova a livello della coda, mentre non c'è molta differenza tra la concentrazione di isole presenti nella testa e nel corpo (Rahier J et al, 2008). L'analisi immunoistochimica di sezioni di pancreas mostra come l'isola pancreaticata contenga 4 tipi di cellule diverse:

- cellule che producono glucagone
- cellule che producono insulina
- cellule che producono somatostatina
- cellule PP che producono il polipeptide pancreatico (PP).

A livello ultrastrutturale, le diverse tipologie cellulari si possono primariamente distinguere in base ai granuli presenti al loro interno; più in dettaglio i granuli delle cellule beta mostrano un core denso circondato da un alone bianco e sono leggermente più piccoli rispetto ai granuli delle cellule alfa.

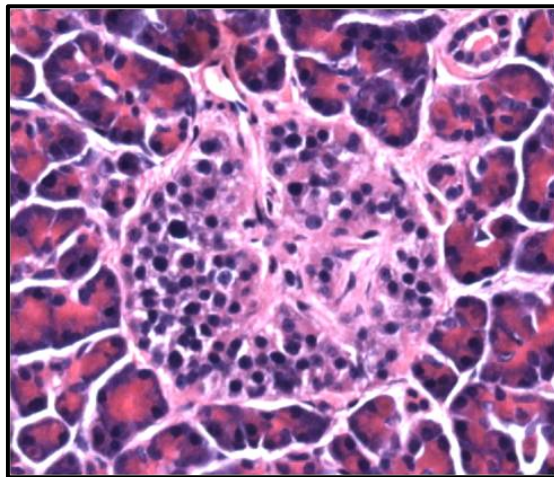


Figura 5: Sezione di tessuto di isola pancreatica umana colorata con ematossilina eosina (Lab. Prof. Marchetti)

2.2 - Massa beta cellulare

La principale funzione delle cellule β presenti nelle isole di Langerhans è quella di produrre insulina, ormone preposto, come detto precedentemente, a mantenere i livelli ematici di glucosio alla concentrazione di 65-110 mg/dl.

I principali meccanismi che regolano la massa beta cellulare sono l'apoptosi (una particolare forma di morte cellulare programmata), la replicazione (cioè la mitosi di cellule beta preesistenti) e la neogenesi (cioè la formazione di nuove beta-cellule da precursori) e possono variare con la specie, l'età e lo stato metabolico nonché patologico. Nei primi anni di vita, la massa beta cellulare aumenta grazie alla replicazione e neogenesi, per poi raggiungere una sorta di equilibrio che viene mantenuto per tutta la vita. In alcune condizioni, la massa beta cellulare può modificarsi per adattarsi a nuove condizioni di richiesta metabolica; per esempio in gravidanza, la massa beta cellulare raddoppia per via degli effetti degli ormoni e

delle nuove esigenze metaboliche del corpo materno; questo effetto è mediato principalmente dalla prolattina e dall'ormone lattogeno placentare ed è pertanto temporaneo, infatti dopo il parto la massa beta cellulare ritorna a valori pre-parto.

2.2.1 - Funzione beta cellulare

In condizioni normali, l'insulina viene rilasciata dalle cellule β pancreatiche in risposta alla concentrazione di glucosio ematico, definito come il principale fattore fisiologico atto a tale funzione; oltre al glucosio anche altri fattori come nutrienti, ormoni, e neurotrasmettitori sono in grado di modificare la secrezione insulinica.

Una volta entrato nella cellula per mezzo di trasportatori (GLUT2 e GLUT1), il glucosio viene rapidamente fosforilato da glucochinasi (esochinasi IV) ed avviato alla via glicolitica.

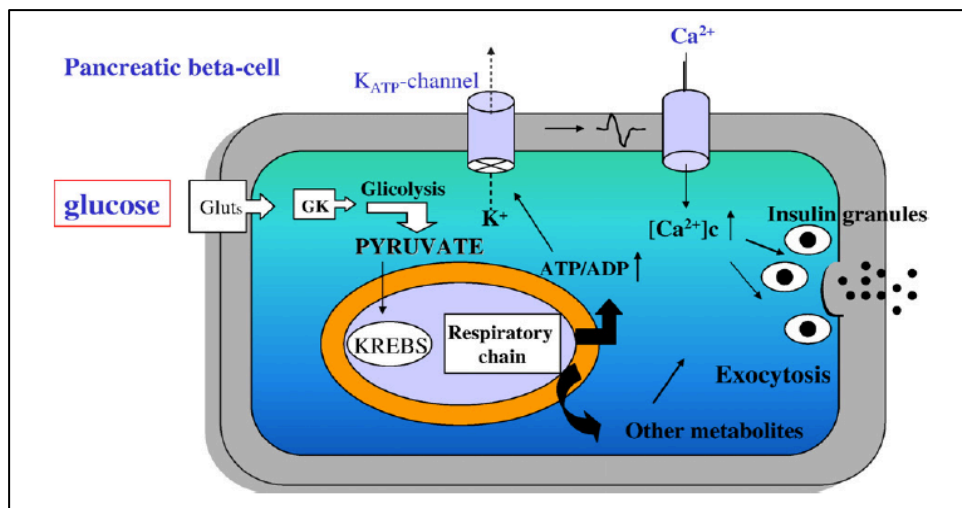


Figura 6: Meccanismo di secrezione insulinica nella β cellula pancreatica (Marchetti P, 2008)

La molecola di piruvato che viene prodotta al termine della glicolisi entrerà quindi nel mitocondrio e parteciperà al ciclo di Krebs portando alla produzione di ATP. All'aumento della concentrazione di glucosio ematico, e quindi intracellulare, si avrà quindi uno shift nel rapporto ATP/ADP in grado di determinare la chiusura a livello della membrana plasmatica dei canali del K⁺-ATP-dipendenti cui consegue depolarizzazione ed apertura dei canali del Ca²⁺-voltage-dipendenti attraverso i quali il Ca²⁺ entra nella cellula e provoca l'esocitosi delle vescicole contenenti insulina. Il rilascio insulinico è oscillatorio e sottoposto ad amplificazione (Marchetti P, et al 2008; Marchetti P, et al 1994).

Nel DT2 si osserva una alterazione quali- e quantitativa del rilascio insulinico; i deficit qualitativi sono quelli che si manifestano maggiormente e comprendono alterazione dei pulse

di rilascio insulinico e secrezione di proinsulina. In individui normali, i pulse avvengono ogni 8-10 minuti e tendono ad essere sempre più amplificati, mentre nei soggetti con DT2 questi risultano incontrollati (Marchetti P, et al, 2008).

3 - Le Incretine

3.1 - Cenni storici

Il concetto di “incretine”, ovvero di ormoni intestinali in grado di stimolare la secrezione di insulina, nasce dalla osservazione che una determinata quantità di glucosio ingerita per via orale produce una risposta insulinemica sicuramente superiore a quella indotta dalla stessa quantità di glucosio somministrata per via endovenosa (Nauck M et al, 1986) suggerendo, quindi, la partecipazione di un “fattore intestinale” potenziante la secrezione insulinica. Alcuni autori proposero che, in risposta all’ingestione di glucosio, il digiuno rilasciava alcune sostanze umorali le quali, insieme al glucosio, contribuivano a favorire la secrezione di insulina, così introducendo il concetto di “asse entero-insulare”. All’inizio degli anni ’80 fu scoperto il GLP-1 (glucagon-like peptide 1) come un prodotto del gene del pro-glucagone. Tale gene fu clonato da due diversi gruppi di ricerca e si notò che, a valle della sequenza del glucagone, erano presenti due sequenze nucleotidiche molto simili tra loro che vennero chiamate GLP-1 e GLP-2 proprio per la loro somiglianza con la sequenza del glucagone. Tali sequenze potevano essere clivate dalla sequenza originaria del pro-glucagone nelle cellule L del digiuno (secretrici di quello che una volta veniva definito “gut-glucagon”). Successivamente emerse che una forma troncata del GLP-1 (la sequenza 7-37) aveva un potente effetto insulino-stimolante (Mojsov S, 1987). Oltre al GLP-1 vi sono altre molecole che mostrano diversi effetti soprattutto a livello gastrico e del SNC; queste sono:

- Secretina
- GIP
- VIP
- PACAP
- Glucagone
- Peptidi-glucagon-like: GIP, GLP-1, GLP-2, glicentina, oxintomodulina.

3.2 - Effetto incretinico e biologia degli ormoni incretinici

Come già accennato, quando si parla di effetto incretinico si fa riferimento all'osservazione di una risposta insulinica maggiore se il glucosio è stato introdotto per via orale rispetto a quando la stessa quantità di glucosio viene introdotta per via endovenosa. Più del 70% della risposta insulinica dopo introduzione di glucosio può essere causata dall'effetto delle incretine, o in generale dagli ormoni intestinali che mediano questa risposta insulinotropica.

Il primo ormone ad effetto incretinico ad essere stato scoperto è il GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide) che è un potente stimolatore della secrezione insulinica glucosio-dipendente; tuttavia, inibendo la sua azione, l'effetto incretinico persiste e questo sta a significare che vi sono altre molecole ad avere questa attività (Ebert et al., 1983); studi successivi hanno portato alla scoperta dell'altro ormone ad effetto incretinico, il GLP-1 (Glucagon-like peptide-1).

Il **GIP** è un peptide composto da 42 amminoacidi prodotto dalle cellule K del duodeno nel piccolo intestino prossimale. È anche localizzato nel sistema nervoso centrale dove gioca un ruolo importante nella sopravvivenza cellulare (Nyberg et al., 2005). Il principale stimolo per la produzione del GIP è la presenza di nutrienti, infatti i suoi livelli ematici tendono ad aumentare pochi minuti dopo l'ingestione di alimenti.

Il **GLP-1** è un peptide la cui porzione carbossiterminale ha una sequenza nucleotidica simile a quella del glucagone, in quanto entrambi derivano dal gene che codifica per il pro-glucagone; in seguito a clivaggio di tale prodotto genico vengono prodotte diverse molecole tra cui il GLP-1. In studi preclinici condotti nell'uomo esso mostra potenti effetti nella stimolazione insulinica glucosio-dipendente (Drucker et al., 1987; Kreyman et al., 1987). Il GLP-1 viene prodotto dagli enterociti ad attività endocrina (cellule L) nella parte distale del piccolo intestino e del colon, ed i suoi livelli aumentano nel giro di pochi minuti dall'introduzione di alimenti, probabilmente a causa di fattori neuronali o endocrini rilasciati in seguito al contatto dei nutrienti con le cellule L dell'intestino. Ulteriori approfondimenti relativi a tale ormone incretinico saranno discussi nel successivo paragrafo.

3.3 - Il GLP-1

Il GLP-1 è codificato dal gene del proglucagone presente nel braccio lungo del cromosoma 2 ed è maggiormente espresso nelle cellule α del pancreas, cellule L dell'intestino e nella parte caudale del tronco cerebrale. Questo gene codifica per due peptidi che hanno circa il 50% di omologia strutturale con il glucagone e sono il *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) e *glucagon-like peptide-2* (GLP-2), ed è stato riconosciuto che solo il GLP-1 ha attività insulinotropica.

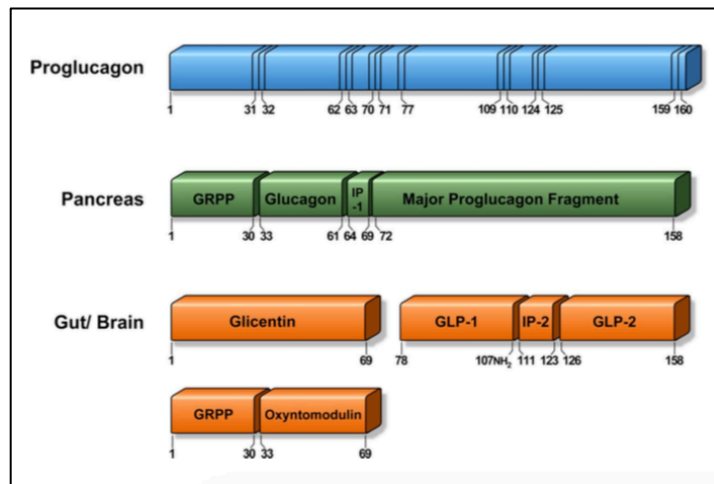


Figura 7: Processamento del proglucagone ad opera di PC2 e PC1/3 (Holst JJ-Physiologica I reviews 2007, 87(4):1409--1439.)

Una volta che il gene del proglucagone viene trascritto, l'mRNA del gene del pro-glucagone è tradotto in un peptide di 180 amminoacidi che va incontro a tagli proteolitici tessuto specifici per ottenere di conseguenza molecole peptidiche specifiche nel pancreas, intestino e cervello. (Kreymann B et al, 1987); nelle cellule L dell'intestino il gene del proglucagone (e quindi il GLP-1) viene up-regolato in risposta all'ingestione di nutrienti; al contrario, nel pancreas, questo viene up-regolato in presenza di condizioni di digiuno ed iperglicemia, e down-regolato dall'insulina (Kreymann B, et al 1987).

Gli enzimi coinvolti in questi tagli specifici sono le pro-ormone convertasi (PC); sebbene ne siano state identificate più forme, solo la PC1/3 e la PC2 sembrano essere importanti per il taglio enzimatico del pro-glucagone. PC2 è l'enzima che nelle α cellule pancreatiche permette la produzione del glucagone, mentre PC1/3 è l'enzima che porta alla produzione di GLP-1 nelle cellule L intestinali e nel cervello (Baggio L.L et al, 2007).

In vivo sono secrete molteplici forme di GLP-1, tra cui GLP-1(1-37) e GLP-1(1-36)NH₂, che risultano biologicamente inattive, e GLP-1(7-37) e GLP-1(7-36)NH₂ che invece sono le forme biologicamente attive; sono prodotte dalla PC1/3 a partire dal precursore e sono equipotenti nello stimolare la secrezione insulinica. Inoltre, l'enzima peptidil-glicina α -amidasi monoossigenasi (Wettergren A et al. Regul Pept. 1998) può in alcuni casi, aggiungere un gruppo NH₂ al GLP-1 così da favorire la sua sopravvivenza nel plasma (Orskov C, et al 1993). Nell'uomo, la forma circolante di GLP-1 maggiormente presente è GLP-1(7-36)NH₂.

