



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA SPERIMENTALE-
INDIRIZZO METABOLICO

XXI CICLO

TOPI TRANSGENICI SOVRAESPRIMENTI LA VARIANTE G972R DI IRS-1
UMANO PRESENTANO UNA RIDOTTA AZIONE E SECREZIONE INSULINICA

Nome e Cognome del dottorando

Federica Tornei

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Prof. Massimo Federici

Coordinatore: Prof. Renato Lauro

INDICE

LISTA PAROLE CHIAVE	6
SOMMARIO	7
ABSTRACT	8
1. L'OMEOSTASI DEL GLUCOSIO	9
1.1 Azione e trasduzione del segnale insulinico.....	10
1.1.1 <i>La secrezione insulinica</i>	10
1.1.2 <i>Il recettore dell'insulina</i>	12
1.1.3 <i>Le proteine substrato del recettore insulinico (IRS)</i>	13
1.1.4 <i>L'associazione della PI-3K con le proteine IRS e l'attivazione di Akt/PKB.</i>	15
1.1.5 <i>Il trasporto del glucosio</i>	17
1.1.6 <i>Azione mitogena dell'insulina</i>	18
1.2 L'insulino-resistenza e la sua relazione con l'obesità.....	19
1.2.1 <i>L'insulino-resistenza, la disfunzione β-cellulare e la patogenesi del Diabete di Tipo 2</i>	19
1.2.2 <i>La Sindrome Metabolica</i>	23
2. MODELLI MURINI DI INSULINO-RESISTENZA	28
2.1 Manipolazione del genoma murino.....	29
2.1.1 <i>I topi Knock-out</i>	29
Gene-targeting condizionato.....	29
2.1.2 <i>I topi transgenici</i>	32
Generazione di topi transgenici.....	32
Il sistema Tetraciclina-Inducibile.....	35
Il sistema Cre-Lox.....	37
2.2 Modelli di topi Knock-out per gli intermedi del segnale insulinico...39	
2.2.1 <i>Topi Knock-out per il recettore insulinico</i>	39
2.2.2 <i>Topi knock-out per le proteine IRSs</i>	41
2.2.3 <i>Topi knock-out per altri intermedi della via di trasmissione del segnale insulinico.</i>	
Topi deficitari di Akt.....	45
Topi deficitari della proteina Glut4.....	46

3.IL POLIMORFISMO IRS-1 G972R E LA PATOGENESI DEL DIABETE DI TIPO 2	47
3.1 I principali polimorfismi di IRS-1.....	47
3.2 Il polimorfismo G972R IRS-1.....	49
3.3 Meccanismi molecolari tramite i quali il polimorfismo G972R di IRS-1 altera l'azione insulinica.....	51
3.3.1 <i>Ridotta associazione di p85 con IRS-1 dopo stimolo in vitro con insulina</i>	51
3.3.2 <i>Il polimorfismo G972R compromette l'azione dell'insulina, in modo specifico per i diversi tipi cellulari</i>	53
Riduzione <i>in vitro</i> del trasporto del glucosio nelle cellule muscolari....	53
Riduzione <i>in vitro</i> della secrezione insulinica e della sopravvivenza nelle β -cellule.....	55
Riduzione <i>in vitro</i> dell'attività insulino-dipendente di eNOS nelle cellule endoteliali umane.....	57
3.3.3 <i>La riduzione dell'azione dell'insulina da parte di G972R IRS- I comincia dal recettore insulinico</i>	58
4. SCOPO DELLO STUDIO	61
5. MATERIALI E METODI	63
5.1 Il modello animale G972R.....	63
5.1.1 <i>Generazione di topi sovraespressanti G972R-IRS-1 umano</i> ...	63
5.1.2 <i>Estrazione di DNA genomico dalla coda dei topi</i>	63
5.1.3 <i>Genotipizzazione mediante Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)</i>	64
5.1.4 <i>Procedure analitiche</i>	64
Diete utilizzate.....	64
Misura della glicemia e dell'insulinemia.....	65
IPGTT ed ITT.....	65
5.2 Stimolazione <i>in vivo</i> con insulina.....	66
5.3 Preparazione degli estratti proteici tissutali, degli immunoprecipitati e analisi Western Blot.....	66
5.4 Estrazione dell'RNA totale e analisi quantitativa dell'espressione genica mediante Real-Time PCR.....	68
5.5 Purificazione delle isole pancreatiche e valutazione della secrezione insulinica.....	69

5.6	Analisi istologica del pancreas.....	71
5.7	Valutazione del contenuto di insulina.....	71
5.8	Trasporto del glucosio <i>in vivo</i> durante un IPGTT.....	71
5.9	Incorporazione del 2-DOG in glicogeno epatico durante un IPGTT.....	73
5.10	Analisi statistica.....	74
6.	RISULTATI.....	74
6.1	La variante G972R di IRS-1 umano è sovraespressa ubiquitariamente nei topi transgenici Tg972.....	74
6.2	Caratterizzazione metabolica dei topi Tg972 a 3 e 6 mesi di età.....	75
6.3	Le possibili cause del fenotipo riscontrato nei topi Tg972 a sei mesi di età: insulino-resistenza periferica o ridotta secrezione insulinica?.....	78
6.3.1	<i>Analisi della morfologia del pancreas.....</i>	78
6.3.2	<i>Valutazione del contenuto totale di insulina nel pancreas.....</i>	79
6.3.3	<i>Valutazione della secrezione insulinica in vitro.....</i>	80
6.3.4	<i>Valutazione dell'insulino-resistenza periferica.....</i>	80
6.4	Effetto della variante G972R sui meccanismi molecolari alla base del fenotipo riscontrato nei tessuti target dell'insulina.....	82
6.4.1	<i>Valutazione in vivo della fosforilazione di IRS-1 a livello dei residui di tirosina 941 e 989.....</i>	82
6.4.2	<i>Valutazione in vivo dell'associazione di p85 con IRS-1.....</i>	84
6.4.3	<i>Valutazione dell'eventuale sovraespressione compensatoria di IRS-2 nei Tg972.....</i>	86
6.4.4	<i>Valutazione della fosforilazione in vivo di Akt nei tessuti bersaglio dell'insulina.....</i>	87
	Muscolo e tessuto adiposo.....	87
	Fegato.....	88
6.4.5	<i>Valutazione in vivo della ridotta attivazione di GSK-3 a livello epatico.....</i>	89
6.5	Interazione tra il polimorfismo G972R e l'obesità nella patogenesi dell'insulino-resistenza.....	90
6.5.1	<i>Caratterizzazione metabolica dei topi Tg972 HFD a 3 e 6 mesi di età.....</i>	90
6.5.2	<i>Livelli di espressione dei geni legati all'obesità nei due genotipi.....</i>	92
7.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	94

8.BIBLIOGRAFIA.....	100
9.RINGRAZIAMENTI.....	104

LISTA PAROLE CHIAVE

Segnale insulinico

Variante genica

Insulino-resistenza

Intolleranza al glucosio

Obesità

Modello animale

SOMMARIO

La sostituzione Gly (G)→Arg (R) a livello del codone 972 (G972R) è il più diffuso tra tutti i polimorfismi noti a carico di IRS-1, il principale substrato del recettore insulinico; i risultati degli studi volti a confermare l'associazione tra questo polimorfismo e la patogenesi del Diabete di tipo 2 sono discordanti; *in vitro* è però evidente come questa variante determini la riduzione dell'azione dell'insulina in modo specifico per il tipo cellulare e, a livello molecolare, una più debole associazione tra IRS-1 e la PI3-K. In questo studio, abbiamo voluto valutare *in vivo* l'incidenza del polimorfismo G972R sulla patogenesi del Diabete di tipo 2: abbiamo quindi generato un modello murino sovraesprimente tale variante (i topi Tg972), studiandone il fenotipo anche in relazione all'età o ad un fattore ambientale come l'obesità, valutando l'efficienza dell'azione dell'insulina nel fegato, nel muscolo e nel tessuto adiposo e l'omeostasi del glucosio nei topi sottoposti ad una dieta normale o ricca di grassi. I topi transgenici sottoposti a dieta normale diventano intolleranti al glucosio ed insulino-resistenti in modo dipendente dall'età, la trasduzione del segnale insulinico risulta più debole rispetto ai WT; inoltre, nonostante non vi siano differenze nella morfologia del pancreas rispetto ai topi di controllo, la secrezione insulinica dei transgenici è gravemente ridotta ad ogni concentrazione di glucosio utilizzata. Al termine della dieta grassa, il peso corporeo e del tessuto adiposo dei topi Tg972 aumenta sensibilmente rispetto ai WT; la dieta grassa, inoltre, accelera l'insorgenza di una grave intolleranza al glucosio e dell'insulino-resistenza nei transgenici. Alla luce di questi risultati, riteniamo che i topi Tg972 siano un ottimo modello per studiare l'interazione tra fattori genetici ed ambientali nella patogenesi del Diabete di tipo 2 e per la sperimentazione di nuove terapie.

ABSTRACT

Molecular scanning of human insulin receptor substrate (*Irs*) genes revealed a single *Irs1* prevalent variant, a glycine to arginine change at codon 972 (G972R); previous *in vitro* studies had demonstrated that the presence of this variant results in an impaired activation of the insulin signalling pathway, while human studies gave controversial results regarding its role in the pathogenesis of insulin resistance and related diseases. To address *in vivo* the impact of this IRS-1 variant on whole body glucose homeostasis and insulin signalling, we have generated transgenic mice overexpressing it (Tg972) and evaluated insulin action in the liver, skeletal muscle and adipose tissue and assessed glucose homeostasis both under a normal diet and a high-fat diet. We found that Tg972 mice developed age-related glucose and insulin intolerance and hyperglycemia, with insulin levels comparatively low. Glucose utilization and insulin signalling were impaired in all key insulin target tissues in Tg972 mice. There were no differences in pancreatic morphology between Tg972 and wild-type mice, however when insulin secretion was evaluated in isolated islets, it was significantly reduced in Tg972 mice islets at any glucose concentration tested. Under a high-fat diet, Tg972 mice had increased body and adipose tissue weight, and were more prone to develop diet-induced glucose and insulin intolerance. So, we believe that Tg972 mice may represent a useful model to elucidate the interaction between genetic and environmental factors in insulin resistance pathogenesis. Furthermore, they may become an important tool to test novel tailored therapies.