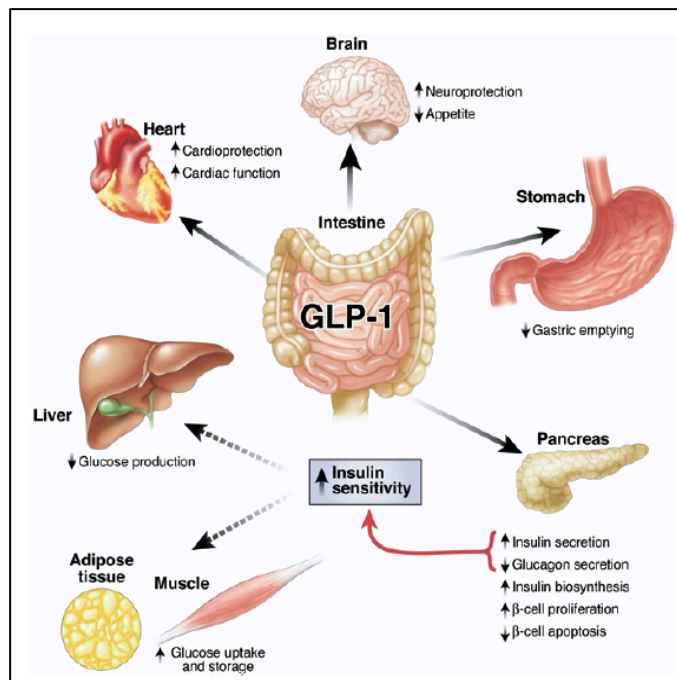


Figura 8: Effetto pleiotropico del GLP-1 (Baggio L.L et al, 2007)

Alcuni autori hanno mostrato come la forma GLP-1(7-36)NH₂ (forma più attiva) aumenti all'aumentare della concentrazioni plasmatiche di glucosio; questa forma può poi essere clivata per formare GLP-1(9-36)NH₂ anch'essa in grado di stimolare il rilascio di insulina (D. Elahi et al. 2008).

Il GLP-1 ha molteplici effetti su diversi organi e tessuti (Formoso G, Consoli A, 2006) in particolare:

- Stimola la secrezione di insulina in maniera glucosio dipendente;
- Inibisce la secrezione di glucagone e favorisce la secrezione di somatostatina;
- Ritarda lo svuotamento gastrico;
- Ha effetto anoressizzante;
- Esercita un'azione di protezione sulla massa β cellulare pancreatica.

In precedenza è stato detto che il GLP-1 è prodotto dalle cellule L del piccolo intestino, ma vi sono degli studi che dimostrano come le stesse isole pancreatiche umane siano in grado di produrre GLP-1 (Ellingsgaard H, 2011; P. Marchetti et al, 2012). Nello specifico è stato osservato come questo venga prodotto dalle α cellule pancreatiche alcune delle quali risultano positive all'enzima PC1/3 (la convertasi che forma il GLP-1 dal proglucagone).

3.3.1 - Regolazione del rilascio del GLP-1 dalle cellule L

Le cellule L dell'intestino poste nel tratto prossimale, sono quelle maggiormente deputate al rilascio di incretine, mentre quelle del tratto distale sono preposte all'invio di segnali vagali per la regolazione dello svuotamento gastrico. Le cellule L deputate al rilascio principalmente di GLP-1 sono "sensibili" al passaggio/presenza di nutrienti grazie alle estroflessioni presenti sulla membrana plasmatica. Questa caratteristica è stata osservata grazie a studi su linee cellulari: le GLUTag, le STC-1 di origine murina e NCI-H716 di origine umana.

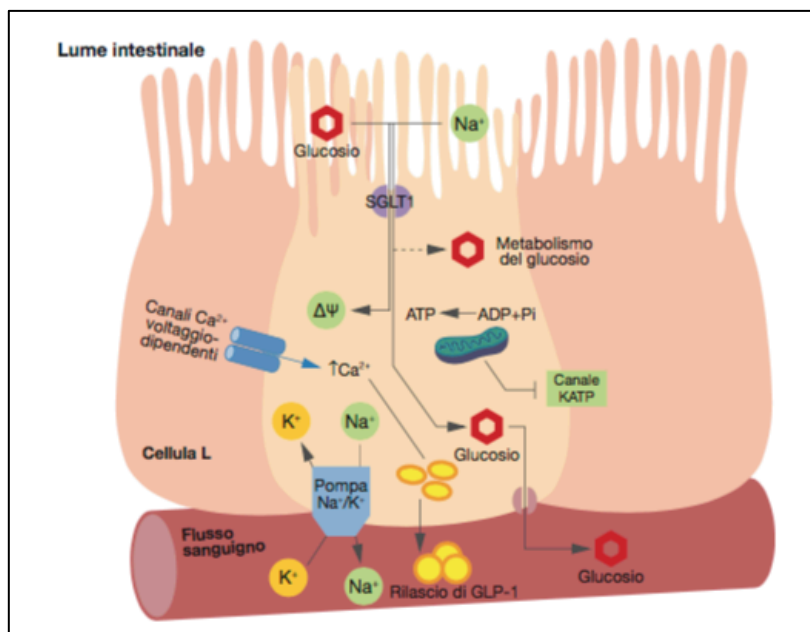


Figura 9: La L cellula intestinale ed i sistemi glucosensori (Piro et al. La L cellula intestinale come target di terapia - Il Diabete. vol.24 n.1 2012)

Il meccanismo con il quale il glucosio possa avviare un segnale intracellulare per permettere il rilascio di GLP-1 non è ancora del tutto chiaro, ma grazie a degli studi preliminari sulla linea cellulare GLUTag, è possibile che il glucosio provochi depolarizzazione della membrana, con successiva secrezione di GLP-1 mediante l'azione elettrogenica del trasportatore sodio-glucosio SGLT (sodium glucose-linked transporter)-1 che usa il gradiente del sodio per

assorbire glucosio (Gribble FM et al, 2003). L'aumento del sodio intracellulare risulta capace di generare una corrente interna sufficiente a provocare una depolarizzazione della membrana, con successivo rilascio dell'ormone. Se si usa florizina, noto inibitore dell'assorbimento del glucosio, la secrezione di GLP-1 è bloccata anche in presenza di sodio nel comparto luminale, pertanto questo co-trasportatore risulta necessario per il rilascio di GLP-1.

Un altro possibile meccanismo attraverso cui viene rilasciato GLP-1 è l'attivazione dei canali del Ca^{2+} -voltage-dipendenti che aumentano la concentrazione di calcio e quindi la depolarizzazione della membrana. Alcuni studi hanno invece evidenziato come sulle cellule L siano presenti i canali il potassio ATP-sensibili (K^+ -ATP), gli stessi canali che a livello delle β cellule regolano il rilascio di insulina. Purtroppo il ruolo di tali canali nella secrezione di GLP-1 in vivo rimane ancora controverso; forse l'enzima glucochinasi (GCK) riveste un ruolo importante in tal senso in quanto potrebbe regolare l'apertura/chiusura dei canali del K^+ , e quindi di conseguenza la secrezione insulinica, ma pazienti con pazienti portatori di mutazioni inattivanti della GCK non esibivano minori livelli di GLP-1 dopo ingestione di glucosio, quindi la GSK ed i canali del K^+ ATP-dipendenti non sembrerebbero avere un ruolo così determinante nella secrezione di GLP-1 (Piro et al, 2012).

3.3.2 - Recettore e trasduzione del segnale del GLP-1

Le risposte fisiologiche che sono attribuibili al GLP-1, si verificano grazie al legame con il suo recettore specifico chiamato GLP-1 receptor (GLP-1R). Nell'uomo questo recettore possiede 463 amminoacidi che formano 7 segmenti transmembrana ed è accoppiato ad una proteina G (GPCR) che in questo caso utilizza il meccanismo del secondo messaggero.

Questo recettore è espresso nelle isole pancreatiche, reni, polmoni, cuore, ed in molte regioni del sistema nervoso centrale e periferico. Nello specifico delle isole pancreatiche, il GLP-1R è espresso in maniera predominante nelle cellule β , anche se alcuni studi dimostrano che sia presente anche nelle cellule δ ed α . Essendo un recettore accoppiato a proteine G, la sua attivazione per mezzo del ligando stimola l'adenilato ciclasi che aumenta i livelli di cAMP il quale va ad attivare la proteina chinasi A (PKA) e le proteine di scambio direttamente attivate dal cAMP (EPAC). Nelle β cellule, il GLP-1 induce la chiusura dei canali del K^+ -ATP dipendenti per mezzo della loro fosforilazione da parte della PKA, e questo si traduce con una depolarizzazione della membrana ed un aumento del calcio intracellulare grazie all'apertura dei canali del Ca^{2+} , sempre per mezzo del pathway della PKA, ed alla mobilizzazione, grazie all'attivazione del pathway EPAC, del calcio intracellulare ivi stoccato (M.M.J Combettes,

2006). Oltre a ciò, il GLP-1 non solo regola l'espressione del gene dell'insulina, ma anche l'espressione di altri geni implicati nella secrezione insulinica, come la glucochinasi ed il GLUT2. Questo effetto è mediato dall'incremento dell'espressione e dell'attività dell'homeobox-1 pancreatico duodenale (PDX1) che è dipendente da cAMP/PKA (X. Wang et al, 2001). L'effetto anti-apoptotico mediato dal GLP-1 sulle cellule β è determinato dall'attivazione dell'inositolo trifosfato (PI3K) e dell'cAMP. Questi due pathway sono complementari, infatti inibendo entrambe le vie si assiste ad un grosso grado di morte cellulare che risulta maggiore rispetto a quando si va ad inibire una sola di queste due vie. PI3K va ad agire ed ad attivare le mitogeno chinasi (MAPKs) ed altre chinasi che sono interessate nella regolazione della proliferazione cellulare e nell'effetto trofico di colture neurali. Ancora, nel pancreas, l'attivazione di ERK e MAPK porta a differenziazione delle β cellule, mentre la stimolazione di PKB protegge le β cellule dall'apoptosi dovuta al glucosio od acidi grassi liberi (gluco-lipotossicità).

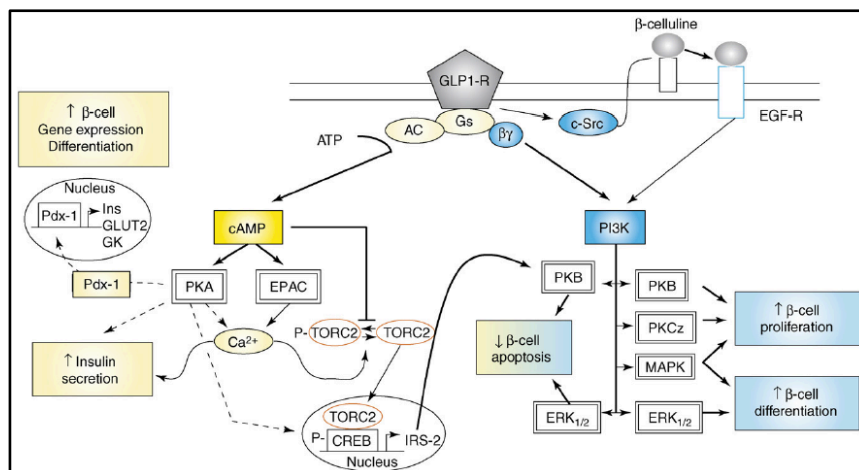


Figura 10: Trasduzione del segnale del GLP-1R (Combettes M.M.J., 2006)

3.4 - Controllo dell'attività delle incretine: la DPP-4

Sebbene tutte le caratteristiche discusse fino ad ora del GLP-1 facciano ipotizzare un suo impiego in clinica, questo non avviene a causa delle sue caratteristiche farmacocinetiche: il tempo di emivita del GLP-1 infatti è compreso tra 1,5 - 2,1 minuti sia per la rapida eliminazione renale, che a causa della sua rapida inattivazione ad opera della dipeptidil peptidasi-4. La Dipeptidil-peptidasi 4 (DPP-4), conosciuta anche come CD26, è una glicoproteina transmembrana di tipo 2 di 110 kDa e si trova sia in forma libera e quindi rilasciata nel circolo sanguineo, sia ancorata alla membrana. Nello specifico si tratta di un'esopeptidasi che cliva selettivamente l'estremità N-terminale di vari substrati, come ad

esempio citochine, fattori di crescita, neuropeptidi, ed anche incretine (D. Röhrborn et al, 2015). È altamente espressa sulla superficie di diverse tipologie cellulari, come: cellule T, cellule B, macrofagi, cellule staminali ematopoietiche e progenitori, cellule epiteliali ed endoteliali, nel rene, fegato, milza, pancreas ed intestino (M.D. Gorrell et al, 2005). Oltre alla DPP-4 vi sono altre molecole con struttura omologa, ma non necessariamente con la stessa attività enzimatica; tra queste ritroviamo la DPP-8 e la DPP-9, localizzate nel citoplasma, la DPP-7 che si trova all'interno di vescicole intracellulari, e la Fibroblast activation protein, alpha (FAP α) che è strettamente correlata con la DPP-4 con cui condivide circa il 50% di aminoacidi nella struttura.

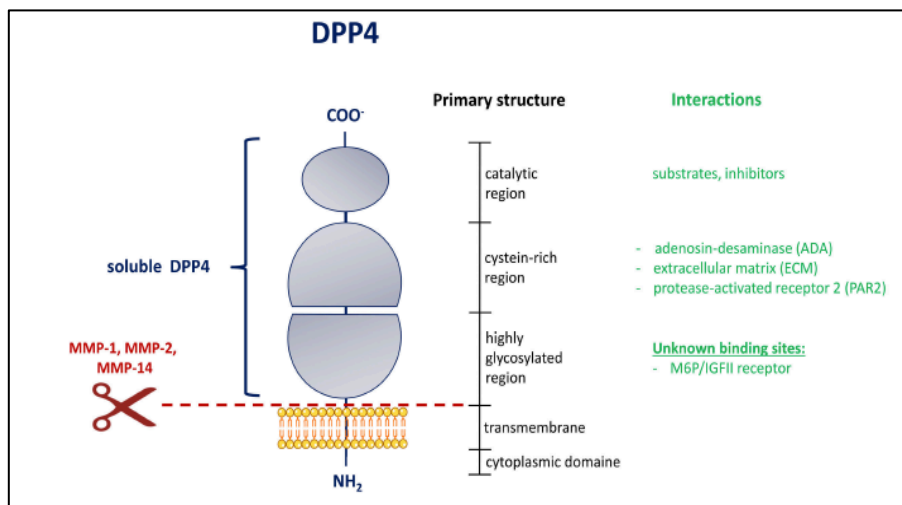


Figura 11: Domini strutturali della DPP-4 (D. Röhrborn et al, 2015)

Nell'uomo, il gene che codifica per questa dipeptidil-peptidasi si trova sul cromosoma 2 ed è formato da 26 esoni (Lambeir AM, 2003); la sua espressione e la sua attività sono aumentate da diversi fattori come l'interferone α , β e γ , mentre l'interleuchina 12 (IL-12), importante per la differenziazione dei linfociti T naive ne riduce l'espressione. In maniera simile, il TNF α è in grado di diminuire l'espressione della forma presente sulla superficie cellulare, ma aumentando la concentrazione della forma solubile.