1. L'OMEOSTASI DEL GLUCOSIO.

Le concentrazioni plasmatiche di glucosio, che oscillano normalmente tra 4 e 7 mM, sono controllate strettamente dall'equilibrio tra l'assorbimento del glucosio alimentare da parte dell'intestino, la sua produzione endogena da parte del fegato e dall'efficienza con cui è metabolizzato dai tessuti periferici. Il bilancio tra l'utilizzo e la produzione del glucosio è mantenuto da due ormoni antagonisti, l'insulina ed il glucagone, che sono secreti rispettivamente dalle cellule β e α del pancreas: se la glicemia scende, come durante il digiuno, il pancreas secreta glucagone che promuove la liberazione del glicogeno nel sangue sotto forma di glucosio, oltre a favorire la mobilizzazione dei grassi dal tessuto adiposo e il consumo dei grassi stessi e delle proteine come fonte energetica; in questo modo, il glucagone predispone tutto l'organismo al risparmio del glucosio. L'insulina è invece un ormone anabolico, che agisce quando la glicemia sale, ed il cui ruolo è quello di inibire la gluconeogenesi epatica, favorire l'accumulo dei substrati nel tessuto adiposo, nel muscolo e nel fegato, stimolando la lipogenesi, la sintesi del glicogeno e delle proteine ed inibendo la lipolisi, la glicogenolisi ed il catabolismo proteico. Quindi, al contrario del glucagone, l'insulina spinge la cellula ad utilizzare i carboidrati come fonte di energia. Oltre a regolare l'omeostasi del glucosio, l'insulina ha anche un'azione sulla proliferazione cellulare e lo sviluppo tissutale (fig.1).

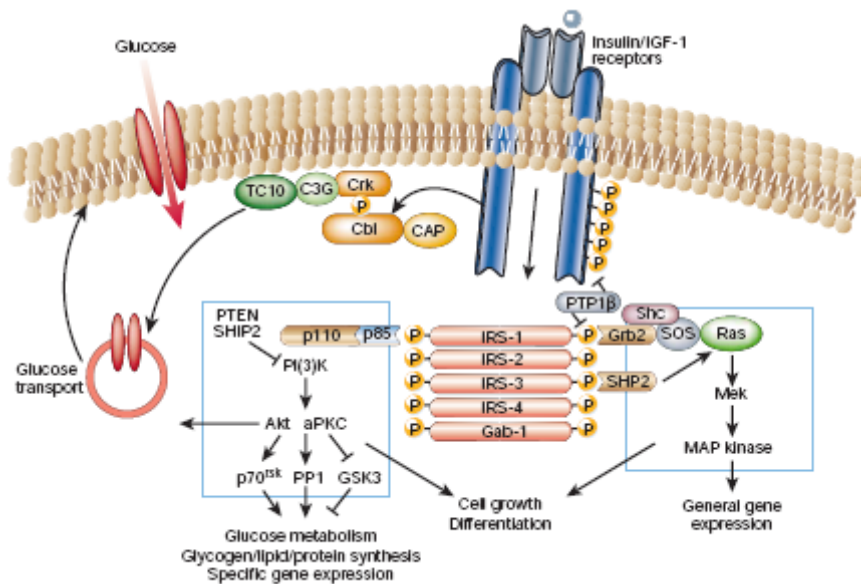


Fig.1 Traduzione del segnale insulinico. Via della fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K), via CAP/Cbl/TC10 e via dipendente dalla chinasi attivata dai mitogeni (MAP-kinase) [12].

1.1 Azione e traduzione del segnale insulinico.

1.1.1 La secrezione insulinica.

La secrezione insulinica da parte delle cellule β del pancreas avviene in risposta all'aumento della concentrazione ematica di glucosio, che determina, all'interno di queste cellule, l'aumento del rapporto ATP/ADP, la chiusura dei canali K^+ ATP-dipendenti e la depolarizzazione della membrana; conseguentemente, si aprono i canali Ca^{+2} voltaggio-dipendenti e l'aumento delle concentrazioni citoplasmatiche del calcio stesso determina l'esocitosi di granuli contenenti insulina, la cui disponibilità immediata fa sì che la prima fase della sua secrezione cominci appena uno o due minuti dopo l'aumento delle concentrazioni di glucosio, per una durata complessiva di circa otto minuti. Il rilascio dell'insulina durante la prima fase è cospicuo e raggiunge un picco dopo tre o quattro minuti. La seconda fase si svolge in sinergia con la prima, comincia subito dopo la

decrecita del picco ed è caratterizzata da un rilascio via via crescente dell'ormone, fino ad un plateau dopo ulteriori 25-30 minuti [1]. La seconda fase della secrezione insulinica è regolata da vie indipendenti dai canali K^+ -ATP-dipendenti; i meccanismi che ne sono alla base, supportati dai dati sperimentali, sono essenzialmente tre: il glucosio, mediante l'anaplerosi, induce un aumento del citrato mitocondriale (che viene poi esportato nel citosol), del citrato citoplasmatico e del malonil coenzimaA citosolico; l'inibizione della Carnitina Palmitoil Trasferasi 1 (CPT1), indotta dal malonil coenzimaA, e la mancata ossidazione degli acidi grassi nel mitocondrio, porterebbe a delle accresciute quantità di acil-coenzimaA a lunga catena nel citosol: potrebbero essere queste molecole segnale ad attivare la seconda fase della secrezione. E' stato inoltre osservato che il glucosio induce un aumento di glutammato mitocondriale, che viene esportato nel citosol e qui attiva la secrezione, innescando il sistema dei canali Ca^{+2} voltaggio-dipendenti. Il terzo meccanismo, che è il più accreditato sperimentalmente, prevede un cambiamento delle concentrazioni intracellulari di ATP, ADP, GTP e GDP in risposta a quella del glucosio ed in particolare sarebbe il cambiamento del rapporto tra le rispettive concentrazioni (ATP/ADP e GTP/GDP) ad attivare anche la seconda fase della secrezione insulinica [1]. Non è ancora chiaro quale sia, tra questi, il meccanismo prevalente.

1.1.2 *Il recettore dell'insulina.*

Il recettore dell'insulina (IR) appartiene ad una famiglia di recettori di membrana dotati di attività tirosina-chinasica a cui appartengono anche il recettore del fattore di crescita simile all'insulina (IGF-1-R) e il recettore correlato al recettore insulinico (IRR). Tali recettori sono formati da un eterotetramero proteico, costituito da due subunità extracellulari α e due

subunità transmembrana β legate da ponti disolfuro, che agiscono come enzimi allosterici: in particolare la subunità α inibisce l'attività tirosina-chinasica della subunità β . Il legame dell'insulina alla subunità α ne inibisce l'azione repressiva, determinando la trasmissione di un segnale attraverso la membrana plasmatica che attiva il dominio intracellulare delle subunità β , inducendo in esso un cambiamento conformazionale, che ne favorisce ulteriormente l'attività chinasica. Il recettore va quindi incontro ad una serie di autofosforilazioni, in particolare cis- e trans-fosforilazioni, per cui alcuni residui di tirosina sono fosforilati dall'attività fosfotransferasica della stessa subunità, mentre altri sono substrati della subunità opposta. I residui di tirosina identificati come siti di autofosforilazione sono sette, si trovano nel dominio citoplasmatico della subunità β e sono coinvolti in reazioni diverse, a seconda della loro localizzazione: la fosforilazione delle tirosine carbossi-terminali (tyr¹³²⁸ e tyr¹³³⁴) media l'azione mitogena dell'insulina, quelle situate nella regione juxta-membrana (tyr⁹⁶⁵ e tyr⁹⁷²) partecipano al legame col substrato, mentre le tirosine fosforilate in prossimità della regione di attivazione del dominio tirosina-chinasico (tyr¹¹⁵⁸, tyr¹¹⁶² e tyr¹¹⁶³) regolano l'attività catalitica della subunità β [2, 3]. L'autofosforilazione attiva la subunità tirosina-chinasica del recettore insulinico attraverso una serie di cambiamenti conformazionali nella subunità β , che facilitano il legame dell'ATP, il legame con i substrati e la loro fosforilazione: in assenza di stimolo da parte dell'insulina, il dominio di attivazione del recettore insulinico è situato all'interno del sito attivo ad azione chinasica, cosa che limita l'accesso e l'interazione con l'ATP e i diversi substrati. La trans-fosforilazione delle tirosine 1158, 1162 e 1163 all'interno del sito di attivazione ne destabilizza la conformazione e ne determina uno *shift*, che consente l'accesso dell'ATP e dei diversi substrati [3]. Poiché IR, IGF-1 e

IRR possono formare ibridi funzionali, una mutazione che abbia effetto inibitorio su uno dei tre recettori, può inibire anche l'attività degli altri [4].

1.1.3 *Le proteine substrato del recettore insulinico (IRS).*

I principali substrati di IR e IGF-1R appartengono alla famiglia delle proteine IRS (substrato del recettore insulinico), di cui IRS-1 è stata la prima ad essere identificata ed a cui appartengono anche IRS-2, IRS-3, IRS-4, Gab-1 e p62^{dok}. Le proteine IRS presentano alcuni domini comuni indispensabili alle loro funzioni: un dominio PH (Pleckstrin Homology) ammino-terminale ed un dominio PTB (Phospho Tyrosine Binding - in grado di legare le fosfotirosine), che mediano le interazioni proteina-lipidi o proteina-proteina; residui multipli di tirosina in posizione carbossi-terminale che creano siti di legame per proteine dotate di domini SH2; regioni ricche di proline che interagiscono con domini proteici WW e SH3; regioni ricche di serine e treonine che possono regolare le funzioni della proteina in generale, determinando altre reazioni proteina-proteina [5]. I domini PH e PTB in particolare mediano le interazioni specifiche con IR e IGF-1R: il dominio PTB si lega a domini fosforilati NPXY del recettore; il residuo di tirosina (Y) di questo dominio, la tirosina⁹⁶⁰, è fondamentale per la fosforilazione di IRS-1 [6, 7]. Le mutazioni a carico di questo residuo, situato nella regione juxtamembrana di IR, compromettono la fosforilazione in tirosina sia di IRS-1 che di Shc, un altro importante substrato del recettore insulinico [8]; al contrario, le mutazioni a carico degli altri due residui di tirosina della regione juxtamembrana di IR (Y⁹⁵³ e Y⁹⁷²), non alterano la fosforilazione dei due substrati. Il dominio PH è un modulo in grado di interagire con fosfolipidi, peptidi acidi o proteine specifiche ed è presente in molte proteine che, proprio a seguito della possibilità di interazione con i lipidi, vanno incontro a cambiamenti nella

loro localizzazione subcellulare, nella conformazione, nello stato di attivazione e nell'interazione con altre proteine; tale dominio è necessario per la stabilità del legame di IRS-1 al recettore insulinico [9] e, insieme al dominio PTB, per la sua fosforilazione da parte del recettore stesso. IRS-1 contiene 21 siti putativi di fosforilazione, molti dei quali sono localizzati in motivi costituiti da sequenze amminoacidiche che legano i domini SH2 delle proteine substrato, incluse la subunità regolatoria p85 della Fosfatidil-Inositolo-3 chinasi (PI3K, la principale proteina che interagisce con IRS-1) e GRB-2 [10]. In particolare, i residui di fosforilazione in tirosina 941 e 989, costituiscono due siti di legame ad alta affinità per p85 [11]. Nella porzione carbossi-terminale di IRS-1 ed IRS-2 si trovano circa 20 potenziali siti di fosforilazione in tirosina, che legano e attivano specifiche proteine "effettrici", che includono enzimi (PI3K, SHP-2, la chinasi Fgn Src-simile) o molecole adattatrici (tra cui GRB-2, NCK, CRK e SHB) [12]. Le osservazioni sperimentali evidenziano i ruoli ben definiti di IRS-1 ed IRS-2 nella regolazione dell'espressione di geni chiave del metabolismo lipidico e glucidico: la riduzione del livello di espressione di IRS-1 determina un incremento dell'mRNA dei geni gluconeogenici PEPCK, G6Pasi (glucosio-6-fosfatasi) e F1,6BP (Fruttosio 1,6 Bisfosfatasi), che può dipendere dall'incremento di HNF-4 α (Fattore Nucleare Epatico 4 α , un fattore di trascrizione che coordina, insieme ai fattori di trascrizione forkhead, l'attivazione dei geni gluconeogenici stessi), conseguente all'attenuazione dell'espressione di IRS-1. IRS-2 invece sembra avere più importanza nella regolazione della lipogenesi, alla luce della relazione inversa tra i livelli proteici di IRS-2 e la trascrizione di SREBP-1-C (Proteina 1-C legante l'Elemento di Regolazione degli Steroli), un fattore di trascrizione che ha un ruolo preponderante nella regolazione dell'espressione di geni codificanti per i mediatori della sintesi dei lipidi [13]. IRS-3 si trova prevalentemente nel tessuto adiposo e

presenta elevata omologia con le altre due proteine-substrato a livello dei domini PH e PTB: ciò ne conferma l'attività di intermedio tra IR e la PI3K, con cui, negli adipociti, si associa più rapidamente di IRS-1 ed IRS-2 [14]. La sovraespressione di IRS-3, negli adipociti di ratto, determina un incremento delle molecole di GLUT4 a livello della membrana cellulare [14]: nonostante ciò, l'assenza di IRS-3 non preclude una normale omeostasi ed un normale trasporto del glucosio. L'omologia dei domini PTB e PH con quelli delle precedenti proteine IRS si ritrova anche in IRS-4 che risulta, *in vitro*, in grado di legare il dominio SH2 della PI3K; come nel caso di IRS-3, la sovraespressione di IRS-4 negli adipociti di ratto determina un incremento delle molecole di GLUT4 a livello della membrana cellulare. Inoltre, la sovraespressione di IRS-4 umano nelle cellule 32D ematopoietiche prive di altre IRSs induce la proliferazione (ma non la sopravvivenza) cellulare in seguito a stimolo con insulina o IGF-I. La funzione di Gab-1 non è nota; il suo dominio PH, omologo a quelli di IRS-1 ed IRS-2, è contiguo ad una breve porzione carbossi-terminale che presenta siti multipli di fosforilazione in tirosina, alcuni dei quali in grado di legare la PI3K. Gab-1 non presenta il dominio PTB, cosa che indebolisce il suo legame con IR [5]. I domini PH e PTB di p62^{dok} sono piuttosto diversi da quelli di IRS-1, IRS-2 e Gab-1; p62^{dok} è l'unica proteina IRS a non regolare la PI3K [5].

1.1.4. *L'associazione della PI-3K con le proteine IRS e l'attivazione di Akt/PKB.*

Le proteine IRS collegano i recettori IR e IGF-1 R alla PI3K, un dimero composto da una subunità catalitica dal peso di 110 KDa, associata in modo non covalente ad una subunità regolatoria di 85 KDa (p85). PI3K è attivato quando motivi fosforilati YMXM di IRS-1 occupano entrambi i

domini src homology-2 (Sh2) della subunità regolatoria ed è in grado di generare degli specifici fosfolipidi che sono riconosciuti dal dominio PH di molte proteine, tra cui Akt/PKB, il suo principale substrato. Akt necessita, per la sua completa attivazione, della fosforilazione a livello del residuo di serina⁴⁷³ e del residuo di treonina³⁰⁸ ed interagisce con il fosfatidilinositolo_{3,4}bisfosfato (PI_{3,4}P₂) ed il fosfatidilinositolo_{3,4,5}trisfosfato (PI_{3,4,5}P₃), prodotti dalla PI3K. Tali fosfolipidi sono fondamentali per la sua attivazione: la loro interazione con il dominio PH di Akt ne modifica la conformazione e fa sì che Akt sia reclutato a livello della membrana cellulare, dove il complesso proteico Rictor-mTOR (Target della rapamicina proprio dei mammiferi) la fosforila a livello della ser⁴⁷³ e ne facilita la successiva fosforilazione, a livello della treonina³⁰⁸, da parte di PDK1 (ser/thr Chinasi Dipendente dal dominio Pleckstrin Homology) [15]. Uno dei principali substrati di Akt è la Glicogeno Sintetasi Chinasi-3 (GSK-3), che partecipa alla regolazione dell'omeostasi del glucosio regolando la sintesi del glicogeno. I livelli di glicogeno (sintetizzato principalmente nel fegato e nel muscolo) sono strettamente regolati dall'azione dell'enzima Glicogeno Sintetasi (GS) che lo sintetizza e dal suo antagonista, l'enzima Glicogeno Fosforilasi. In condizioni basali, GSK-3 inibisce la sintesi del glicogeno bloccando l'attività di GS tramite fosforilazione inibitoria. In seguito allo stimolo dovuto all'azione dell'insulina, l'attivazione della via IRSs/PI3K/Akt porta alla fosforilazione inibitoria di GSK-3 a livello dei residui regolatori ser 21 (sull'isoforma α di GSK-3) e ser 9 (sull'isoforma β). Ciò attiva la GS e la sintesi del glicogeno [16].

1.1.5 *Il trasporto del glucosio.*

Gli zuccheri esosi circolanti entrano nelle cellule attraverso un trasporto facilitato, mediato da proteine transmembrana appartenenti ad una famiglia di 12 elementi tra loro correlati (GLUTs) e specifiche per i diversi tessuti: GLUT1 è espresso principalmente nei globuli rossi e sulle pareti dell'endotelio dei vasi sanguigni cerebrali; GLUT 3 è invece espresso nei neuroni ed insieme a GLUT1 consente al glucosio di superare la barriera emato-encefalica. GLUT2 è il trasportatore del glucosio a bassa affinità, presente nel fegato, nell'epitelio intestinale (è il principale regolatore dell'assorbimento del glucosio in questa sede), nel rene e nelle β -cellule pancreatiche, dove ha un ruolo di sensore del glucosio. GLUT4 è espresso principalmente nel muscolo e nel tessuto adiposo ed è l'isoforma maggiormente espressa fra i trasportatori GLUT; GLUT5 è un trasportatore di fruttosio proprio dell'intestino ed i trasportatori GLUT 8 e 9 sembrano funzionare durante lo sviluppo della blastocisti (GLUT8) e nel cervello e nei leucociti (GLUT9). Essendo GLUT4 l'isoforma principale, su di essa si è concentrata la maggior parte degli studi [17]. A livello basale, le vescicole contenenti GLUT4 vanno incontro ad un lento ma continuo riciclo tra la membrana cellulare e diversi compartimenti intracellulari e solo il 5% della proteina totale GLUT4 è localizzato sulla membrana; in risposta ad uno stimolo acuto (2-3 minuti) da parte dell'insulina, la velocità di esocitosi di GLUT4 aumenta notevolmente, contestualmente ad una leggera diminuzione dell'endocitosi, così che circa il 50% della proteina totale è ora localizzata sulla membrana. La velocità di esocitosi diminuisce allorché cessa il segnale dell'insulina ed il traffico delle vescicole torna ai livelli basali [18]. La traslocazione delle vescicole contenenti GLUT4 a livello di membrana avviene in modo Akt-dipendente: Akt fosforila un suo substrato dal peso di 160 KDa, la Proteina

Attivante la Rab-GTPasi (GAP), detta AS160; l'attivazione delle proteine Rab da parte di AS160 determina la mobilizzazione delle vescicole verso la membrana. Alternativamente, è stato proposto che AS160 si associ direttamente con un'altra proteina, la proteina IRAP, e la fosforilazione insulino-dipendente di AS160 ne determinerebbe la dissociazione da GLUT4 e porterebbe all'attivazione delle proteine Rab, che appartengono alla superfamiglia delle piccole GTPasi RAS e sono degli importanti regolatori della formazione, della mobilità e della fusione vescicolare a livello di membrana [18].