La DPP-4, nella sua struttura primaria ed ancorata alla membrana, ha l'estremità COOH volta verso la porzione extracellulare, e l'estremità NH₂ nella porzione intracellulare ed è composta da una regione catalitica, una regione ricca in cisteine ed una regione altamente glicosilata che risulta importante nel regolare il traffico e la posizione che essa occupa sulla membrana plasmatica oltre ad essere essenziale per la sua attività; oltre a queste, vi sono poi la porzione transmembrana idrofobica ed il dominio citoplasmatico. In questa forma ancorata alla membrana, l'interazione col ligando specifico (come ad esempio FAP, o la stessa DPP-4)

avvia un pathway di trasduzione del segnale che è indipendente dalla sua attività di peptidasi. Nella sua forma ancora alla membrana, la DPP-4 può legare diverse molecole; la più studiata è l'ADA (adenosin-deaminasi) che legandosi alla DPP-4 provoca la degradazione delle proteine della matrice e l'attivazione di metalloproteasi, facendo pensare che questo legame sia coinvolto nel rimodellamento tissutale (MD Gorrell, 2005). A livello delle cellule dendritiche questa interazione potenzia il processo infiammatorio che si osserva in condizioni di obesità per mezzo della proliferazione T-cellulare; questo effetto può essere inibito dalla somministrazione esogena di DPP-4 solubile, ma non inibendo la sua attività enzimatica (D. Röhrborn et al, 2015). Altre interazioni sono con la Caveolina-1 presente nelle cellule APC e con le proteine del collagene e fibronectina.

Per mezzo delle metalloproteasi MMP-1, MMP-2 ed MMP-14, viene effettuato un taglio proteolitico a ridosso della porzione transmembrana così da formare la forma circolante (solubile) della DPP-4, che negli ultimi anni è stata identificata come una nuova adipochina correlata con alcuni parametri della sindrome metabolica ed oggi è usata come biomarker per questo tipo di sindrome risulta molto espressa negli adipociti primari umani, e tende ad aumentare nelle persone obese. In particolare, in vitro, il tessuto adiposo rilascia proprio questa forma solubile, e lo fa in maggior quantità quando c'è la differenziazione del tessuto in questione, mentre in vivo si osserva che i pazienti obesi hanno un rilascio maggiore di DPP-4 solubile in circolo. I livelli sierologici di questa forma tendono ad aumentare anche in altre condizioni patologiche, come i tumori, epatite C ed asma (OJ. Cordero et al, 2009), ed il suo principale effetto è quello di impedire il segnale insulinico nel tessuto adiposo agendo su Akt, forse grazie anche alle sue proprietà enzimatiche.

Abbiamo finora elencato alcune delle funzioni della DPP-4, ma quella che in questo studio di tesi risulta più interessante, è il controllo che essa ha sugli ormoni incretinici ed in particolare su GIP e GLP-1. La DPP4 si trova anche nelle cellule endoteliali che fanno parte della tonaca intima dei vasi sanguinei, e quindi anche di quei vasi che irrorano la mucosa dell'intestino nei pressi delle cellule che producono il GLP-1, ecco perché l'emivita del GLP-1 e del GIP è di circa 2 minuti proprio a causa del clivaggio da parte di questo enzima che provoca un taglio nella porzione N-terminale dei peptidi: in particolare sappiamo che per il GLP-1 esso provoca un taglio a carico del penultimo residuo di alanina (posizione 2) metabolizzando quest'ultimo nella forma inattiva GLP-1(9-36)NH₂ e GLP-1(9-37)NH₂. Di conseguenza, più del 50% del GLP-1 prodotto che entra nel circolo portale, viene subito inattivata dalla DPP-4 prima di poter raggiungere il circolo sistemico (Hansen L. et al, 1999). Nella patologia diabetica si osserva un aumento dei livelli sierologici di DPP-4 (la forma solubile ed anche la sua attività,

e questo potrebbe essere correlato con la quantità di glucosio presente che può essere un regolatore sull'attività di questo enzima (N-H. Kim et al 2014).

La DPP-4 è ubiquitariamente espressa nell'organismo, e per quello che interessa questo elaborato, vi sono numerosi studi che ne ipotizzano la presenza nelle isole pancreatiche umane, in particolare nelle α cellule (L. Liu et al, 2014; P. Augstein et al, 2015) e nei dotti (P. Augstein et al, 2015).

Tenendo conto di quanto appena descritto per tale enzima, risulta logico pensare come sia uno dei target principali per il trattamento farmacologico nel DT2, ed ad oggi, sono molte le molecole che hanno un effetto inibitorio sulla sua attività.

4 - Diabete e terapie farmacologiche

Le terapie per il diabete di tipo 2 sono volte al mantenimento del controllo glicemico per evitare o ridurre il rischio di complicanze micro e macrovascolari anche a lungo termine e quelle attualmente disponibili sono la dieta, l'uso di insulina e la terapia farmacologica con l'uso di un farmaco, o per mezzo della combinazione di più farmaci. La maggior parte dei pazienti diabetici sono trattati con insulina per ovviare alla carenza endogena relativa od assoluta di quest'ultima, infatti per le persone affette da DT1, la somministrazione di insulina esogena risulta essere l'unica cura al momento.

Per quanto riguarda il DT2, vi sono condizioni nelle quali l'unica terapia è l'uso di insulina esogena, mentre in altri casi, un buon trattamento farmacologico riesce a tenere sotto controllo la glicemia del paziente. Alcuni farmaci che vengono usati sono la Metformina, che nei pazienti con DT2 aumenta la sensibilità all'insulina, il GLP-1, e quindi in generale le incretine ed i suoi analoghi, ed anche gli inibitori della DPP-4.

La terapia con gli inibitori della DPP-4 non sembra avere grossi effetti collaterali e consiste nell'assunzione di una singola compressa del farmaco, invece per gli analoghi del GLP-1 è necessaria una puntura sottocutanea almeno 2 volte al giorno, ma consentono di raggiungere livelli di GLP-1 molto elevati. Questi analoghi del GLP-1 solitamente vengono raccomandati a persone obese o in sovrappeso, ed oggi sono disponibili anche in formulazioni a rilascio prolungato, con le quali è necessaria una sola iniezione ogni 15-30 giorni.

4.1 - GLP-1 ed analoghi farmacologici

La terapia con GLP-1 “nativo” è abbastanza tollerata dai pazienti e consiste nella somministrazione sottocutanea del peptide tre volte al giorno e prima dei pasti. Con tale terapia sono ridotti i livelli di acidi grassi liberi, aumentata sensibilità all’insulina e una riduzione del peso corporeo (Zander et al, 2002). La somministrazione sottocutanea continua di GLP-1 (4,8 pmol/kg/min) con una pompa per infusione fatta in 10 soggetti con DT2, ha mostrato inibizione dello svuotamento gastrico, riduzione degli acidi grassi liberi, miglioramento della glicemia post prandiale e dei valori di emoglobina glicata (HbA1c). Tra le controindicazioni vi sono episodi di nausea (Meneilly GS, et al 2001).

Il GLP-1 nativo ha però la proprietà di essere facilmente degradato, caratteristica che invece non possiedono i suoi analoghi, tra cui l’Exendina-4 che è un peptide di 39 amminoacidi originariamente isolato dalla saliva di *Heloderma suspectum* (o Mostro di Gila). La sua sequenza amminoacidica ha circa il 53% di omologia con il GLP-1 nativo ed è un potente agonista del GLP-1R (recettore del GLP-1) (Eng J, et al 1992). Il fatto che l’Exendina-4 abbia una glicina in posizione 2, non la rende un substrato per l’attività catalitica della DPP-4, e di conseguenza ha un’emivita maggiore rispetto al GLP-1 nativo. Tra le proprietà di questo analogo vi è la capacità di abbassare i livelli di glucosio in studi preclinici, ed è da 10 a 100 volte più potente dell’attività in vivo del GLP-1 nativo (Young AA, et al 1999).

Nel 2005, la US Food and Drug Administration ha approvato il primo farmaco incretino-mimetico, l’exenatide (forma sintetica dell’Exendina-4) ligando del GLP-1R e resistente all’azione della DPP-4. Il trattamento con essa riduce significativamente i livelli di HbA1c e migliora i parametri di funzionalità β cellulare, oltre a ridurre la glicemia postprandiale con ridotti effetti collaterali (Fineman MS, et al 2003).

Altro esempio di farmaco che è un analogo del GLP-1 umano è la Liraglutide che in terapia viene usato in combinazione con altri farmaci, tra cui la Metformina.

4.2 - Inibitori della DPP-4

Questa nuova classe di farmaci con attività inibitoria nei confronti della DPP-4, ha come effetto principale l'aumento dei livelli di GLP-1, ma non per tutte le molecole appartenenti a queste classi i trial clinici sono stati completati. Il trattamento con inibitori della DPP-4 migliora la tolleranza glucidica in modelli di ratti obesi e preserva la funzione β cellulare sia in modelli murini di controllo che in quelli con insulino resistenza (MK Reimer et al, 2002). Studi condotti in pazienti con DT2 trattati con inibitori della DPP-4 presentano un miglioramento del controllo metabolico, della secrezioni insulinica, associata a una ridotta secrezione di glucagone e una buona tollerabilità e sicurezza. Rispetto agli analoghi del GLP-1, gli inibitori della DPP-4 non sono in grado di indurre un calo ponderale, ma comunque non determinano un aumento del peso corporeo che invece si verifica con il trattamento con sulfaniluree o insulina. La DPP-4 è un enzima ubiquitario che è in grado di clivare diversi peptidi tra cui le incretine (B Ahren, 2005), ed è quindi possibile che l'effetto positivo che segue ad inibizione di tale enzima nel diabete non sia unicamente riconducibile alla maggiore emivita di queste incretine ma sia in realtà mediato anche dall'inibizione di altri peptidi; pazienti DT2 trattati con tali inibitori, infatti, manifestano un aumento delle concentrazioni di GLP-1 postprandiali e un miglioramento del compenso metabolico che non avvengono con la somministrazione esogena dell' incretina (B. Ahren, et al 2004). Il loro meccanismo d'azione è diverso rispetto agli altri farmaci anti-diabetici perché controllano la glicemia stimolando la secrezione insulinica delle β cellule e riducendo l'azione del glucagone. Il loro uso è raccomandato negli stadi precoci del diabete ed in combinazione con altri farmaci. Le molecole appartenenti a questa classe di inibitori prendono il nome di gliptine e comprendono tra le altre il Sitagliptin, Vildagliptin, Linagliptin, Saxagliptin. Ad esempio il Linagliptin ha mostrato in un recente studio in vitro, di essere protettivo e di ristabilire la funzione β cellulare in isole umane pancreatiche esposte a citochine o a condizioni di gluco- o lipotossicità (P. Shah et al 2013). In generale gli inibitori della DPP-4 riducono le citochine pro-infiammatorie, il tessuto adiposo viscerale e le placche aterosclerotiche con un effetto sul metabolismo del colesterolo. Infine, seppur se in minima parte, gli inibitori della DPP-4 riescono a mantenere sotto controllo la pressione arteriosa (N-H. Kim et al 2014).

4.2.1 - MK-0626

Nello studio riportato in questa tesi, è stato utilizzato un inibitore della DPP-4 ancora in fase di studio ma che ha già confermato, grazie ai numerosi lavori pubblicati, la sua attività inibitoria nei confronti della DPP-4.

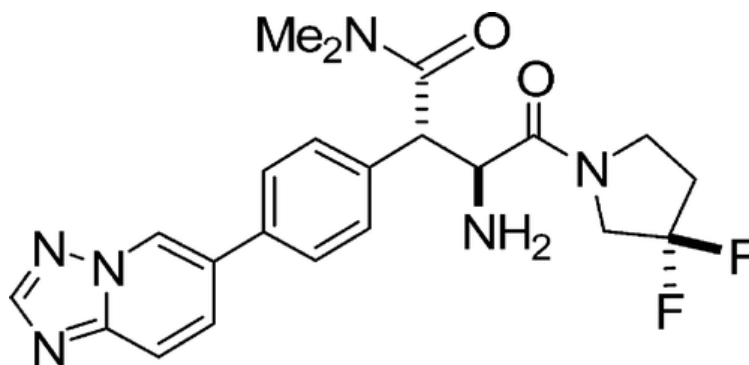


Figura 12: Struttura chimica di MK-0626 (Edmondson SD, J Med Chem, 2006)

Questa molecola con un IC₅₀ di 6.3 nmol/L, ha una farmacocinetica adatta ai modelli roditori e non correlata al sitagliptin (Sangle GV et al. Endocrinology 2012; Edmondson SD, J Med Chem, 2006), ed è stata recentemente testata anche negli esseri umani. È altamente selettiva, e nei test fatti su specie precliniche (topo, ratto, cane, scimmia) è stata osservata una buona biodisponibilità orale (data dall'aggiunta di un anello di di-fluoro pirrolidina), grazie anche alla sua farmacocinetica. Questa molecola assunta per via orale è stata modificata in modo tale da avere un gruppo elettrofilo nel sito P1 dal momento che l'attività della DPP-4 si basa sul fare un taglio sulla prolina nella posizione P1 dei suoi substrati.

La molecola MK-0626 è stata scoperta, e quindi sintetizzata, in seguito ad una serie di reazioni a partire da isosteri, ovvero molecole che hanno spesso proprietà chimico-fisiche molto simili, pertanto è possibile trarre delle conclusioni su composti sconosciuti conoscendo le proprietà degli isosteri noti. Tale principio viene sfruttato dalla chimica farmaceutica nell'ambito della ricerca di nuovi farmaci, ed in questo ambito i composti vengono più propriamente definiti come bioisosteri, in quanto presentano simile attività biologica.

Nel corso degli studi di questa classe di inibitori, si effettuano test anche sulla loro capacità di inibizione nei confronti della DPP-8, DPP-9 e FAP, perché l'inibizione di questi enzimi è stata associata con una tossicità nelle specie precliniche, mentre per l'uomo questo effetto non è ancora noto. Inoltre tra i test ai quali queste molecole inibitorie sono sottoposte, vi è quello fatto alla presenza di 50% di siero umano per valutare l'attività di legame alle proteine plasmatiche. Nei test in vivo di tolleranza a un carico di glucosio orale, l'MK-0626, ha

mostrato una riduzione dell'escursione glicemica; oltre a ciò, sono state analizzate anche la concentrazione plasmatica di DPP-4 inattiva, la concentrazione della molecola stessa e la quantità di GLP-1 attivo, più precisamente, si è osservato che la somministrazione di una dose di MK-0626 pari a 0,1 mg/kg corrisponde ad una concentrazione plasmatica del composto di 269 nM, e che la riduzione della glicemia corrispondeva al 56% della concentrazione plasmatica di DPP-4 inattiva (Edmondson SD, J Med Chem, 2006).

Molti studi hanno anche attribuito a questa molecola altre capacità, tra cui quella di attenuare la steatosi epatica in topi ob/ob (T. Ohyama et al, 2014). In uno studio condotto sui “topi kky” in condizione pre-diabetica è stato visto come il suo utilizzo in associazione ad attività fisica porti effetti benefici mostrando un mantenimento della funzionalità e della proliferazione β cellulare prolungando così il periodo nel quale le β cellule compensano lo stato di iperglicemia. Il tutto si traduceva, a livello morfologico, in una normalizzazione della densità insulare del pancreas (Li Y et al, 2013).