1.1.6 Azione mitogena dell'insulina

IRS-1, fosforilato dal recettore insulinico, è in grado di indurre l'attivazione, oltre che della PI3K, anche della proteina Grb-2 (Proteina legante il Recettore del fattore di crescita-2), che è legata all'attivazione di Ras; a quest'ultima consegue l'attivazione della via delle MAPK (Proteine Attivate da Mitogeni): tale via è implicata nella regolazione della sintesi proteica, poiché promuove la traduzione dell'mRNA proprio nelle fasi iniziali della formazione della catena peptidica. Lo stimolo ad iniziare la traduzione proteica in risposta all'insulina si ha al momento della formazione del complesso di preinizio 43S (quando il tRNA recante la metionina si lega alla piccola subunità ribosomiale) e quando l'mRNA si lega ad esso, quindi nelle fasi di inizio ed elongazione della sintesi proteica. Entrambe queste fasi sono regolate da specifici fattori di inizio eucariotici (rispettivamente eIF-2B ed eIF-4E), attivati dall'insulina: eIF-2B, in particolare, è fosforilato ed attivato *in vitro* dall'enzima GSK-3 [19]. Oltre alla MAPK, anche la chinasi p70S6 (p70^{S6K}), attivata dalla PI3K [20], ha un ruolo ben definito nell'induzione della proliferazione cellulare, attivata dall'insulina. Dopo un trattamento di 24 ore con insulina su cellule

muscolari, si riscontra un aumento dei livelli di incorporazione di (³H)-timidina, del contenuto di DNA, dell'espressione della ciclina D1 e della proporzione di cellule che si trovano nella fase S + G2/M del ciclo cellulare: tale effetto viene meno inibendo p70^{S6K} (tramite rapamicina o utilizzando l'inibitore della PI3K, LY294002) [19]. Inoltre, l'insulina inibisce l'apoptosi in adipociti e β-cellule siero-deprivate, riducendo l'espressione della proteina proapoptotica Bcl-x_S [21] e attivando la proteina antiapoptotica Bcl-x_L [22]. L'ormone regola anche la degradazione proteica, determinando la riduzione dei livelli dell'mRNA dell'ubiquitina e dell'enzima E₂ legante l'ubiquitina e riducendo l'attività del proteasoma 20S: ciò suggerisce che l'insulina possa inibire le vie proteolitiche ATP-ubiquitina-dipendenti [19].

1.2 L'insulino-resistenza e la sua relazione con l'obesità.

1.2.1 L'insulino-resistenza, la disfunzione β-cellulare e la patogenesi del Diabete di Tipo 2.

Il Diabete di tipo 2 si sviluppa quando le β-cellule pancreatiche non riescono a produrre sufficiente insulina per supplire all'accresciuta domanda da parte dei tessuti periferici; la maggiore richiesta di insulina è dovuta ad una condizione nota come "insulino-resistenza", cioè la ridotta capacità dei tessuti periferici di rispondere all'azione dell'ormone, cui segue l'iperglicemia cronica. Inizialmente le beta-cellule riescono a compensare l'insulino-resistenza attraverso l'ipersecrezione di insulina e la glicemia risulta normale o pressoché normale; in seguito, tale compensazione porta ad una fase di esaurimento delle beta-cellule, in cui l'insulina secreta non è più sufficiente e si sviluppa il Diabete (fig. 2). Come può svilupparsi l'insulino-resistenza? Un contributo determinante è

dato dal tessuto muscolare: nei soggetti diabetici si riscontra una riduzione del 30-40% nel trasporto del glucosio in condizioni di iperinsulinemia [23] e la riduzione del 60% nella sintesi del glicogeno dopo un clamp iperinsulinemico-euglicemico [24]. Una cospicua porzione del glucosio introitato dall' organismo è immagazzinata come glicogeno [24]: la riduzione della sua sintesi è dovuta presumibilmente ad una minore o mancata funzione degli enzimi che ne catalizzano le reazioni limitanti: la Glicogeno-Sintasi, l'Esocinasi o gli enzimi che regolano il trasporto del glucosio [25]. Gli acidi grassi liberi circolanti (FFA) giocano un ruolo determinante nella riduzione del trasporto del glucosio a livello muscolare e ciò li identifica come una delle cause più importanti dell'insulino-resistenza. In alcune popolazioni di soggetti diabetici si riscontra una grave inibizione del trasporto del glucosio in seguito a infusione di lipidi, in particolare ad elevate concentrazioni di FFA (2mM), rispetto ai soggetti sani; nonostante ciò, non c'è contestuale accumulo di Glucosio-6-fosfato, l'intermedio tra la sintesi del glicogeno e l'esocinasi: ciò ha portato ad escludere che l'elevata concentrazione di FFA abbia un effetto specifico sulla sintesi. E' ormai evidente [26] come gli acidi grassi liberi possano inibire l'azione della PI3K, da cui dipende la traslocazione a livello di membrana del trasportatore GLUT-4, attivando la Proteina Chinasi C- θ , che è in grado di ridurre la fosforilazione in tirosina di IRS-1 e così anche la sua funzione. La concentrazione di FFA influenza anche l'inibizione della gluconeogenesi epatica da parte dell'insulina [23]; in realtà, è molto importante valutare le differenze nella dinamica della lipolisi dei diversi tipi di adipe per comprendere la loro azione sulla funzione del fegato: in particolare, quello viscerale è l'unico ad avere una connessione diretta col fegato tramite la vena porta e risulta fortemente aumentato nei soggetti affetti da obesità nella parte superiore del corpo; in questo tipo di soggetti, la lipolisi nel tessuto adiposo subcutaneo è fortemente diminuita poichè, al

contrario del tessuto adiposo viscerale, l'azione lipolitica delle catecolammine risulta diminuita ed è invece maggiore l'effetto antilipolitico dell'insulina [27]. L'incapacità da parte delle β -cellule di secernere sufficiente insulina in risposta all'aumento della concentrazione ematica del glucosio può essere dovuta, tuttavia, anche a cause genetiche e/o ambientali: oltre all'insufficiente espansione della massa delle beta-cellule o all'incapacità della massa preesistente di supplire alla maggiore richiesta di insulina, l'età, l'attività fisica, la dieta, il fumo, l'obesità e la distribuzione del grasso corporeo sono infatti in grado di influenzare la sensibilità all'ormone e la sua secrezione. Le anomalie geniche che possono predisporre alla ridotta funzione delle β -cellule si ritrovano nei soggetti affetti da MODY (Diabete mellito non-insulino dipendente ad esordio giovanile), che possono sviluppare la malattia senza insulino-resistenza, mentre l'insulino-resistenza non determina il T2D senza la disfunzione beta-cellulare; in effetti la maggioranza dei soggetti diabetici presenta entrambe le caratteristiche [28].

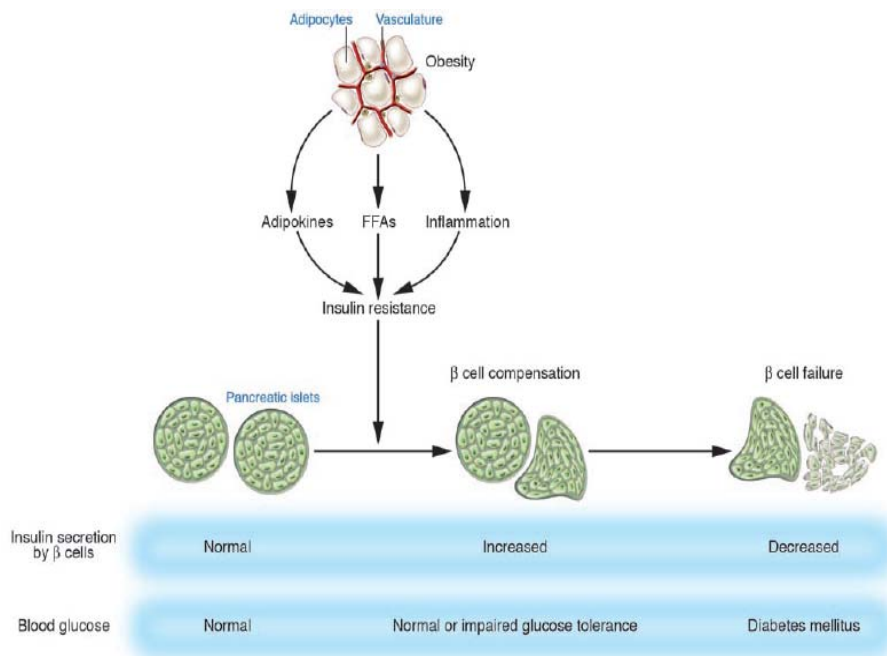


Fig.2 Lo sviluppo del Diabete di Tipo 2: l'insulino-resistenza associata con l'obesità è indotta dalle adipochine, dagli acidi grassi e dall'infiammazione cronica nel tessuto adiposo. Le β -cellule pancreatiche compensano l'insulino-resistenza attraverso l'ipersecrezione di insulina; quando non riescono più a sostenere questa elevata produzione, si sviluppa il Diabete [33].

Il glucosio è in grado di stimolare la proliferazione beta-cellulare, la secrezione di insulina e la produzione di ATP; nonostante ciò, l'iperglicemia cronica può provocare desensibilizzazione al glucosio, esaurimento delle beta-cellule ed infine riduzione della secrezione e delle riserve di insulina, un fenomeno noto come "glucotossicità"; i meccanismi che ne sono alla base prevedono la formazione di prodotti finali di glicosilazione, di specie reattive dell'ossigeno, l'attivazione di membri della famiglia delle MAPK, l'inibizione della trascrizione del gene dell'insulina e della biosintesi della proinsulina [29]. L'insulina stessa può ripristinare la sopravvivenza delle beta-cellule: l'aggiunta di insulina esogena ad isole messe in coltura ad elevate concentrazioni di glucosio ne inibisce l'apoptosi [30]; gli elementi della famiglia degli IGF (l'insulina, IGF-1 e IGF-2) in effetti stimolano la sopravvivenza delle beta-cellule e ne inducono la proliferazione, attraverso l'attivazione delle MAPK, della PI-3K e di mTOR, ottenuta tramite IRS-2, la cui sovraespressione inibisce l'apoptosi delle beta-cellule indotta dal glucosio [31]. Anche la concentrazione plasmatica di FFA è in grado di influenzare la secrezione insulinica, mediante un effetto "lipotossico" valutato come misura della secrezione dopo infusione lipidica su pancreas di ratti [32]. L'azione inibitoria sulla secrezione insulinica da parte dei grassi, a sottolineare l'effetto "lipotossico", è stata confermata da un miglioramento dei livelli della secrezione dopo incubazione di isole pancreatiche, ottenute da ratti Zucker diabetici grassi (ZDF), con il farmaco antidiabetico Troglitazone, che è in grado di ridurre il contenuto di trigliceridi nelle isole pancreatiche [32]. Questi ratti sono noti per essere iperglicemici e presentano gravi scompensi nella secrezione insulinica, dovuti ad una percentuale di trigliceridi nelle beta-cellule significativamente più alta (ben il 50%) rispetto ai ratti di controllo. Lo stile di vita proprio dei Paesi occidentali, che prevede troppo spesso una dieta ipercalorica e la mancanza di

esercizio, ha accresciuto l'incidenza non solo del Diabete, ma anche dell'obesità: tra il 60 ed il 90% dei casi di T2D sembrano essere causati dall'obesità stessa [33].

1.2.2 *La Sindrome Metabolica.*

L'insulino-resistenza, oltre a determinare la predisposizione a sviluppare il Diabete di Tipo 2, è una caratteristica integrante della “sindrome metabolica”, che include l'intolleranza al glucosio, l'ipertrigliceridemia, bassi livelli di colesterolo HDL, l'ipertensione, l'aterosclerosi precoce e, ultima ma non meno importante, l'obesità. Gli adipociti ed il tessuto adiposo hanno un ruolo centrale nella patogenesi dell'insulino-resistenza associata all'obesità, di cui ormai è nota anche l'associazione con alcuni tipi di cancro e patologie legate alla risposta immunitaria, come l'asma; lo studio dei meccanismi che determinano l'insulino-resistenza in una condizione di obesità, mostra come il tessuto adiposo non sia una riserva inerte di grassi e quindi di energia, ma un vero e proprio organo endocrino, che, una volta espanso, è capace di produrre e secernere specifiche citochine proinfiammatorie, dette “adipochine”, alcune delle quali sono implicate nella patogenesi dell'insulino-resistenza. Le adipochine sono prodotte principalmente dal tessuto adiposo ed in minima parte anche da altri tessuti (fig.3) [34, 47]. Adiponectina e leptina sono le adipochine prodotte in maggior quantità; le altre sono il Fattore di Necrosi Tumorale α (TNF- α), l'Interleuchina 6 (IL-6), l'Interleuchina 1 (IL-1), la Proteina Chemoattraente i Monociti (MCP-1, nota anche come CCL2), la resistina ed infine alcuni mediatori del processo di coagulazione del sangue, come l'Inibitore di tipo 1 dell'Attivatore del Plasminogeno (PAF-1) ed alcuni fattori del complemento. La leptina, che aumenta in modo proporzionale alla massa grassa, oltre a regolare le funzioni neuroendocrine e l'omeostasi

energetica (determinando il senso di sazietà), l'ematopoiesi e l'angiogenesi, è un importante mediatore dei processi infiammatori e legati alla risposta immunitaria [35]; essa presenta inoltre un'analogia strutturale con altre citochine proinfiammatorie come IL-6, IL-12 ed il Fattore Stimolante le Colonie di Granulociti. La sua funzione principale resta comunque il controllo dell'appetito; i modelli murini deficitari del gene codificante la leptina (ob/ob) o il suo recettore (db/db) sono obesi e pertanto utilizzati per la ricerca su questo tipo di patologia: questi topi presentano difetti nell'immunità umorale e cellulo-mediata. I livelli serici di adiponectina sono fortemente ridotti in individui con obesità viscerale ed in uno stato di insulino-resistenza, a cui l'adiponectina è inversamente correlata. E' noto inoltre il suo ruolo anti-infiammatorio sulle cellule endoteliali attraverso l'inibizione dell'espressione delle molecole di adesione indotte dal TNF [36]: i topi deficitari (KO, knock-out) per l'adiponectina presentano livelli più elevati dell'mRNA di TNF e maggiori concentrazioni plasmatiche del TNF stesso rispetto ai topi di controllo, o wild-type (WT) [37]. L'adiponectina induce anche la produzione di importanti citochine anti-infiammatorie, come IL-10 e l'Antagonista del Recettore di IL-1 (IL1-RA) nei monociti, nei macrofagi e nelle cellule dendritiche (DCs) umani [38]. Negli animali obesi, il trattamento con adiponectina migliora l'iperglicemia, i livelli degli acidi grassi liberi del plasma e quindi la sensibilità all'insulina [39, 40], mentre la sua assenza in modelli murini sottoposti a dieta grassa determina insulino-resistenza [36]. I livelli circolanti di adiponectina aumentano sensibilmente *in vivo* dopo l'attivazione del recettore nucleare PPAR γ [41, 42]: la mancanza dell'adiponectina non solo fa diminuire la sensibilità epatica all'insulina, ma anche la risposta agli agonisti di PPAR γ , ad indicare quanto sia importante il suo contributo nel miglioramento della risposta all'insulina dovuto a questo fattore di regolazione trascrizionale [43].

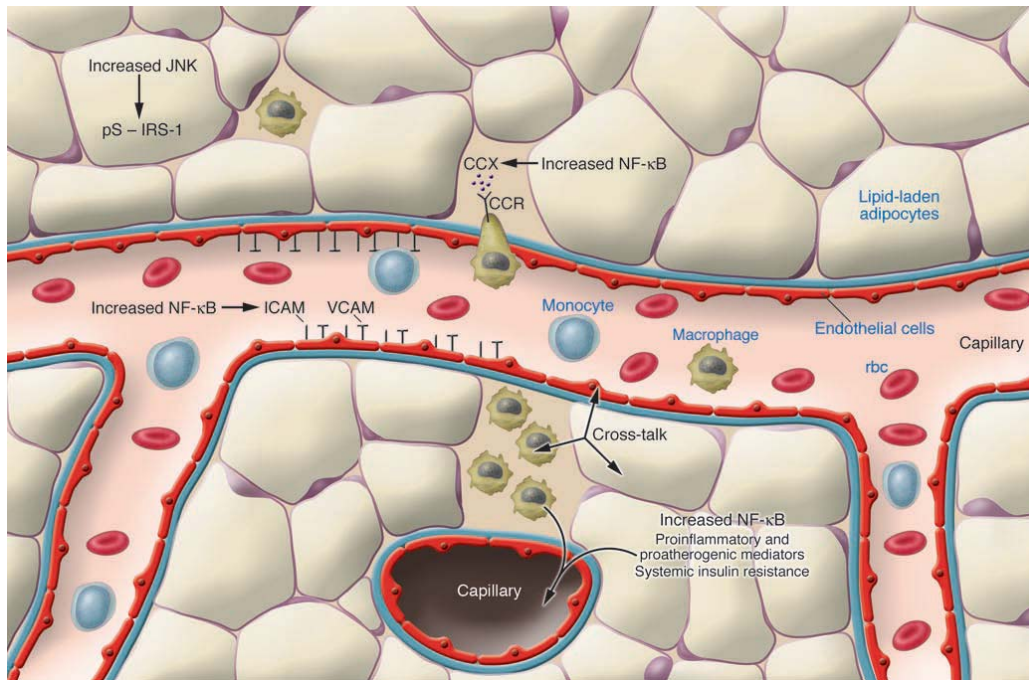


Fig.3 Possibili meccanismi di attivazione dell'inflammatione nel tessuto adiposo.

Una dieta ipercalorica o l'obesità determinano un eccessivo accumulo di acidi grassi nel tessuto adiposo, che a sua volta causa uno stato di stress cellulare e l'attivazione di JNK e di NF-κB: queste attivano la fosforilazione di alcune proteine substrato e la produzione di citochine infiammatorie, tra cui TNF- α , IL-6, la leptina e la resistina e chemochine come MCP-1 ed altri mediatori proaterogenici, tra cui PAI-1. Le molecole di adesione endoteliale (ICAM-1 e VCAM-1) e quelle chemoattraenti (chiamate CCX) legano rispettivamente le integrine e recettori delle chemochine (CCR), sulla superficie dei monociti per reclutarli nel tessuto adiposo. I monociti che differenziano in macrofagi producono ulteriori citochine infiammatorie e chemochine [47].

Infine, l'adiponectina stimola la β -ossidazione degli acidi grassi negli epatociti di ratto e riduce il livello di espressione di SREBP1C [34]. Mentre la resistina nel topo è sintetizzata solo negli adipociti, nell'uomo è prodotta anche nel muscolo, nel pancreas e nelle cellule mononucleate come i macrofagi. In quest'ultimo tipo di cellule, in particolare, la resistina incrementa l'espressione di TNF- α e dell'Interleuchina 6, in modo NFκB-dipendente [44]; inoltre, la resistina induce anche un aumento dell'espressione della Molecola di Adesione alle Cellule Vascolari (VCAM-1) e della Molecola di Adesione InterCellulare (ICAM-1), che modulano l'adesione dei leucociti alle pareti delle arterie nelle fasi precoci

dell'aterosclerosi, di CCL2 e dell'Endotelina 1 (un vasocostrittore coinvolto nell'ipertensione e nelle patologie cardiovascolari) nelle cellule endoteliali umane. Una serie di osservazioni sperimentali indica il TNF- α come uno degli intermedi chiave nella relazione di causa-effetto tra infiammazione ed insulino-resistenza: il TNF- α risulta infatti sovraespresso nel tessuto adiposo di animali obesi ed insulino-resistenti mentre la sua somministrazione in ratti normali ne induce l'insulino-resistenza [45]. A livello molecolare, il TNF- α è in grado di inibire *in vivo* la fosforilazione in tirosina di IR ed IRS-1 nel tessuto adiposo e nel muscolo dei ratti [45]; parallelamente, la neutralizzazione del TNF- α , ottenuta tramite una proteina di fusione immunoglobulina G-recettore TNF solubile (TNFR-IgG), determina un aumento dei livelli di fosforilazione dei due intermedi del segnale insulinico, in particolare nel muscolo: questo risultato è di grande importanza, in quanto indica che, sebbene il TNF- α non sia direttamente espresso in questo tessuto, può agire su di esso *in vivo* con un'azione endocrina o paracrina ed in effetti, l'espansione della massa grassa dovuta all'obesità non solo stimola una produzione sempre maggiore di TNF- α da parte degli adipociti, ma comporta anche una maggiore contiguità tra queste cellule e le fibre muscolari. In realtà, anche i livelli degli acidi grassi liberi circolanti, che costituiscono un'importante fonte di energia per i muscoli, possono essere determinati dall'azione che il TNF- α esercita sull'inibizione della lipolisi mediata dall'insulina. La sensibilità all'insulina e la tolleranza al glucosio, verificate tramite IPGTT (IntraPeritoneal Glucose tolerance test, il test da carico per il glucosio) ed ITT (Insulin Tolerance Test, il test da carico per l'insulina) in topi KO per il TNF- α sottoposti a dieta grassa, risultano maggiori rispetto ai wild-type [46] e l'utilizzo di topi ob/ob e deficitari di entrambi i recettori del TNF (p75 e p55) evidenzia un miglioramento della sensibilità all'insulina rispetto agli ob/ob di controllo, anche se entrambi i gruppi di animali

risultano insulino-resistenti. I topi obesi $\text{TNF-}\alpha^{-/-}$ mostrano anche livelli di acidi grassi ematici inferiori agli obesi wild-type e ciò potrebbe di nuovo essere il risultato diretto della perdita degli effetti lipolitici del $\text{TNF-}\alpha$ nel tessuto adiposo oppure, analogamente, di un recupero dell'efficienza dell'insulina nell'inibire la lipolisi in assenza del $\text{TNF-}\alpha$ [46]. Il tessuto adiposo degli individui obesi contiene anche, nella sua frazione stromale-vascolare, un elevato numero di macrofagi, che sono una fonte addizionale di mediatori solubili nel tessuto adiposo; anche se questi macrofagi sembrano essere i principali produttori di TNF , gli adipociti producono almeno un terzo della concentrazione di IL6 circolante nei soggetti obesi. CCL2 , prodotto dagli adipociti, è uno dei fattori che determina l'infiltrazione dei macrofagi nel tessuto adiposo ed una volta che questi siano presenti ed attivi, possono perpetuare un circolo vizioso che porta al reclutamento di ulteriori macrofagi e produzione di citochine proinfiammatorie [34].