SCOPO DELLA TESI

Partendo dal presupposto che il GLP-1, ormone con effetti positivi sulla secrezione e sopravvivenza delle beta cellule e ritenuto essere prodotto dalle cellule L dell'intestino, risulta essere prodotto anche dall'isola pancreatica, ci siamo domandati se l'isola pancreatica potesse essere in grado di esprimere la DPP-4, l'enzima che ne controlla il tempo di emivita e se questa potesse avere un ruolo nella fisiopatologia β -cellulare.

Scopo di questa tesi quindi è quello di valutare in prima istanza la presenza della DPP-4 nelle isole umane pancreatiche e nella linea beta cellulare umana EndoC- β H1 e nel caso capire, attraverso una sua modulazione il ruolo sulla sopravvivenza e funzionalità di beta cellule umane di donatori DT2.

MATERIALI E METODI

I pancreas non utilizzabili per scopi clinici giunti al nostro laboratorio, sono stati ottenuti da 17 donatori multi-organo non diabetici e 16 affetti da diabete di tipo 2 con l'approvazione del nostro comitato etico. Le principali caratteristiche cliniche dei donatori sono riportate nella tabella 1 qui di seguito. Su alcune sezioni di tali pancreas sono stati eseguiti esperimenti di microscopia ottica o elettronica, mentre la parte rimanente è stata utilizzata per l'isolamento delle isole di Langerhans.

	N°	Età (anni)	Genere (M/F)	IMC (Kg/m ²)	Causa del decesso	Permanenza in terapia intensiva (giorni)	Glicemia (mg/dl)	Tempo di ischemia fredda (ore)
ND	17	58±18	10/7	25,0±4,0	12CV/3T/2S	2±1	148±39	15±3
DT2	16	68±10	12/4	26,9±3,8	10CV/3T/3S	2±1	213±63	16±5
Valore di p		p=0,06		p=0,17		p=1,00	p<0,01	p=0,49

Tabella 1: Caratteristiche dei donatori

1 - Linea beta cellulare umana.

La linea beta cellulare umana (EndoC- β H1) gentilmente fornita dal Dr. R. Scharfmann (Università di Parigi, Francia) è stata tenuta in coltura con DMEM contenente 5,6 mM glucosio, 2% BSA frazione V, 50 μ M beta-mercaptoetanololo, 10 mM nicotinamide, 5,5 μ g/ml transferrina, 6,7 ng/ml selenito, 100U/ml penicillina e 100 μ g/ml streptomycina.

2 - Immunoistochimica e microscopia confocale

Prima dell'isolamento delle isole, al termine della fase di pulizia dell'organo, vengono prelevati dei campioni di tessuto pancreatico ed inclusi in paraffina. Le sezioni usate sono dello spessore di 4 μ m ed a queste è stato aggiunto l'anticorpo per DPP-4 (anticorpo policlonare rabbit anti DPP-4 (N-term), diluito 1:160 (Acris Antibodies, San Diego, CA, USA), mentre l'anticorpo secondario anti-rabbit fa parte del kit Histostain-Plus (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Al fine di valutare la localizzazione intracellulare ed intransulare della DPP-4, è stato utilizzato il microscopio confocale. In prima istanza, i

campioni vengono deparaffinati, e per smascherare gli epitopi della DPP-4 ai quali si legherà l'anticorpo, le sezioni di pancreas sono state riscaldate nel bagnetto termico a 95° per 20 minuti in un buffer di sodio citrato (10 mmol/l citrato di sodio, 0.05% Tween 20, pH 6.0). Le sezioni sono poi state incubate per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo primario che è specifico verso la DPP-4 umana (anticorpo policlonale goat anti-DPP-4 umana; R&D System, Minneapolis, MN, USA), con l'anticorpo per insulina (anticorpo policlonale guinea pig anti-insulina; EuroProxima, Arnhem, the Netherlands) e con quello per il glucagone (anticorpo monoclonale mouse anti-glucagone; Abcam, Cambridge, UK) diluiti rispettivamente 1:200, 1:200 e 1:2000. L'anticorpo specifico per la DPP-4 utilizzato, è stato prima validato usando il peptide CD26 (Abcam). Gli anticorpi fluorescenti secondari utilizzati sono: anticorpo policlonale donkey anti-goat (Alexa Fluor 488 conjugated; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) per la DPP-4 umana e di topo; anticorpo policlonale rabbit anti-guinea pig (DyLight 594 conjugated; Abcam) per l'insulina ed infine un anticorpo policlonale donkey anti-mouse (Alexa Fluor 594 conjugated; Abcam) per il glucagone. Tutti gli anticorpi secondari sono stati diluiti 1:200. L'immagine fluorescente del preparato è stata osservata e catturata con il microscopio confocale Carl Zeiss LSM 780 per mezzo del software Zen imaging.

3 - Microscopia elettronica

Le isole pancreatiche (circa 30 isole per ogni campione) sono state fissate in glutaraldeide 2,5% in tampone fosfato 0.1M (pH 7.3) per 2 ore a 4°C. Dopo la fissazione, le cellule sono state lavate con tampone fosfato 0.1M (pH 7.3) per 3 ore a 4°C e quindi post-fissate con tetrossido di osmio (OsO₄) 1% in tampone fosfato 0.1M (pH 7.3) per 30 minuti a 4°C. dopo una disidratazione normale con una serie crescente di alcoli (H₂O bid, 25°, 50°, 70°, 95° a 4°C ed etanolo assoluto a temperatura ambiente), è stato sostituito l'alcool con ossido di propilene per 6 minuti a temperatura ambiente e quindi immersi in una miscela di 1:1 di ossido di propilene e resina epossidica (Poly/Bed 812, Polysciences Inc) e sono quindi inclusi nella stessa resina utilizzando degli stampini numerati in silicone. Le inclusioni vengono mantenute a 60° C per 48 h in modo da ottenere dei blocchetti solidi che saranno sezionati all'ultramicrotomo. Le sezioni di circa 60 nm sono state eseguite con lama di diamante, montate su retini di rame (200 mesh) e contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo e osservate al microscopio elettronico a trasmissione "Zeiss 90" e poi sono state fotografate per

mezzo di fotocamera digitale. Sulle sezioni è stata eseguita un'analisi qualitativa delle cellule che compongono l'isola (cellule alfa, beta e delta) con una conta percentuale delle cellule vive e morte (apoptosi e necrosi) mentre sulle immagini fotografate (formato 12x18cm) è stata condotta un'analisi quantitativa morfometrica dei vari organuli cellulari. Per ogni isola pancreatica umana (IPU) sono state contate una media di 200 cellule totali comprendendo anche le eventuali cellule in apoptosi mentre le cellule endocrine sono state individuate in base ai caratteristici e specifici granuli e quelle apoptotiche grazie alle tipiche alterazioni morfologiche, tra cui la più importante è la condensazione della cromatina a livello nucleare.

- Analisi morfometrica

Sulle immagini fotografiche di beta cellule sono state prese in considerazione alcuni organuli cellulari: granuli di insulina (IG), mitocondri (M) e reticolo endoplasmatico ruvido (RER). Sono state utilizzate 20 foto per ogni campione tutte allo stesso ingrandimento finale di 10000x. L'area di riferimento era l'area citoplasmatica della beta cellula. L'analisi morfometrica quantitativa è stata eseguita secondo le tecniche morfometriche presenti in letteratura (Weibel, 1979). Secondo il metodo di Weibel (1981) per l'analisi morfometrica, sono state utilizzate due griglie con 121 incroci (per M e RER) e con 169 incroci (per IG). Ponendo le griglie sulle immagini fotografiche (le griglie sono poste sempre dalla stessa parte per tutte le immagini per mantenere la casualità) è possibile contare gli incroci che cadono all'interno dell'organulo considerato (punti Interni) ed ottenere quindi la media di tali punti. I dati così raccolti permettono di ricavare la densità di volume, espressa in ml/100 ml di tessuto, di ogni tipo di organulo secondo la seguente formula:

■ La densità di volume (DV) dei M e RER:

$$(\text{media dei punti interni } (P_i) / \text{numero totale di incroci } (P_t)) \times 100 = (\mu P_{int}/121) \times 100$$

■ La DV dei IG:

$$(\text{media dei punti interni } (P_i) / \text{numero totale di incroci } (P_t)) \times 100 = (\mu P_{int}/169) \times 100$$

3.1 - Immunogold

Al fine di localizzare la DPP-4 all'interno delle isole pancreatiche, sezioni molto sottili di tessuto pancreatico sono state poste su di una griglia in nichel dove è stata messa una soluzione acquosa fresca all'1% di acido periodico per 8 minuti, dopodiché si sciacqua con acqua distillata. Queste sezioni sono state condizionate con PBS (0.01 M buffer fosfato, pH 7.2, 0.15 M NaCl) con aggiunta di 1% BSA, 0.01% Triton X-100, e 0,01% Tween 20 e poi incubate con anticorpo policlonale goat anti-DPP-4 (R&D System, Minneapolis, MN, USA), diluito 1:100 e tenuto a 4°C per tutta la notte. Le griglie così preparate sono incubate per 1 h con la proteina A-gold complex (la cui grandezza delle particelle d'oro è di 15 nm) (Agar Scientific, Stansted, UK) diluite 1:10. Al termine, per favorire il contrasto, è stato applicato acetato di uranio e citrato di piombo e si è provveduto all'osservazione al microscopio elettronico Zeiss. Come controllo è stata verificata l'emissione dell'anticorpo primario.

4 - Isolamento e purificazione delle isole pancreatiche umane

4.1 - Preparazione delle isole pancreatiche umane

Il pancreas di donatori multiorgano viene sottoposto ad un processo che consiste in una prima parte di digestione e poi di purificazione su gradiente di densità, così da separare le isole di Langerhans dal tessuto acinare. L'organo viene pulito rimuovendo il tessuto adiposo circostante, viene poi processato ed infine si ha l'isolamento delle isole; il tutto avviene in condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare per uso biologico, utilizzando materiale da laboratorio, strumenti chirurgici, e soluzioni sterili.

- Digestione del tessuto pancreatico

Il pancreas dopo l'espianto viene posto in due sacchetti e trasportato in ghiaccio fino alla sede nella quale viene processato. In laboratorio è posto sotto cappa e prelevato dall'interno dei sacchetti per riporlo in un'arcella posizionata a sua volta all'interno di un contenitore ripieno di ghiaccio, in modo da tenere l'organo a basse temperature. Il pancreas è stato ripulito dal tessuto adiposo ed viene rimossa anche la testa per rendere il dotto pancreatico principale accessibile alla successiva fase del processamento. A livello del dotto è stata inserita un'agocannula di 16-18 nm di diametro, attraverso la quale verrà introdotta 150 ml di una soluzione di digestione che si ottiene con 600 - 700 mg di collagenasi (Roche, Indianapolis, IN, USA)

(3 - 3.5 mg/ml) in 200 ml di soluzione di Hank's, (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stati Uniti), completata con 10 % di siero bovino (Sigma-Aldrich). A questo punto il pancreas viene posto all'interno di un becher sterile aggiungendo la quantità di soluzione di digestione non iniettata e posto in un bagnetto termostato a 37 °C per 10-15 min. Questa fase è temporalmente diversa a seconda delle caratteristiche dell'organo, infatti è opportuno controllare la digestione valutando la consistenza dell'organo con delle pinze. A questo punto l'organo viene riportato a temperatura ambiente dove viene sottoposto a dei processi di filtrazione attraverso setacci di acciaio con maglie di diverso diametro posti in sequenza, rispettivamente 400 e 90 micrometri di diametro. Ad ogni filtrazione, il materiale trattenuto sul filtro da 90 micrometri è stato raccolto in un becher, mediante lavaggio del filtro stesso con una soluzione di HBSS contenente il 10 % di siero bovino, e il pancreas è stato riposto nel becher dove è stato aggiunto HBSS raffreddato a 4° C per bloccare l'attività della collagenasi, agitato con delle pinze in modo da favorire il rilascio in soluzione delle isole. Durante le filtrazioni l'attività digestiva della collagenasi è stata monitorata raccogliendo al termine di ogni filtrazione, una piccola aliquota del digerito, colorato con ditizione (colorante che si lega agli atomi di zinco dei granuli di insulina e impartisce alle isole una colorazione rossa) e osservato al microscopio. La procedura di filtrazione è stata quindi fermata una volta che il tessuto si presentava adeguatamente digerito e le isole sufficientemente libere, in genere dopo circa 40 minuti dall'inizio della procedura stessa.

- Purificazione

Per mezzo della purificazione si riesce a separare il tessuto pancreatico endocrino da quello esocrino attribuendo un certo grado di purezza. Per la purificazione, il digestato è stato aliquotato in falcon da 50 ml (Sarstedt, Niimbrecht, Germany) e centrifugato a 1000 x g per 2 min a 4°C, il surnatante è stato eliminato e si è proceduto con una prova di separazione per gradiente di densità. Durante la prova a due falcon che sono state centrifugate, viene scartato il surnatante e risospeso il pellet uno in 15 ml di una soluzione contenente Lymphoprep (Cedarlane, Burlington, SU, Canada) e HBSS completo con il 10% di siero bovino in rapporto 80:20, l'altro in 15 ml di una soluzione contenente Lymphoprep e HBSS completo in rapporto 70:30; sopra la sospensione sono stati successivamente stratificati 10 ml di HBSS. Questi vengono poi centrifugati a 1800 x g per 5 min a 4°C. Si possono osservare due fasi all'interno della falcon divise da un anello che viene raccolto in una piastra petri, aggiunto del mezzo di coltura e colorato con ditizione per essere osservato al microscopio ottico. Grazie alla prova si decide il gradiente di densità più opportuno e che permette di ottenere più isole e che siano il

più pure possibile, ed in base a questo viene scelto poi il gradiente al quale anche le restanti falcon (le quali erano tenute in ghiaccio) saranno sottoposte. Raccolto quello che viene definito “ring”, ovvero l’interfaccia tra le due soluzioni delle falcon, è stata fatta un’ulteriore centrifuga a 1800 x g per 2 min a 4 °C. Il surnatante è stato scartato e il pellet, contenente le isole, aliquotato in fiasche per sospensione da 75 cm² (Sarstedt) con mezzo di coltura M199 (Sigma-Aldrich) arricchito con 100 U/ml di penicillina (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml di streptomicina (Sigma-Aldrich), 50 µg/ml di gentamicina (Sigma-Aldrich) e 0,25 µg /ml di anfotericina B (Sigma-Aldrich) (Bugliani et al. 2004). Le fiasche sono state quindi conservate in incubatore a 37 °C contenente il 5,0 % di CO₂; il mezzo di coltura è stato cambiato una prima volta 24 ore dopo l’isolamento e poi a distanza di una settimana.

5 - Preparazione del mezzo di coltura M199

Il mezzo di coltura M199 (Euroclone) viene completato con siero bovino e antibiotici. Per la preparazione di 500 ml di medium, sono stati aggiunti al mezzo 50 ml di siero bovino-adulto (Sigma-Aldich), 5 ml di una soluzione di Penicillina-Streptomicina (Sigma-Aldich), 1,5 ml di Amfotericina B (Sigma-Aldich) ed 500 µl di Gentamicina (Sigma-Aldrich). Il pH del mezzo deve essere compreso tra 7,35 e 7,40; in seguito è stato filtrato con opportuno sistema di filtraggio.

6 - Studi funzionali in vitro

Gli studi funzionali permettono di valutare la funzionalità delle isole pancreatiche sottoposte ai diversi trattamenti suddetti. Questo genere di studi consistono nel sottoporre le isole pancreatiche ad incubazione statica in soluzioni di Krebs (KRH), addizionate con albumina (Roche) 0,5% e glucosio alle concentrazioni di 3,3 mM (basso glucosio) e 16,7 mM (alto glucosio) aggiustando il pH in modo che sia 7.

- Preparazione della soluzione di Krebs.

Per prima cosa bisogna preparare una soluzione salina iniziale, la quale viene poi divisa in quella che avrà una concentrazione di 3,3 mM di glucosio (basso glucosio) ed una con 16,7

mM di glucosio (alto glucosio). A questa soluzione salina utilizzata vien aggiunta albumina (Roche) 0,5 % ed Hepes 100 X. La soluzione di Krebs è costituita in parti uguali da quattro soluzioni: tre di queste sono già pronte, mentre la quarta viene preparata il giorno stesso dello studio funzionale. La soluzione 1 (KREBS 1) prevede che in 500 ml di acqua distillata vengono sciolti 13.446 g di NaCl; la soluzione 2 (KREBS 2) è composta da 500 ml di acqua distillata nei quali vengono solubilizzati 745 mg di KCl, 4,032 g di NaHCO₃, 407 mg di MgCl₂• 6 H₂O; la soluzione 3 (KREBS 3) ha sempre 500 ml di acqua distillata nei quali vengono sciolti 555 mg di CaCl₂. La soluzione 4 (KREBS 4) viene preparata il giorno stesso dello studio funzionale sciogliendo a 4 °C albumina bovina in acqua distillata in modo da ottenere una soluzione con una concentrazione di 1 g/50 ml. Una volta costituita la miscela di ugual volumi delle quattro soluzioni, si aggiungono 238.3 mg di Hepes per 100 ml di soluzione di KREBS.

- Procedura

Le isole sono state incubate a 37 °C per 24 ore in piastre petri da 20 ml, in presenza delle molecole suddette definendo quindi i diversi punti sperimentali che sono poi eseguiti in triplette durante lo studio funzionale. Si procede con la pesca delle isole che è un'operazione che può essere fatta anche in assenza di sterilità secondo gli eventuali esperimenti successivi. Vengono pescate circa 15 isole di medie dimensioni per ogni provetta da 5 ml (3 provette per punto sperimentale). In questo modo le isole sono state pre-incubate per 45 min con soluzione Krebs contenente glucosio 3.3 mM (basso glucosio) a 37° C su shaker. Allo scadere dei 45 minuti le provette sono state centrifugate a 1200 rpm per 2 min ad RT ed è stato scartato il surnatante. Si è proceduto con quello che viene definito come "lavaggio veloce" con la stessa soluzione di Krebs usata prima e si fa subito un passaggio in centrifuga a 1200 rpm per 2 minuti ed è stato scartato il surnatante. Successivamente le isole sono state incubate per 45 minuti ancora con Krebs e glucosio 3,3 mM; questo è lo stimolo basale. Al termine dell'incubazione le soluzioni sono state centrifugate a 1200 rpm per 2 min ed è stato recuperato il surnatante in provette numerate. Ora le isole sono state incubate per 45 min con Krebs e glucosio 16,7 mM (questo è lo stimolato) ed al termine dell'incubazione è stato fatto un passaggio in centrifuga a 1200 rpm per 2 min ed il surnatante è stato recuperato in altre provette numerate. Queste stesse isole sono state incubate per 24 ore a 4°C in una soluzione di alcol acido costituita da etanolo puro, acido cloridrico al 36% e acqua deionizzata, passaggio che ha permesso l'estrazione di tutti i granuli di insulina in quanto questa sostanza ha l'effetto di degradare le cellule e quindi liberare tutta l'insulina in esse presente. Al termine

dell'incubazione le isole sono state sonicate per 3 minuti e successivamente centrifugate a 3000 rpm per 3 min. Il surnatante è stato raccolto in nuove provette numerate per valutare la quantità di insulina rilasciata per mezzo di dosaggio immuno-radiometrico.

7 - Dosaggio immunoradiometrico

Il dosaggio dell'insulina prevedeva l'uso del surnatante recuperato durante lo studio funzionale ed è stato fatto utilizzando il kit DIA source INS-IRMA (Pantec, Forniture Biomediche, Torino, Italia) che è per l'appunto un dosaggio immuno-radiometrico basato sull'utilizzo di anticorpi monoclonali (Mabs 1) diretti contro gli epitopi dell'insulina che sono adsorbiti sulla superficie interna della parete inferiore delle provette in polistirene le quali sono comprese nel kit stesso.

- Procedura

Il kit che è stato usato è dotato di standard che devono essere ricostituiti utilizzando una certa quantità di milliQ: il calibratore zero è stato ricostituito con 2 ml di milliQ, invece i restanti calibratori con 500 µl. Anche i controlli vengono ricostituiti con 500 µl di acqua milliQ. A seconda della quantità di campioni che sono stati dosati, è stata preparata una certa quantità di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio composta da milliQ e tampone di lavaggio concentrato (70 x). Inoltre è stato usato un magnete ed un agitatore per rendere tale soluzione omogenea. Campioni, controlli e calibratori sono stati prima vortexati e poi sono stati aggiunti 50 µl di ciascuno a provette diverse. Ad ogni provetta è stato poi aggiunto ad ogni provetta 50 µl del marcato (Mabs 2 marcati con ^{125}I). Il tutto è stato incubato a temperatura ambiente per 2 ore ed al termine della incubazione è stato aspirato il contenuto delle provette con aspiratore evitando di toccare il fondo della provetta ed è stato aggiunto 2 ml di tampone di lavaggio. Il liquido è stato poi aspirato di nuovo e sono stati ripetuti 2 lavaggi con 2 ml di tampone di lavaggio. Dopo il secondo lavaggio, le provette sono state lasciate decantare in posizione verticale per 2 min, quindi è stata contata la radioattività residua utilizzando un contatore gamma per 1 minuto. Al termine della lettura, la macchina rilascia un grafico delle concentrazioni degli standard, sulle cui ordinate è stato riportato il numero dei colpi per minuto (c.p.m) e sull'asse delle ascisse la concentrazione dello standard corrispondente: contro questa curva sono state valutate le concentrazioni di insulina nei campioni.

7.1 - Analisi del rilascio insulinico

Il dosaggio immunoradiometrico ha consentito di calcolare la concentrazione insulinica espressa come $\mu\text{U/ml}$. I valori ottenuti sono stati utilizzati per calcolare l'indice di stimolo, ottenuto dal rapporto tra il rilascio insulinico in risposta a glucosio 16,7 mM e il rilascio insulinico in risposta a glucosio 3,3 mM. L'indice di stimolo consente di ottenere una stima della sensibilità della risposta insulinica.

8 - Coltura isole

Dopo 2-3 giorni dall'isolamento, le isole sono state esposte per 24 ore a 50U/ml di IL-1 beta e 1000 U/ml di IFN-gamma in presenza o meno di 10 $\mu\text{mol/l}$ del nuovo inibitore della DPP-4, ovvero MK-0626. In alcuni subsets di esperimenti, è stato saggiato anche l'effetto dell'esposizione a 100 nM Exendina 9-39. In maniera simile, la linea beta cellulare umana è stata tenuta in coltura fino a 48 ore in presenza o meno delle suddette concentrazioni di citochine, MK-0626 ed Exendina-9-39.

9 - Valutazione della sopravvivenza di EndoC- β H1

La proporzione di cellule vitali o morte è stata valutata mediante microscopia a fluorescenza, dopo avere esposto per 15 min le cellule a 5 $\mu\text{g/ml}$ di propidio ioduro e 5 $\mu\text{g/ml}$ di Hoechst 33342. La percentuale di cellule morte, quindi positive per propidio ioduro, è stata valutata sul numero di cellule totali il cui nucleo è stato evidenziato con Hoechst 33342.

10 - Analisi dell'espressione genica

- Estrazione RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale dalle isole pancreatiche umane viene effettuata usando la soluzione TRIZOL (Life Technologies) per la lisi cellulare e un kit commerciale (PureLink RNA Mini Kit) con colonnine filtranti. La procedura si basa sulla sinergia tra gel di silice e

velocità delle micro centrifughe. Un sistema specializzato di tamponi consente di ottenere la purificazione dell'RNA legandolo ad una membrana di gel di silice. Secondo il protocollo i campioni biologici vengono lisati e omogenati in TRIZOL. In seguito il trattamento con cloroformio (Sigma-Aldrich) libera la soluzione dalle proteine e in parte dal DNA. Le appropriate condizioni di legame sono garantite dall'aggiunta di etanolo, quindi il campione viene trasferito in una mini-colonnina dove L'RNA totale resterà legato mentre gli agenti contaminanti sono eliminati mediante una precisa sequenza di lavaggi; la contaminazione da DNA viene eliminata degradandolo con un'apposita DNasi (PureLink).

- Procedura

Al termine del periodo di incubazione, le isole sono sottoposte ad un lavaggio in PBS, dopodiché le cellule sono raccolte secondo protocollo TRIZOL (Life Technologies), risospendendo più volte fino alla lisi completa del campione. Il lisato viene trasferito in una eppendorf da 1,5 ml sterile e mantenuto a RT per 10 min, quindi posto a -20°. Al momento dell'estrazione ai campioni scongelati a T ambiente vengono aggiunti 200 µl di cloroformio (Sigma-Aldrich), vengono miscelati per 15 sec, lasciati riposare per 2-3 min e quindi centrifugati a 12.000 g per 15 min a 4° C. Nel frattempo si prepara la soluzione di DNasi (PureLink) miscelando i reagenti secondo le proporzioni stabilite dal protocollo. Al termine della centrifugazione sono osservabili tre fasi: una inferiore, contenente le proteine, una intermedia, contenente il DNA e una superiore contenente L'RNA. Quest'ultima fase viene recuperata e addizionata di un uguale volume di EtOH al 70%. La miscela così ottenuta è vortexata e trasferita in una mini-colonnina fornita di raccoglitore. La soluzione viene centrifugata a 12.000 g per 15 sec e successivamente, una volta filtrata dalla membrana di silice, scartata. La membrana, legante l'RNA tot, viene lavata con 350 µl di tampone (buffer I) centrifugando nuovamente a 12.000 g per 15 sec, dopodiché si lascia digerire con 80 µl di DNasi (PureLink) per 15 min a T ambiente. Al termine di tale periodo si procede con alcuni lavaggi prima con buffer I, 350 µl (Ambion by Life Technologies), poi con buffer II, 500 µl (Ambion by Life Technologies) centrifugando ogni volta a 12.000 g per 15 sec, tranne l'ultimo lavaggio che viene fatto girare per 1 min allo scopo di eliminare ogni traccia di impurità. Finiti i lavaggi, la colonnina è posta in una eppendorf sterile da 1,5 ml e l'RNA totale diluito con 30 µl di acqua RNasi-Free (Ambion by Life Technologies), lasciando prima incubare per 1 min, quindi centrifugando a 12.000 g per 1 min.

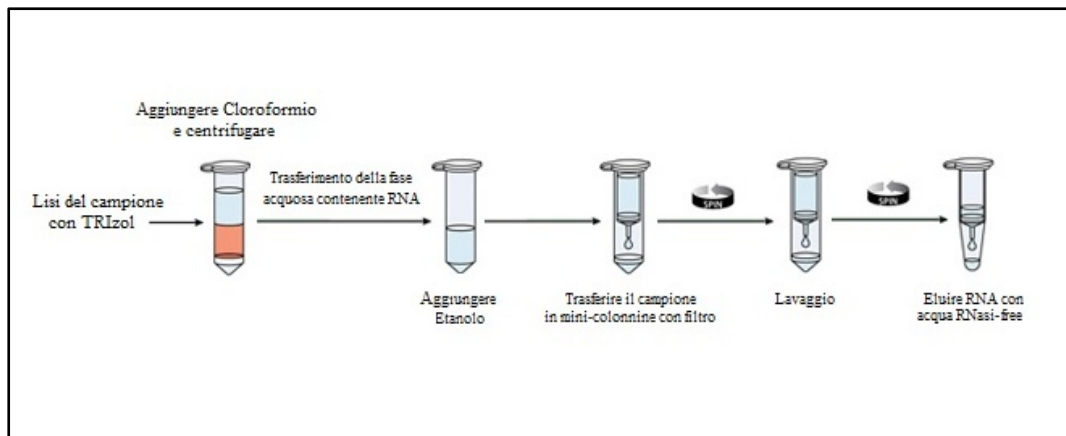


Figura 13: Estrazione RNA. Adattata da <https://www.thermofisher.com>

- Quantificazione RNA totale estratto

Questo tipo d'indagine si basa sulle proprietà che hanno le basi puriniche e pirimidiniche dell'RNA di assorbire nell'UV alla frequenza di 260 nm. Questa procedura richiede che il campione sia stato sottoposto a trattamento di eliminazione del DNA contaminante con DNasi, altrimenti la lettura sarebbe falsata dall'assorbimento delle basi del DNA. La quantificazione dell'RNA è effettuata misurando l'assorbanza di 2 µl di campione a 260 nm e 280 nm in uno spettrofotometro Nanodrop2000c (Thermo Scientific). Lo strumento fornisce la concentrazione espressa in mg/µl. Valutando l'assorbimento alla lunghezza d'onda di 260nm e contemporaneamente a 280 nm è possibile quantificare la purezza dell'estratto rispetto al contenuto proteico. L'assorbimento a 280 nm è dovuto infatti alla presenza dei residui amminici aromatici di eventuali proteine contaminanti. Tale purezza si valuta rapportando il valore di assorbimento a 260 nm con quello a 280 nm. Viene considerato idoneo un campione che presenta un rapporto di assorbimento 260 nm/280 nm compreso tra 1,9 e 2,1.

- Retrotrascrizione: cenni teorici

La retrotrascrizione o RT consiste nell'ottenere molecole complementari di DNA (cDNA) per tutti gli mRNA presenti nel campione. Il cDNA viene prodotto utilizzando l'enzima trascrittasi inversa che sintetizza una catena di DNA complementare allo stampo di mRNA, utilizzando una miscela dei quattro deossiribonucleotidi trifosfato, purché venga fornita una corta molecola di iniziatore (primer) che si possa appaiare all'estremità 3' dell'RNA. Poiché l'mRNA ha una coda di poli (A) alla sua estremità 3', una corta molecola di oligo (dT) può agire come primer per la trascrittasi inversa. Il risultato finale, dopo l'allontanamento

dell'RNA complementare per denaturazione al calore, è la sintesi di una catena a singolo filamento di cDNA. Mettere anche principio di uso dei random primers.