2. MODELLI MURINI DI INSULINO-RESISTENZA.

Il Diabete è una patologia per cui c'è chiaramente una predisposizione genetica, la cui penetranza può variare e che può dipendere da più geni; per poter definire i potenziali difetti genetici che concorrono allo sviluppo della malattia, l'attenzione della ricerca negli ultimi decenni si è focalizzata sull'identificazione e la caratterizzazione delle molecole coinvolte nella via di trasduzione del segnale insulinico e certamente molti dei progressi fatti sono da attribuire all'utilizzo di modelli murini: poichè il ruolo di molti degli intermedi del segnale era stato inizialmente identificato *in vitro*, lo scopo è stato quello di studiare l'azione dell'insulina anche *in vivo*, generando topi con delle specifiche delezioni a carico di uno o più geni codificanti per le proteine di interesse. Quindi, essendo la natura del Diabete poligenica, oltre a topi deficitari di un singolo gene sono stati creati topi con delezioni "combinata" a carico di più geni [48]. E' da notare che le differenze specie-specifiche, relative al ruolo che i diversi tessuti hanno nel controllo del metabolismo, sono molte: i topi neonati dipendono essenzialmente dal fegato per le risorse energetiche [49], mentre gli esseri umani dipendono anche dal muscolo e dal tessuto adiposo, che, rispetto ai topi, è presente in maggior quantità. Anche le differenze nell'attività compensatoria delle β -cellule è dovuta alle differenze nello sviluppo pre- e post-natale tra le due specie. Nei topi, il primo periodo dopo la nascita vede un'intensa proliferazione β -cellulare fino ad una massa ottimale che si raggiunge tra le 3 e le 4 settimane di vita; al contrario, negli esseri umani il gene dell'insulina comincia ad essere trascritto già ad 8 settimane di gestazione e, a 12-16 settimane, si osservano i primi clusters cellulari che risultano organizzati in isole funzionanti a partire dalla venticinquesima settimana, dopo la quale l'insulinemia comincia ad innalzarsi: gli esseri umani presentano quindi, alla

nascita, una maggiore riserva di beta-cellule per compensare all'eventuale insulino-resistenza.

2.1 Manipolazione del genoma murino.

2.1.1. I topi Knock-out.

- Gene-targeting condizionato.

Ogni esperimento di gene-targeting prevede due punti fondamentali: l'utilizzo della ricombinazione omologa per introdurre la mutazione genica desiderata in cellule staminali embrionali (cellule ES) pluripotenti e la capacità delle stesse, dopo l'iniezione nell'embrione precoce e l'aggregazione con esso, di colonizzare tutti i suoi tessuti, portando alla nascita di una chimera. Con questa tecnica (fig.4) è in effetti possibile bloccare la funzione di un gene (knock-out), inserire geni o frammenti di DNA in un sito specifico (knock-in), introdurre mutazioni puntiformi o riarrangiamenti cromosomali nella linea germinale del topo. I principali problemi correlati alle mutazioni introdotte nella linea germinale sono la morte in fase embrionale, dovuta allo spegnimento di geni che possono essere necessari alla sopravvivenza oppure il fenotipo dovuto al knock-out di un gene non necessario alla sopravvivenza, ma che potrebbe essere silenziato anche in tessuti indesiderati: la soluzione è stata generare topi che recassero la delezione specifica solo in determinati tessuti ed ad un certo stadio di sviluppo; l'utilizzo di ricombinasi sito-specifiche, appartenenti alla famiglia delle α -integrasi Cre e Flp è stato un modo di ottenere nuovi modelli murini funzionanti e funzionali a questo scopo. Il sistema Cre-Lox è stato il primo sistema di ricombinazione sito-specifica, volto ad introdurre mutazioni geniche che fossero inducibili in modo condizionato. Basandosi sull'attività enzimatica della ricombinasi Cre ("Causa della Ricombinazione"), isolata originariamente nel batteriofago P1, è stato

possibile ottenere ricombinazioni sito-specifiche in sequenze fiancheggiate dai cosiddetti “siti LoxP” (Locus di cross-over P1”). In modo del tutto simile, la ricombinasi F₁p può determinare la ricombinazione tra i siti di riconoscimento FRT (“Target di Ricombinazione di F₁p”). Entrambi questi enzimi possono determinare la rimozione di una sequenza, la duplicazione, l’inversione, l’integrazione e la traslocazione dei cromosomi (fig.5). Quindi, le modificazioni inducibili di uno specifico gene sono ottenute generalmente attraverso la ricombinazione omologa nelle cellule ES, in corrispondenza degli specifici siti di riconoscimento; ma per ottenere dei topi recanti mutazioni nulle ma condizionate è necessario che i siti di riconoscimento per le ricombinasi siano posizionati accanto ad una parte essenziale del gene di interesse, senza comprometterne la funzionalità: ciò si ottiene posizionando le sequenze LoxP/FRT accanto al promotore o nella sequenza intronica accanto all’esone di interesse (fig. 6).

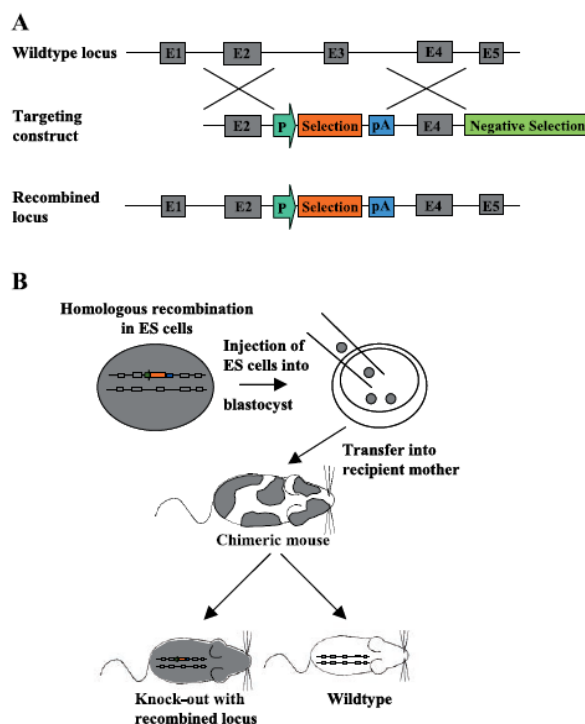


Fig.4 Generazione di un modello murino recante una mutazione nulla, attraverso ricombinazione omologa nelle cellule staminali embrionali (ES). **A:** generazione del knock-out: il locus WT, qui rappresentato con 5 esoni (E1-E5), ricombina col costrutto target, determinando l’inserzione del marker di interesse e la delezione di E3. P: promotore che regola l’ espressione del marker da selezionare; PA: segnale di poliadenilazione. **B:** le cellule ES, dopo la ricombinazione omologa, sono iniettate in una

blastocisti ,che è poi inserita in una madre pseudo gravida. Le cellule ES contribuiscono alla formazione di tutti i tessuti, determinando generazione di topi chimera [50].

Le ricombinasi Cre e Flp possono essere utilizzate per ottenere l'inattivazione della funzione genica in modo specifico per il tipo cellulare: a questo scopo, topi derivati da cellule ES in cui siano stati introdotti i siti di riconoscimento Lox o FRT possono essere incrociati con altri topi esprimenti una delle due ricombinasi sotto il controllo di un promotore tessuto- o cellula-specifico, consentendo la rimozione del segmento genico in dipendenza dalla fase di sviluppo o dallo specifico tessuto (fig. 7).

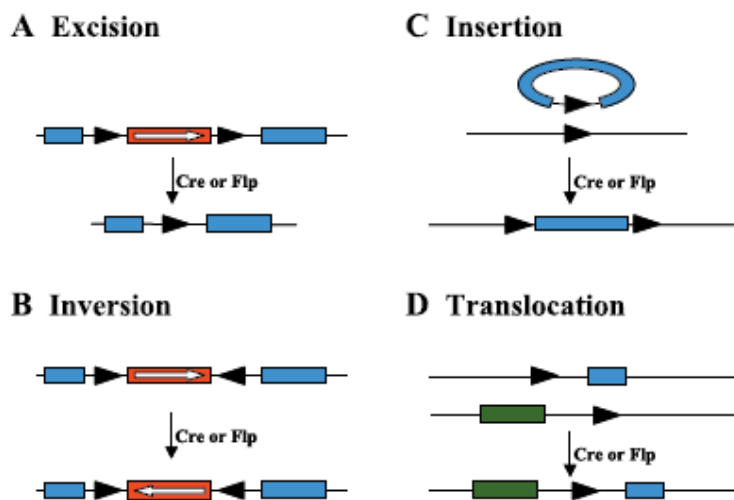


Fig. 5 Possibili mutazioni geniche mediate dalle ricombinasi Cre o Flp. A: taglio di DNA genomico ottenuta fiancheggiando la sequenza da eliminare con siti di ricombinazione unidirezionale. B: l'inversione richiede che la sequenza di interesse sia fiancheggiata da siti di ricombinazione bidirezionali. C: un singolo sito di ricombinazione all'interno del genoma murino può essere utilizzato come accettore molecolare per l'inserimento di una sequenza di DNA che contenga un secondo sito di ricombinazione. D: traslocazioni intercromosomali possono essere ottenute inserendo i singoli siti di ricombinazione sulla sequenza da excidere. I triangoli neri indicano i siti di ricombinazione; le frecce bianche indicano l'orientamento della sequenza da rimuovere [50].