- Procedura

La retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando SuperScript® VILO MasterMix (Invitrogen) seguendo le istruzioni fornite da manuale adattate alle nostre condizioni. In una eppendorf da 0,2 ml si predispose un volume di campione equivalente a 1,5 µg di RNA totale con l'aggiunta di 4 µl SuperScript® VILO MasterMix (precedentemente vortexata e incubata a 25°C per 10 min) per un volume finale di 20 µl. A questo punto il campione è posto ad incubare a 25°C per 5 min, dopodiché è scaldato a 42°C per 30 min; l'azione della trascrittasi inversa infine è bloccata esponendo il campione ad una temperatura di 85°C per 5 min. Il campione così ottenuto può essere utilizzato per la PCR oppure conservato a -20°C.

- Analisi quantitativa dell'mRNA: real time PCR

Nella PCR convenzionale le operazioni da compiere sono molteplici: retrotrascrizione, preparazione della miscela per PCR, preparazione del gel, caricare il prodotto e analizzarlo. Dal punto di vista sperimentale, più operazioni si deve compiere. Maggiore è la probabilità di compiere un errore. Nella real time RT-PCR si tende a ottimizzare riducendo drasticamente il numero di operazioni da compiere e quindi la possibilità di errore. Nella real time RT PCR di Taqman l'amplificazione viene condotta in provette ottiche chiuse in una micro piastra a 96 pozzetti e posta in un ciclizzatore termico munito di rilevatore (Applied Biosystem - ViiA 7 by Life Technologies). In questo strumento una luce laser viene diretta in maniera sequenziale verso ognuno dei 96 pozzetti campione e i dati dell'emissione fluorescente rilevati ogni 2 sec man mano che la reazione di amplificazione procede.

La fluorescenza viene analizzata in modo tale da consentire l'uso simultaneo di più sonde fluorescenti spettralmente distinte (lo strumento può rilevare infatti tra i 500 nm e i 660 nm). Più il numero di copie di partenza sarà alto, più la fluorescenza finale osservata sarà consistente. I dati sono poi elaborati da un software che elimina quindi i processi post PCR necessari per gli altri metodi di quantificazione. Rispetto alla normale PCR il protocollo Taqman fa uso di una DNA polimerasi ad attività 5' nucleasica e tre sonde oligonucleotiche che si ibridano con il cDNA. Le prime due sequenze denominate Primers definiscono gli estremi del segmento da amplificare, la terza denominata probe, si ibrida al frammento da amplificare durante le fasi di annealing e di estensione della PCR. La sonda contiene alla sua estremità 5' una molecola fluorescente chiamata Reporter la cui fluorescenza è però mascherata da una seconda molecola fluorescente chiamata Quencer all'estremità 3'. Se

durante la PCR non viene amplificato alcun frammento complementare alla sonda allora questa rimane libera. Dato che l'attività 5' esonucleasica della polimerasi è specifica per il DNA a doppia catena, la sonda non viene intaccata e la fluorescenza rimane mascherata; se invece al contrario, si sta amplificando il giusto frammento, la sonda può ibridare al frammento dopo la denaturazione e nel momento in cui la polimerasi, nella fase di allungamento, raggiunge la sonda ibridata, la spiazza e la rompe, separando il reporter dal quencer ed emettendo quindi fluorescenza. Questo segnale è direttamente proporzionale al numero di molecole presenti alla fine del ciclo precedente o all'inizio del ciclo presente.

- Principio di funzionamento della tecnica TaqMan

I risultati dell'amplificazione si hanno sotto forma di cicli soglia, intendendo per ciclo soglia il più piccolo numero di cicli impiegati per raggiungere un punto in cui per la prima volta il segnale fluorescente viene registrato come statisticamente significativo rispetto al rumore di fondo. È chiaro che maggiore è la quantità di campione minore sarà il numero di cicli necessario per raggiungere quel punto. Si può trasformare il valore di ciclo soglia di un campione in un risultato quantitativo in modo relativo o assoluto. Nel primo caso denominato metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ durante il saggio RT-PCR il ciclo cercato viene comparato direttamente con quello di riferimento (controllo) ed è registrato come contenente più o meno mRNA. Utilizzando una curva standard di riferimento la quantificazione assoluta della trascrizione permette la determinazione esatta del numero di copie per cellula, della concentrazione totale di RNA o dell'unità di massa del tessuto. Gli errori nella quantificazione dei trascritti di mRNA sono dovuti alla variazione nella quantità di materiale di partenza nel campione e diventano rilevanti quando questi sono stati ottenuti da individui o trattamenti diversi. Normalizzando rispetto ad un campione noto si possono minimizzare gli errori e correggere le variazioni dei diversi campioni. Ciò consiste nell'amplificare simultaneamente al campione da analizzare un cDNA cellulare che serve come punto di riferimento interno rispetto a cui si possono normalizzare i valori ottenuti. Questo standard interno ideale dovrebbe essere espresso a livelli costanti nei diversi tessuti dell'organismo ad ogni età, in ogni condizione, e non deve essere influenzato dal trattamento sperimentale a cui sono sottoposte le cellule.

- Scelta dei primer e dei probes per la PCR real time

La fluorescenza del campione è data dalla molecola in 5' che può essere marcata con FAM (6 carbossi fluoresceina), TET (tetra cloro 6 carbossi fluoresceina), JOE (2,7 dimetossi 4,5 dicloro 6 carbossi fluoresceina) o HEX (esacloro 6 carbossi fluoresceina), fluorescenza che però risulta mascherata dalla molecola all'estremità 3' costituita da TAMRA (6 carbossi

tetrametil rodamina). I primers, inoltre, devono possedere alcune caratteristiche quali la lunghezza compresa tra 15 e 20 basi, il contenuto in G/C compreso tra il 20% e il 70% e una T_m compresa tra 58°C e 60°C che differisca al massimo 1-2°C tra le due sonde. La formazione di prodotti aspecifici si può evitare scegliendo primers che abbiano solo una o due G/C tra gli ultimi 5 nucleotidi all'estremità 3'. Per quanto concerne la scelta del probe, questo deve avere una T_m più elevata dei primers di circa 10°C dato che si deve ibridare prima e che deve rimanere ibridata durante l'annealing. La maggior parte dei probes sono lunghi circa 30 basi e mostrano un contenuto in G/C di circa il 50% per assicurare una buona specificità e una T_m abbastanza elevata. I probes del protocollo TaqMan non devono contenere alcuna guanina alle loro estremità 5' perché questa maschererebbe la fluorescenza del reporter anche dopo la degradazione.

- Procedura

L'analisi in real-time avviene in due parti: nella prima parte si imposta il software programmando le temperature dei cicli, la durata di esposizione del campione ai cicli e il tipo di molecole fluorescenti usate per ogni campione. A questo punto si possono preparare le miscele di reazione. Nella micro piastra si aliquotano 10 μ l di TaqMan Universal PCR Master mix, 1 μ l di Mix di primers/probe. Alle miscele si aggiungono 1 μ l di campione di cDNA e si porta tutto a volume con 8 μ l di acqua sterile DNase free. Al termine si coprono i pozzetti e si pone la piastra nella giusta allocazione all'interno del ciclizzatore termico (Applied Biosystem - ViiA 7 by Life Technologies), sottoponendo i campioni, prima a riscaldamento a 95°C per 10 min, così da attivare la polimerasi, poi a 40 cicli costituiti da esposizioni sequenziali a 95°C per 15 sec e a 60°C per 60 sec. La quantità di cDNA dei geni amplificati vengono normalizzate rapportandole con l'espressione del cDNA della β -actina fatto amplificare parallelamente.

11 - Analisi statistica

I risultati ottenuti e le eventuali differenze sono state analizzate tramite ANOVA con correzione di Bonferroni quando i gruppi esaminati erano maggiori di tre; il t test è stato utilizzato quando i gruppi esaminati erano pari a due. Le differenze sono state considerate significative quando si otteneva un valore di *p value* inferiore a 0,05.

RISULTATI

1 - Valutazione della presenza della DPP-4 nell'isola pancreatica

Mediante immunisto chimica abbiamo prima valutato se la DPP-4 fosse espressa nelle isole pancreatiche umane, poi se potessero esserci differenze tra i ND e DT2. Come è possibile osservare nella figura 14 (pannelli A e B), la DPP-4 risultava essere presente sia nelle isole non diabetiche che diabetiche, tuttavia dopo aver contato le cellule DPP-4 positive in 41 isole non diabetiche e 40 isole diabetiche di tipo 2 da un totale di 4 pancreas per ogni gruppo, la percentuale di risultava circa 3 volte maggiore nelle isole ND rispetto a quelle DT2 (figura 14, pannello C).

Grazie all'ausilio della microscopia confocale abbiamo poi osservato come la positività per DPP-4 fosse associata in larga misura a quella per glucagone ma anche con un sottogruppo di cellule insulino positive (figura 14, pannelli D-F).

L'immunogold confermava come la DPP-4 fosse presente nel citoplasma di cellule contenenti insulina o glucagone ma non in quelle contenenti somatostatina (figura 14, pannelli G-I); inoltre, mostrava come la percentuale di cellule alfa positive per DPP-4 fosse maggiore rispetto a quella delle cellule beta e come i soggetti diabetici avessero una riduzione di positività in entrambi i tipi cellulari. (figura15, pannello A).

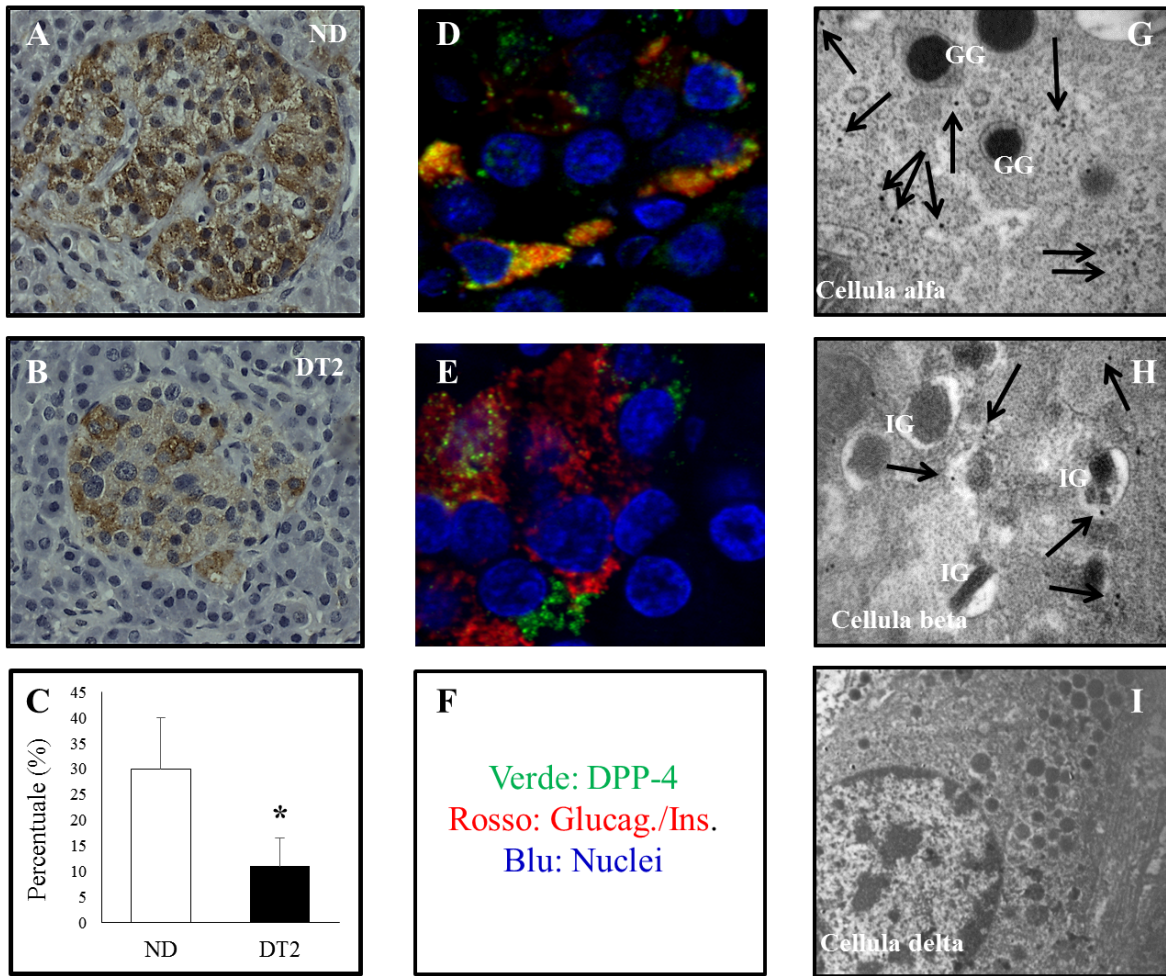


Figura 14 – Pannelli A-C: Immunostaining per DPP-4 in tessuto pancreatico di soggetti ND e soggetti T2D con conta percentuale di cellule DPP-4 positive. Pannelli D-F: microscopia confocale di sezioni di tessuto isole ND in cui sono evidenziati DPP-4, insulina, glucagone e nuclei. Pannelli G-I: analisi immunogold per DPP-4 in cellule alfa, in cellule beta e in cellule delta.

L'analisi di espressione genica confermava come la DPP-4 fosse maggiormente espressa nelle isole ND rispetto a quelle DT2 (figura 15, pannello B).

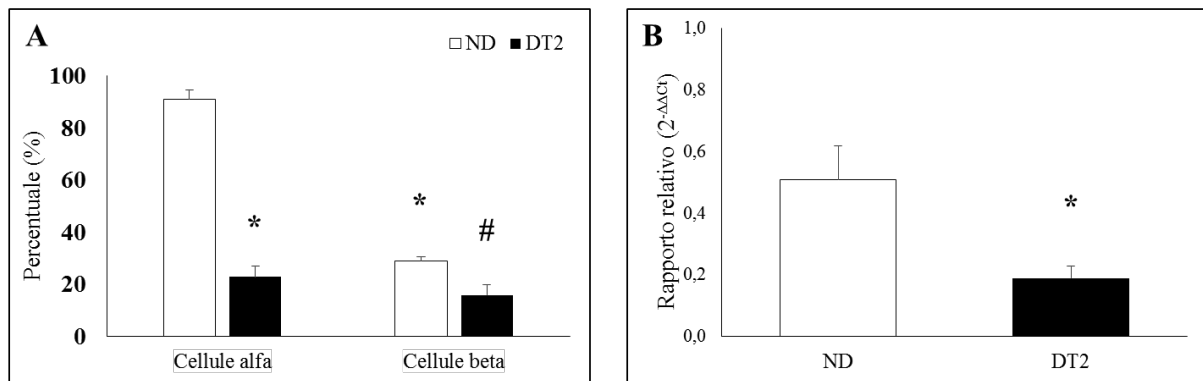


Figura 15 - Pannello A: percentuale di cellule positive alla DPP-4 misurata tramite immunogold (*p<0,05 vs ND alfa cellule; #p<0,05 vs ND beta cellule). Pannello B: Espressione genica di DPP-4 in isole ND e T2D (*p<0,05)

2 - Valutazione della presenza della DPP-4 nella linea beta cellulare umana EndoC-βH1

L'analisi dei dati di RNA sequencing di 5 preparati cellulari di EndoC-βH1 mostrava un'alta espressione di DPP-4 (RPKM; media±Dev STD: 57±18), ed un'espressione per glucagone sotto il limite della rilevazione (RPKM<0,15).