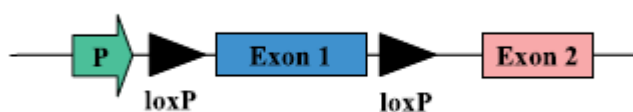


Fig.6 Inattivazione genica locus-specifica mediata da ricombinasi. P: promotore locus-specifico; LoxP:siti di riconoscimento per Cre (triangoli neri) [50].

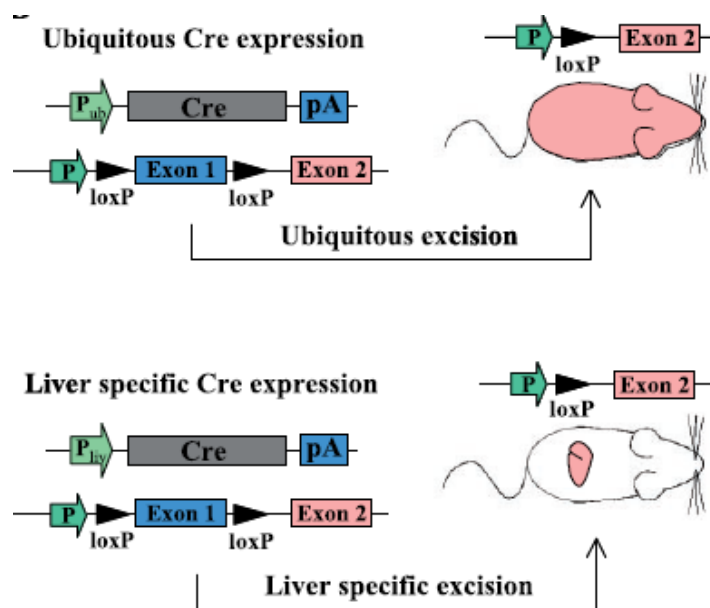


Fig.7 Inattivazione genica ubiquitaria o tessuto-specifica mediata da ricombinasi. Delezione generica dell'esone 1 utilizzando un promotore ubiquitario per regolare l'espressione di Cre (pannello superiore) e delezione tessuto-specifica dell'esone 1 attraverso l'espressione di Cre direttamente nel fegato (pannello inferiore). Pub: promotore ubiquitario; Pliv: promotore specifico per il fegato [50]

2.1.2 I topi transgenici.

- Generazione di topi transgenici.

Il costrutto transgenico, che si utilizza per valutare nel topo il ruolo di specifici prodotti genici, o di forme proteiche dominanti negative o di proteine disegnate specificamente per lo studio d'interesse, consiste di un promotore specifico a cui seguono la sequenza da esprimere ed un segnale di poliadenilazione; il promotore può determinare l'espressione tessuto-specifica del gene o circoscriverla ad un preciso stadio di sviluppo. Il costrutto è iniettato nel pronucleo di embrioni unicellulari di topo, impiantati in seguito nelle madri pseudo-gravide: nella progenie viene quindi verificata l'integrazione del transgene (fig.8) [50]. Teoricamente, una volta iniettato nel genoma murino, il prodotto del transgene sarà espresso; poiché però l'inserzione del gene è casuale, si possono verificare variazioni del suo funzionamento dovuti al riarrangiamento dinamico della struttura della cromatina dopo il suo inserimento, oppure si può avere espressione ectopica

del transgene quando questo viene trascritto in tessuti in cui non dovrebbe esprimersi a causa di elementi cis-regolatori attivi di altri loci genici giustapposti [51]. Esperimenti in cui sono state analizzate la struttura e la funzione di specifici loci genici hanno permesso di stabilire i criteri per un fruttuoso inserimento del transgene: un locus genico completo, così definito per la propria struttura e per avere l'insieme degli elementi di cis-regolazione essenziali per l'attivazione trascrizionale, risulta resistente agli effetti di posizione genica e tutte le sue copie risulteranno trascrizionalmente attive; al contrario, la perdita di uno di tali elementi determina la dipendenza dalla posizione assunta nel genoma ed un'efficienza di trascrizione non più ottimale [51], per via dell'instabilità del complesso stesso. In questo caso,

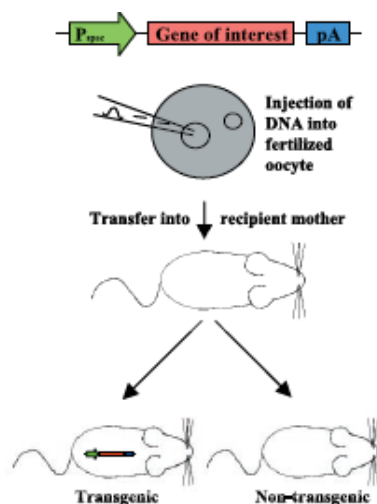


Fig.8 Rappresentazione schematica della generazione dei topi transgenici. Il costrutto transgenico di interesse contiene un promotore specifico (Pspec), il gene di interesse ed un segnale di poliadenilazione (pA). Il costrutto è iniettato negli oociti fertilizzati, trasferiti in seguito nelle madri pseudo-gravide [50].

non tutte le copie del transgene in un singolo cluster multi-copia saranno trascrizionalmente attive (fig.9). Infine, per ovviare all'espressione del transgene in tutti i tessuti od in uno stadio troppo precoce, sono state messe appunto tecniche che consentono l'induzione spaziotemporale del transgene stesso; tali metodologie di induzione sono rapide e reversibili, per consentire di studiare e comprendere le diverse fasi dello sviluppo del topo o della sua

malattia e permettono di ottenere livelli di espressione del gene abbastanza elevati da produrre un effetto facilmente rilevabile ed analizzabile. L'utilizzo di un transattivatore trascrizionale, attivato da un ligando e che legasse a sua volta il DNA, permette di ottenere l'espressione del transgene in vivo in modo condizionato. A questo scopo vengono utilizzate due linee di topi: la prima, costituita da topi detti "effettori", esprime il transattivatore trascrizionale inducibile dal ligando; la seconda, la linea di topi cosiddetti "responder", è invece capace di esprimere specificamente il transgene dopo attivazione da parte del transattivatore. L'incrocio tra queste due linee porta alla nascita di topi doppi-transgenici, capaci di esprimere il transgene in modo condizionato (fig.10)

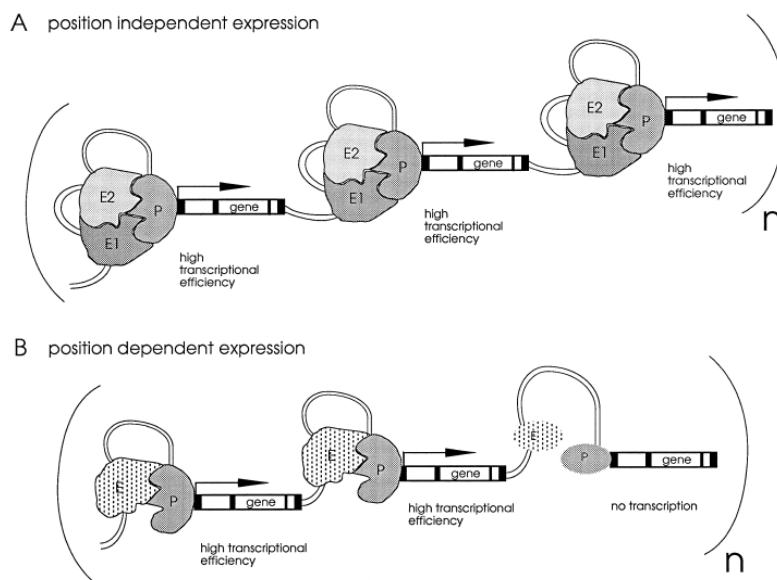


Fig.9 Modello di effetti di posizione cromosomiali. A Interazione di vari complessi enhancer (E1, E2) con il promotore (P) su un cluster di più copie di un transgene: il transgene è espresso indipendentemente dalla posizione nel genoma e tutte le copie sono trascrizionalmente attive. B L'interazione con un costrutto che manchi di un elemento essenziale di *cis*-regolazione diventa instabile e solo una parte delle copie del transgene è trascrizionalmente attiva; la proporzione di copie attive rispetto a quelle inattive dipende dalla posizione nel genoma [51].

- Il Sistema Tetraciclina-Inducibile.

I sistemi di regolazione Tetraciclina-dipendente (*Tet systems*) si basano su due componenti: un transattivatore controllato dalla tetraciclina (tTA o rtTA) ed un promotore tTA- o rtTA-dipendente, che controlla l'espressione di un cDNA a valle (fig 11A). La proteina tTA è una proteina di fusione, che contiene il repressore dell'operone di resistenza alla Tetraciclina Tn10 di *Escherichia Coli* e la porzione carbossi-terminale della proteina 16 dell'herpes simplex virus (VP16). Il promotore dipendente da tTA deriva dalla fusione tra il promotore dell'RNA polimerasi II e sette sequenze note dell'operone *tetO*. Tale fusione trasforma il repressore *tet* in un forte attivatore trascrizionale nelle cellule eucariotiche [52]. In assenza della Tetraciclina e dei suoi derivati (come l'antibiotico doxiciclina), tTA si lega alle sequenze *tetO*, determinando l'attivazione trascrizionale del promotore

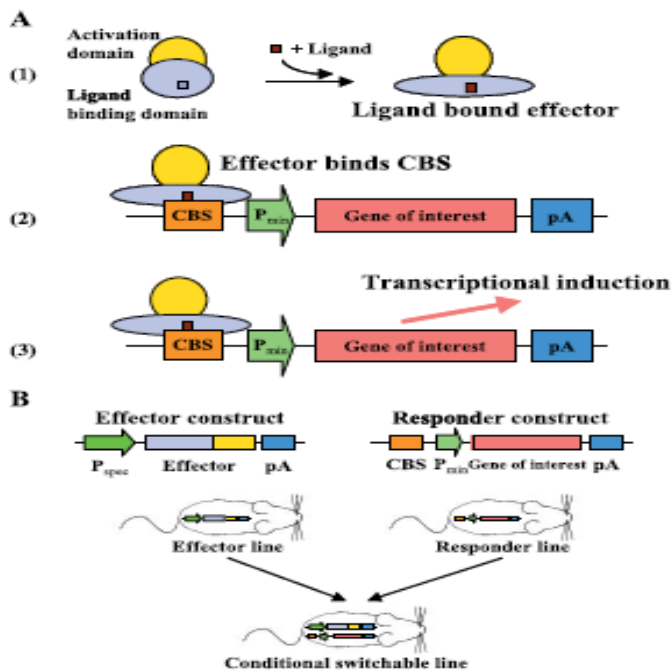


Fig.10 Transgenesi condizionale. **A:** controllo binario dell'espressione genica condizionale a livello molecolare. 1) L'attivazione dell'effettore mediata da un ligando prevede un dominio di attivazione (giallo) ed un dominio di legame al ligando (celeste). 2) Interazione specifica dell'effettore legato al ligando tramite il proprio sito di legame specifico (CBS) . 3) Induzione trascrizionale di un gene di interesse. **B** :per la generazione di topi transgenici condizionati, sono necessari due tipi indipendenti di topi geneticamente modificati: l'uno che esprima un effettore dipendente da un ligando, l'altro che esprima il transgene in modo condizionato, sotto il controllo dell'effettore. Il loro incrocio porta alla nascita di un topo doppio-

transgenico che ha in sé tutti gli elementi necessari a regolare l'espressione del gene di interesse. Pmin: promotore minimale, pA: segnale di poliadenilazione, Pspec: promotore specifico [50].