3 - Effetto dell'inibizione della DPP-4 sul danno indotto da citochine in isole pancreatiche umane e cellule EndoC-βH1

Per esplorare se l'inibizione della DPP-4 potesse influenzare la sopravvivenza beta cellulare, sia isole umane non diabetiche che la linea beta cellulare umana sono state esposte per 24-48 ore a un cocktail composto da IL-1beta e IFN-gamma in presenza o meno di MK-0626.

Come aspettato, il trattamento con citochine induceva apoptosi beta cellulare in entrambi i modelli (figura 16, pannelli A-B); la presenza dell'inibitore della DPP-4 riduceva l'effetto citotossico delle citochine. L'esposizione di isole o cellule di controllo a MK-0626 e/o exendina 9-39 non modificava in maniera significativa la sopravvivenza.

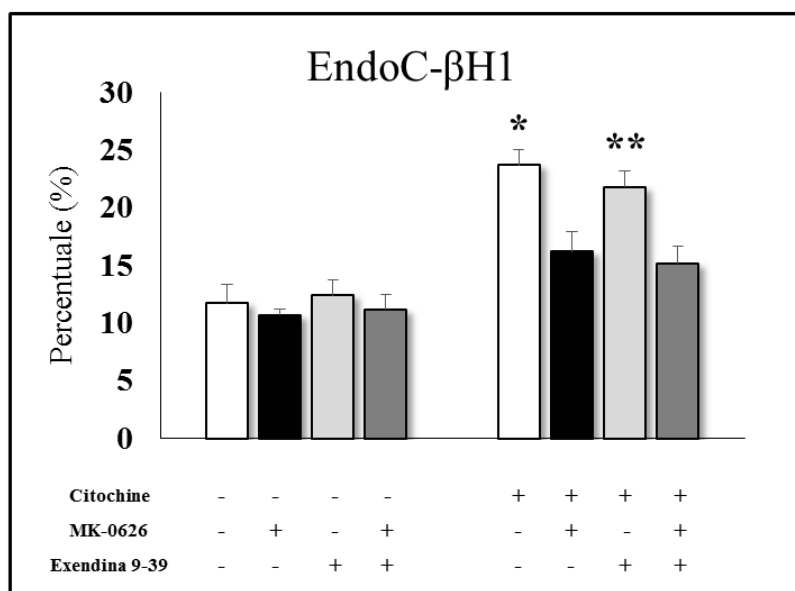
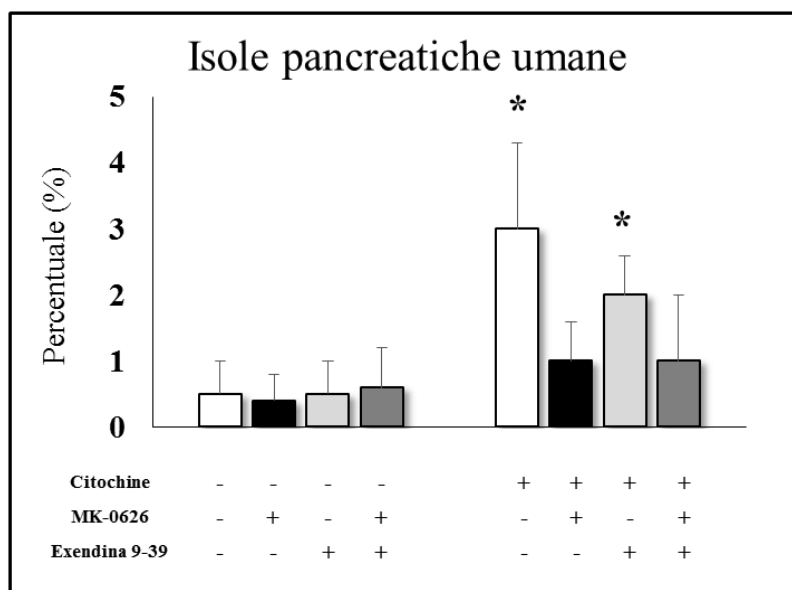


Figura 16 – percentuale di beta cellule con segni di apoptosi esposte o meno a citochine con o senza la presenza di MK-0626 e/o exendina 9-39 (pannello A: * $p < 0,05$ vs altri gruppi; pannello B: * $p < 0,05$ vs Cytokines+MK-0626; ** $p < 0,05$ vs Cytokines + MK-0626 + Exendin 9-39).

Questo risultato, in conclusione, indicava come l'inibizione della DPP-4 aveva un effetto protettivo diretto sulle beta cellule nei confronti della tossicità indotta da citochine indipendente dal GLP-1.

4 - Effetto dell'inibizione della DPP-4 nelle isole diabetiche di tipo 2

- Funzionalità e sopravvivenza

In ultima analisi, abbiamo voluto valutare se l'esposizione diretta a MK-0626 potesse influenzare anche le beta cellule di soggetti affetti da diabete di tipo 2.

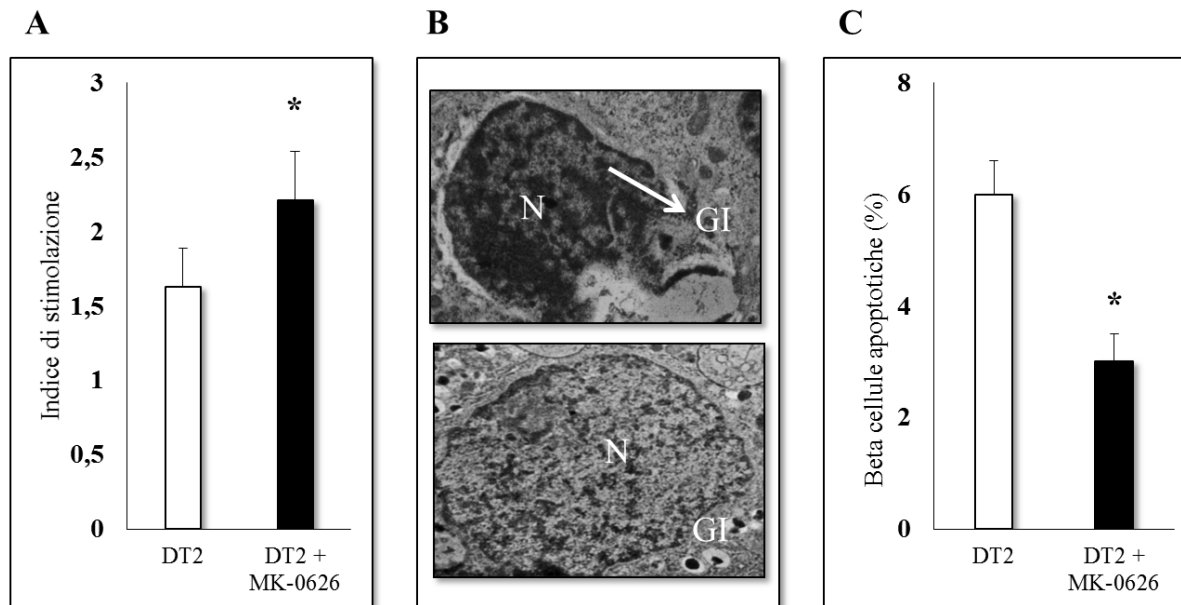


Figura 17 – Pannelli A e C: indice di stimolazione e percentuale di beta cellule con segni di apoptosi di isole DT2 trattate o meno con MK-0626 (* $p < 0,05$). Pannello B: beta cellula con segni di apoptosi in cui si possono osservare i granuli di insulina (IG) e un forte addensamento cromatinico nel nucleo (N) tipico dell'apoptosi (figura in alto) e beta cellula normale (figura in basso).

Come mostrato dalla figura 17, pannello A, l'esposizione per 24 ore a 10 μ M dell'inibitore della DPP-4 aumentava in maniera significativa il rilascio di insulina indotto da glucosio, qui mostrato come indice di stimolazione (rapporto tra rilascio insulinico in risposta a glucosio 16,7 mM e rilascio insulinico in risposta a glucosio 3,3 mM).

Al contempo, la percentuale di beta cellule con segni di apoptosi (caratterizzate da presenza di granuli di insulina, marcata condensazione della cromatina e/o vescicole) misurate tramite microscopia elettronica, diminuiva significativamente di quasi il 50% dopo l'esposizione all'inibitore.

- Ultrastruttura

In accordo a quanto osservato, il trattamento con MK-0626 induceva anche un miglioramento dell'ultrastruttura beta cellulare osservata nel diabete di tipo 2; più specificatamente, la microscopia elettronica mostrava come l'inibizione della DPP-4 fosse in grado di aumentare la densità di volume dei granuli di insulina (Figura 18, pannello A) riconoscibili dal loro nucleo denso circondato da un alone bianco (figura 17, pannello D) e diminuire quella dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico (figura 18, pannelli B-C e E-F). La linea tratteggiata in rosso indica i valori medi in isole di soggetti ND.

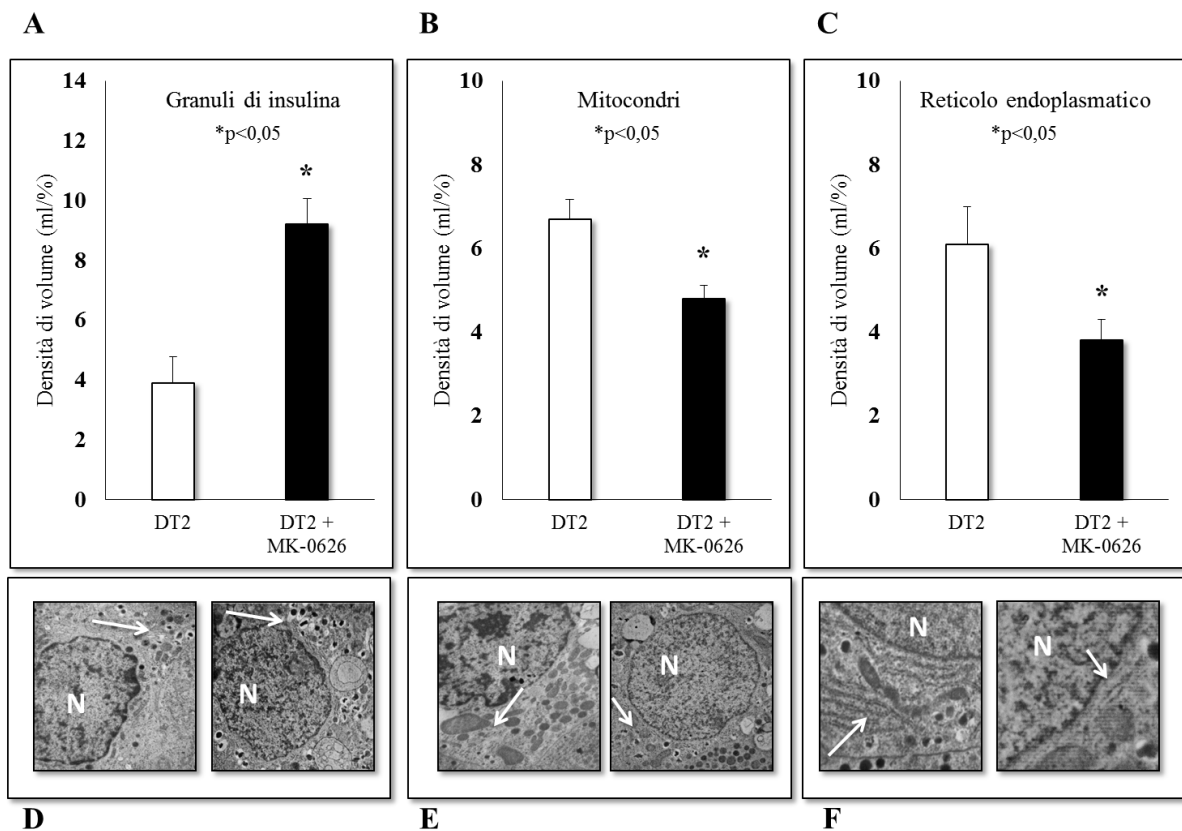


Figura 18 – Pannelli A-C: Densità di volume dei granuli di insulina, dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico di isole di DT2 esposte o meno all'inibitore della DPP-4 (*p<0,05 vs DT2). Pannelli D-F: immagini rappresentative dei dati sopra riportati, le frecce indicano rispettivamente i granuli di insulina, i mitocondri e il reticolo endoplasmatico.

DISCUSSIONE

Il GLP-1 è un ormone prodotto dalle cellule L dell'intestino con effetti pleiotropici a carico di diversi organi tra cui il pancreas, dove è in grado di influenzare la secrezione di insulina e glucagone e la proliferazione delle beta cellule (Baggio LL et al, 2007); Il suo impiego terapeutico però è limitato dal basso tempo di emivita corrispondente a 2-3 minuti perché immediatamente degradato da un enzima chiamato dipeptidil-peptidasi-4 o più semplicemente DPP-4 (Vilsboll T, 2003). La DPP-4, conosciuta anche come CD 26, è in grado di tagliare un dipeptide da molti peptidi a funzione regolatoria contenenti prolina o alanina nella penultima posizione della parte N-terminale, in particolare come detto gioca un ruolo nella degradazione e quindi nell'inattivazione del GLP-1 (Mulvihill EE et al. 2014); per questo motivo è diventata un target per la terapia del diabete. Negli anni scorsi, alcuni autori hanno mostrato come il GLP-1 possa essere prodotto, oltre che dalle cellule L dell'intestino, anche dalle cellule insulari stesse così da agire in maniera paracrina o autocrina (Ellingsgaard H, 2011; Marchetti P et al, 2012). Alla luce di questi dati il lavoro qui presentato ha voluto verificare se esistesse nell'isola anche un sistema di controllo dei livelli di GLP-1 operato dalla DPP-4. Sebbene già nel 1999 fosse stato suggerito che le cellule alfa dell'isola pancreatiche suina potessero produrre DPP-4, sono trascorsi più di 10 anni prima che tali evidenze fossero osservate anche nel pancreas umano; solo recentemente, infatti, alcuni autori hanno mostrato come la DPP-4 fosse non solo presente nelle isole pancreatiche umane ma si localizzasse principalmente nelle cellule glucagone positive (Liu L et al. 2014; Augstein P et al. 2015; Grondin G et al. 1999) dove potrebbe regolare la secrezione di GLP-1. Utilizzando una tecnica quale la microscopia elettronica con immunogold labeling, il nostro lavoro ha confermato, al pari di questi ultimi studi, la positività per DPP-4 delle cellule alfa insulari, escludendone la presenza nelle cellule contenenti somatostatina; diversamente, però, ne ha evidenziato l'espressione in una sottoclasse di cellule beta. In entrambi questi tipi cellulari, alfa e beta, non risulta localizzata sulla membrana plasmatica come normalmente osservato ma, seppur in diversi compartimenti, nel citoplasma; in particolare, nelle cellule beta sembra essere più localizzata in prossimità dei granuli di insulina, mentre nelle alfa sembra essere più sparsa nel citoplasma. La condizione diabetica sembra avere maggiore impatto sulle alfa cellule che risultano meno positive in termini di quantità; tuttavia, anche la percentuale di beta cellule DPP-4 positive risulta diminuita nel diabete di tipo 2. Questo dato è in linea con quanto pubblicato recentemente (Omar BA et al, 2014), infatti, sebbene questi autori non mostrino una riduzione di espressione, quello che comunque emerge dallo studio è una

riduzione dell'attività generale della DPP-4 insulare. Allo scopo di esplorare la funzione della DPP-4 abbiamo quindi inibito la sua attività utilizzando una molecola ancora in fase sperimentale ma che ha già mostrato buoni risultati in modelli animali, l'MK-0626 (Zhou X et al. 2015; Lim SW et al. 2015; Kohashi K et al. 2015; Mulvihill EE et al. 2015). Il trattamento con linagliptin, un inibitore della DPP-4, sembra proteggere le isole pancreatiche dal danno indotto da citochine attraverso un aumento dei livelli di GLP-1. Sebbene questo effetto protettivo fosse già stato evidenziato in isole umane esposte a citochine per 72 ore in presenza o meno dell'incrina, (Rondas D et al. 2013) i dati in nostro possesso sulla linea beta cellulare umana EndoC- β H, in grado di esprimere stabilmente DPP-4, mostrano come tale effetto possa essere dovuto anche all'azione diretta dell'inibizione di DPP-4. Un aumento della sopravvivenza in seguito a trattamento con gliptine si è osservato anche in neuroni esposti a ictus, attraverso un meccanismo indipendente dal recettore del GLP-1 (Darsalia V et al. 2016). I meccanismi alla base dell'aumento di sopravvivenza in beta cellule umane esposte a gliptine non sono ancora stati chiariti sebbene si possa ipotizzare che ci possa essere una modulazione di NF- κ B (Wang WJ et al. 2014).

Alla luce dei risultati fin qui ottenuti, anche gli effetti sulla funzionalità, sopravvivenza e ultrastruttura di beta cellule DT2 potrebbero essere dovuti in parte ad aumentato rilascio di GLP-1 ed in parte ad azione diretta dell'inibitore della DPP-4; tuttavia alcuni autori hanno recentemente mostrato come utilizzando liraglutide, un agonista del recettore del GLP-1, o MK-0626 si osservino effetti diversi sulla morfologia e sulla funzione di cellule insulari di topo (Morita A et al. 2015). Per la prima volta questo studio enfatizza la presenza della DPP-4 nelle beta cellule e il suo ruolo nella sopravvivenza beta cellulare; pur lasciando aperte ancora molte questioni il nostro lavoro, getta una nuova luce sulle possibilità terapeutiche del trattamento del diabete di tipo 2 con inibitori della DPP-4.

BIBLIOGRAFIA

- Ahren B, “What mediates the benefit associated with dipeptidyl peptidase-IV inhibition?” *Diabetologia* 48: 605-607, 2005.
- Ahren B, Gomis R, Standl E, Mills D, Schweizer A. “Twelve- and 52 week efficacy of dipeptidyl-peptidase IV inhibitor LAF237 in metformin-treated patients with type 2 diabetes”. *Diabetes care* 27:2874-2880, 2004.
- Augstein P, Naselli G, Loudovaris T, Hawthorne WJ, Campbell P, Bandala-Sanchez E, Rogers K, Heinke P, Thomas HE, Kay TW, Harrison LC. “Localization of dipeptidyl peptidase-4 (CD26) to human pancreatic ducts and islet alpha cells”. *Diabetes Res Clin Pract.* Dec;110(3):291-300, 2015
- Baggio LL, Drucker DJ “Biology of incretin: GLP-1 and GIP”. *Gastroenterology* 132:2131-2157, 2007.
- Blackman S M, Cooke D W “Diabetes”. Elsevier Inc. Revision of the previous article by D.W. Cooke, volume 1 582-592, 2004; 2013
- Cabrera SM1, Henschel AM1, Hessner MJ2. “Innate inflammation in type 1 diabetes.” *Transl Res*;167(1):214-27, 2016.
- Cefalu WT *Exp Biol Med* (Maywood). “Insulin resistance: cellular and clinical concepts”. 226(1):13-26, 2001.
- Cordero OJ1, Salgado FJ, Nogueira M. “On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients” *Cancer Immunol Immunother.*;58(11):1723-47, 2009.
- Dariush Elahi, Josephine M. Egan, Richard P. Shannon, Graydon S. Meneilly, Ashok Khatri, Joel F. Habener and Dana K. Andersen; “GLP-1 (9–36) Amide, Cleavage Product of GLP-1 (7–36) Amide Is a Glucoregulatory Peptide” *Obesity* 16, 1501–1509, 2008.
- Darsalia V, Larsson M, Lietzau G, Nathanson D, Nyström T, Klein T, Patrone C. “Gliptins-mediated neuroprotection against stroke requires chronic pre-treatment and is glucagon-like peptide-1 receptor independent”. *Diabetes Obes Metab.* Feb 2016
- Drucker, D.J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W.L., and Habener, J.F. “Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3434–3438, 1987.

- Ebert, R., Unger, H., and Creutzfeld, W. "Preservation of incretin activity after removal of gastric inhibitory polypeptide (GIP) from rat gut extracts by immunoadsorption". *Diabetologia* 24, 449–454, 1983.
- Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, Eppler E, Bouzakri K, Wueest S, Muller YD, Hansen AM, Reinecke M, Konrad D, Gassmann M, Reimann F, Halban PA, Gromada J, Drucker DJ, Gribble FM, Ehses JA, Donath MY "Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells" *Nat Med*, Oct 30;17(11):1481-9, 2011.
- Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. "Isolation and characterization of exendin 4, an exendin 3 analogue from *Heloderma suspectum* venom". *J Biol Chem* 267:7402–7405, 1992.
- Fineman MS, Bicsak TA, Shen LZ, Taylor K, Gaines E, Varns A, Kim D, Baron AD. "Effect on glycemic control of exenatide (synthetic exendin-4) additive to existing metformin and/or sulfonylurea treatment in patients with type 2 diabetes". *Diabetes Care* 26:2370–2377, 2003.
- Formoso G., Agostino Consoli, "incretine e trattamento del diabete mellito tipo 2". *IL diabete* vol 18 n 4, 2006.
- Gorrell MD. "Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders". *Clin Sci (Lond)*.;108(4):277-92. Review, 2005.
- Gribble FM, Williams L, Simpson AK, Reimann F. "A novel glucose- sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line". *Diabetes* 52: 1147–1154, 2003.
- Grondin G, Hooper NM, Le Bel D. "Specific localization of membrane dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV in secretion granules of two different pancreatic islet cells". *J Histochem Cytochem*. Apr;47(4):489-98. 1999
- 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* 140: 5356–5363, 1999.
- Hellman, B. "Actual distribution of the number and volume of the islets of Langerhans in different size classes in non-diabetic humans of varying ages". *Nature* 184 (Suppl 19): 1498-1499, 1959.

- Holst JJ. “The physiology of glucagon-like peptide 1.” *Physiol Rev.*, 87(4):1409-39, 2007.
- IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015
- Kim NH1, Yu T2, Lee DH2. “The nonglycemic actions of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors.” *Biomed Res Int.*, 2014:368703. 2014.
- Kohashi K, Hiromura M, Mori Y, Terasaki M, Watanabe T, Kushima H, Shinmura K, Tomoyasu M, Nagashima M, Hirano T. “A Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor but not Incretins Suppresses Abdominal Aortic Aneurysms in Angiotensin II-Infused Apolipoprotein E-Null Mice”. *J Atheroscler Thromb.* Nov 2015
- Kreymann, B., Ghatel, M.A., Williams, G., and Bloom, S.R. “Glucagonlikepeptide-1 7–36: A physiological incretin in man.” *Lancet* 2, 1300–1304, 1987.
- Lambeir AM1, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. “Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV.” *Crit Rev Clin Lab Sci*; 40(3):209-94, 2003.
- Li Y, Xiao J, Tian H, Pei Y, Lu Y, Han X, Liu Y, Zhong W, Sun B, Fang F, Shu H. “The DPP-4 inhibitor MK0626 and exercise protect islet function in early pre-diabetic kky mice”. *Peptides* 49:91-9, 2013.
- Lim SW, Jin L, Piao SG, Chung BH, Yang CW. “Inhibition of dipeptidyl peptidase IV protects tacrolimus-induced kidney injury”. *Lab Invest.*;95(10):1174-85. 2015
- Liu L, Omar B, Marchetti P, Ahrén B. “Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4): Localization and activity in human and rodent islets”. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 24;453(3):398-404, 2014
- Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. “An overview of pancreatic beta cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment.” *Regul pepet* ,146:4-11, 2008
- 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.*;55(12):3262-72, Dec 2012.
- Marchetti P, Scharp DW, McLearn M, et al. “Pulsatile insulin secretion from isolated human pancreatic islets.” *Diabetes* 43:827–30, 1994.

- Meneilly GS, McIntosh CH, Pederson RA, Habener JF, Gingerich R, Egan JM, Elahi D. “Glucagon-like peptide-1 (7-37) augments insulin release in elderly patients with diabetes.” *Diabetes Care* 24:964–965, 2001.
- Mojsov S, Weir GC, Habener JF. “Insulinotropin: glucagon-likepeptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas.” *J Clin Invest* 79: 616-619, 1987.
- Morita A, Mukai E, Hiratsuka A, Takatani T, Iwanaga T, Lee EY, Miki T. “Distinct effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor and glucagon-like peptide-1 receptor agonist on islet morphology and function”. *Endocrine*, 2015.
- Mulvihill EE, Drucker DJ. “Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors”. *Endocr Rev.* 2014 Dec; 35(6):992-1019. doi: 10.1210/er.2014-1035. Epub 2014 Sep 12. Review.
- Mulvihill EE, Varin EM, Ussher JR, Campbell JE, Bang KW, Abdullah T, Baggio LL, Drucker DJ. “Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 impairs ventricular function and promotes cardiac fibrosis in high fat-fed diabetic mice”. *Diabetes*. 2015 Dec 15.
- Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. “Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes.” *Diabetologia* 29: 46-52, 1986.
- Nyberg, J., Anderson, M.F., Meister, B., Alborn, A.M., Strom, A.K., Brederlau, A., Illerskog, A.C., Nilsson, O., Kieffer, T.J., Hietala, M.A., et al. ”Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation”. *J. Neurosci.* 25, 1816–1825, 2005.
- Ohyama T, Sato K, Yamazaki Y, Hashizume H, Horiguchi N, Kakizaki S, Mori M, Kusano M, Yamada M. “MK-0626, a selective DPP-4 inhibitor, attenuates hepatic steatosis in ob/ob mice.” *World J Gastroenterol.* 21;20(43):16227-35, Nov 2014.
- Omar BA, Liehua L, Yamada Y, Seino Y, Marchetti P, Ahrén B. “Dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) is expressed in mouse and human islets and its activity is decreased in human islets from individuals with type 2 diabetes”. *Diabetologia.* 2014 Sep;57(9):1876-83
- Orskov C, Wettergren A, Holst JJ. “Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable.” *Diabetes* 42:658–661, 1993.
- Piro et al. “La L cellula intestinale come target di terapia “- *Il Diabete.* vol.24 n.1, 2012.

- Rahier J, Guiot Y, Goebbels R.M, Sempoux C, Henquin J.C. “Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes.” *Diabetes Obes Metab.* 10 (Suppl 4): 32-42, 2008.
- Reimer MK, Holst JJ, Ahren B.” Long-term inhibition of dipeptidyl-peptidase IV improves glucose tolerance and preserves islet function in mice.” *Eur J Endocrinol* 146: 717-727, 2002.
- Röhrborn D, Wronkowitz N, Eckel J. “DPP4 in Diabetes”. *Frontiers in Immunology.* 6:386, 2015.
- Rondas D, Bugliani M, D'Hertog W, Lage K, Masini M, Waelkens E, Marchetti P, Mathieu C, Overbergh L. “Glucagon-like peptide-1 protects human islets against cytokine-mediated β -cell dysfunction and death: a proteomic study of the pathways involved”. *J Proteome Res.*;12(9):4193-206, Sep 6 2013
- Scott D. Edmondson, Anthony Mastracchio, Robert J. Mathvink, Jiafang He, Bart Harper, You-Jung Park, Maria Beconi, Jerry Di Salvo, George J. Eiermann, Huaibing He, Barbara Leiting,§ Joseph F. Leone, Dorothy A. Levorse, Kathryn Lyons, Reshma A. Patel, Sangita B. Patel, Aleksandr Petrov, Giovanna Scapin, Jackie Shang, Ranabir Sinha Roy, Aaron Smith, Joseph K. Wu, Shiyao Xu, Bing Zhu, Nancy A. Thornberry, and Ann E. Weber “(2S,3S)-3-Amino-4-(3,3-difluoropyrrolidin-1-yl)-N,N-dimethyl-4-oxo-2-(4-[1,2,4]triazolo[1,5-a]-pyridin-6-ylphenyl) butanamide: A Selective r-Amino Amide Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes “ *J. Med. Chem.*, 49, 3614-3627, 2006.
- Shah P, Ardestani A, Dharmadhikari G, et al. “The DPP-4 inhibitor linagliptin restores β -cell function and survival in human isolated islets through GLP-1 stabilization.” *J Clin Endocrinol Metab*, 98:E1163–E1172, 2013.
- Steck, A.K. and Rewers, M.J. “Genetics of type 1 diabetes.” *Clin Chem.*, 57: 176–185, 2011.
- Vilsbøll T, Agersø H, Krarup T, Holst JJ. “Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects”. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jan;88(1):220-4.
- Wang WJ, Chang CH, Sun MF, Hsu SF, Weng CS. “DPP-4 inhibitor attenuates toxic effects of indoxyl sulfate on kidney tubular cells”. *PLoS One.* 9(4):e93447. 22 Apr 2014

- Wang X, Zhou J, Doyle ME, Egan JM “Glucagon-like peptide-1 causes pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic b-cells by a cyclic AMP/PKA dependent mechanism.” *Endocrinology* 142:1820-1827, 2001.
- Young AA, Gedulin BR, Bhavsar S, Bodkin N, Jodka C, Hansen B, Denaro M. “Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*).” *Diabetes* 48:1026–1034, 1999.
- Zander, M., Madsbad, S., Madsen, J.L., and Holst, J.J. “Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study.” *Lancet* 359, 824–830, 2002.
- Zhou X, Huang CH, Lao J, Pocai A, Forrest G, Price O, Roy S, Kelley DE, Sullivan KA, Forrest MJ. “Acute hemodynamic and renal effects of glucagon-like peptide 1 analog and dipeptidyl peptidase-4 inhibitor in rats”. *Cardiovasc Diabetol.* 14:29; 2015.