tTA-dipendente. In presenza di doxiciclina, tTA non può interagire col proprio target e non si verifica la trascrizione. Il sistema *tet* che utilizza tTA è chiamato *tet*-OFF, poiché ciò che si ottiene è la riduzione della trascrizione tetraciclina o doxiciclina-dipendente. Poiché la tetraciclina ed i suoi derivati non sono normalmente presenti nelle cellule animali, la loro somministrazione esogena consente il controllo temporale dell'espressione del transgene *in vivo*. Al contrario, rtTA non è funzionale in assenza di doxiciclina ma anzi richiede la sua presenza per la transattivazione: tale sistema *tet* è denominato *tet*-ON (fig.11B). Funzionalmente, i due sistemi sono equivalenti; tuttavia, il sistema *tet*-ON richiede più doxiciclina per essere attivato di quanta ne richieda il *tet*-OFF per essere disattivato. Il vantaggio del sistema *tet*-ON è che il transgene non è espresso finché non sia somministrata la doxiciclina e l'induzione della sua espressione *in vivo* si è rivelata più veloce della sua inibizione [52]. I punti di forza di questo sistema sono l'efficienza del controllo sull'espressione genica e la capacità di regolarla in modo tessuto-dipendente, oltre al fatto che la risposta è dipendente dalla dose di doxiciclina e viene meno non appena termina la somministrazione. Lo svantaggio del sistema *tet* è che il controllo dell'espressione del costrutto accettore è spesso debole, per l'effetto del posizionamento genico del promotore minimale *tetO*. Per cercare di ovviare a questo problema, è necessaria la generazione di diversi modelli accettori per identificare quelli che esprimano il transgene in modo inducibile e non costitutivo. I sistemi *tet* sono stati utilizzati *in vivo* per l'espressione inducibile di diversi transgeni che codificassero, ad esempio, per geni reporter, oncogeni, o proteine coinvolte nella trasduzione dei segnali (fig.11C) [52].

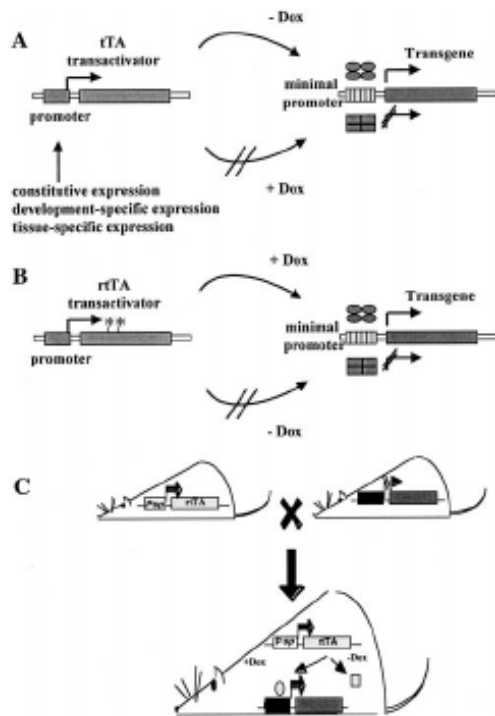


Fig.11 Diagramma del sistema di espressione tetraciclina-inducibile. A: Il transattivatore controllato dalla Tetraciclina (tTA) è una proteina di fusione che contiene il repressore *tet* di *E.Coli* ed il dominio carbossi-terminale del fattore di trascrizione VP16 dell'Herpes virus simplex. tTA si lega ad una serie di sette sequenze operatore (*tetO*) ed attiva la trascrizione di un promotore minimale del citomegalovirus umano. In presenza di tetraciclina o dei suoi derivati (come la doxiciclina), tTA non può legare il proprio target ed il sistema è inattivo (*tet-OFF*); a seconda del promotore utilizzato nel gene di fusione tTA, l'espressione di tTA può essere ubiquitaria o tessuto-specifica. B: Nel caso di un tTA mutato (rtTA), la doxiciclina fa attivare il sistema (*tet-ON*). C: *In vivo*, il sistema richiede due tipi indipendenti di topo transgenico: un topo transattivatore, in cui tTA o rtTA siano espressi sotto il controllo di un promotore tessuto-specifico (Psp), ed un topo responder, in cui l'espressione del cDNA di interesse sia sotto il controllo del promotore minimale *tetO*. L'incrocio tra essi genera doppi transgenici e l'aggiunta di doxiciclina al cibo o all'acqua consente il controllo spazio-temporale *in vivo* dell'espressione genica [52].

- Il Sistema Cre-Lox.

Oltre all'inattivazione genica condizionata (Knock-out condizionato), il sistema Cre-Lox può essere anche applicato alla sovraespressione proteica. In tal caso, un codone di stop, già inserito tra due sequenze LoxP (e perciò detto "floxed"), viene posto tra il promotore ed il cDNA del transgene (fig.12A): l'animale non esprimerà il gene finché non sia espresso Cre, cosa che porterà alla rimozione del codone di stop tra le due sequenze LoxP. Recentemente è

stata ottenuta una ricombinasi Cre inducibile, attivata cioè da un ligando esogeno, somministrato al momento opportuno: le ricombinasi Cre inducibili sono proteine di fusione che contengono la ricombinasi Cre originale con uno specifico dominio di legame al ligando (fig. 12B). Il legame col ligando è in grado di produrre modificazioni conformazionali nella proteina di fusione e/o cambiamenti nella localizzazione intracellulare della stessa: inizialmente, sono state prodotte proteine di fusione contenenti la ricombinasi Cre ed il dominio di legame ad alcuni ormoni, come i glucocorticoidi, il progesterone o l'estrogeno, proprio dei recettori nucleari. Per evitare l'attivazione della ricombinasi da parte dell'ormone endogeno, sono stati utilizzati domini di legame modificati: in questo modo, l'enzima avrebbe potuto essere attivato solo da un ligando sintetico (e quindi esogeno), come il Tamoxifen (agonista sintetico dei glucocorticoidi) o RU486 (un antiprogesterone sintetico).

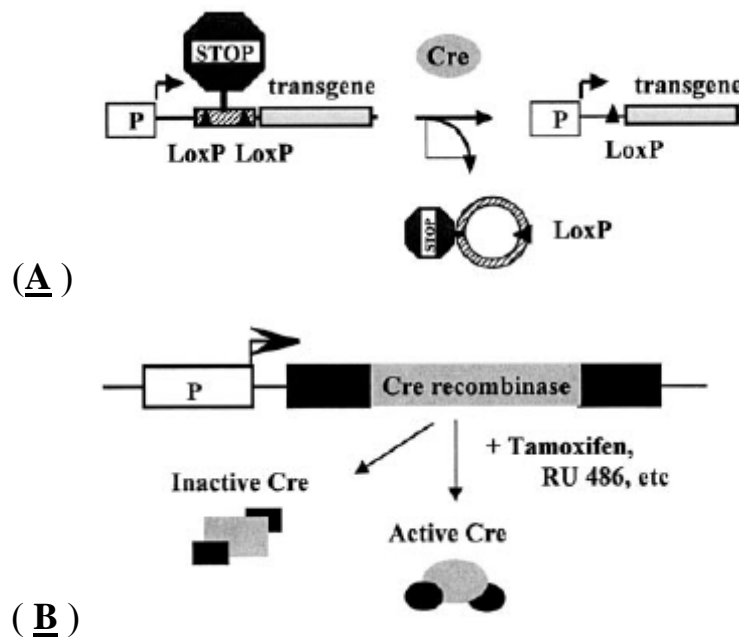


Fig.12 Il sistema Cre/Lox utilizzato come un sistema di espressione inducibile. A: espressione genica condizionata, ottenuta attraverso una sequenza di stop “floxed”, posta tra il promotore e la sequenza da esprimere. Nei doppi transgenici, la sequenza non può essere espressa nei tessuti dove non ci sia la ricombinasi Cre: l'attivazione dell'enzima risulta nel taglio della sequenza di stop e nell'espressione del cDNA. B: Controllo temporale dell'attività di Cre: l'attività della proteina di fusione chimera dipende dal legame dello specifico dominio col proprio ligando. Per evitare l'attivazione della ricombinasi Cre da parte degli steroidi endogeni, sono stati utilizzati domini di legame mutati [52].

2.2 Modelli di topi Knock-out per gli intermedi del segnale insulinico.

2.2.1 Topi Knock-out per il recettore insulinico.

La creazione di topi deficitari del recettore insulinico ha permesso notevoli passi avanti nella comprensione della patogenesi del Diabete e dell'insulino-resistenza. Nei topi knock-out per IR, detti IRKO, si riscontra un progressivo aumento dei livelli di glucosio, accompagnato da un aumento transiente ma molto consistente (fino a 1000 volte al di sopra della norma) dei livelli di insulina. In un paio di giorni, le beta-cellule non sono più capaci di produrre insulina e vanno incontro a degranulazione: questo fenotipo indica che IR è necessario per l'omeostasi energetica post-natale, ma non per la crescita e/o il controllo del metabolismo prenatale [49]. Nell'uomo, la mancanza di IR determina un grave ritardo nella crescita intrauterina, lipodistrofia e ipoglicemia. Il ruolo di IR nel promuovere la crescita embrionale risulta chiaro da esperimenti su topi con mutazioni combinate del sistema insulina/IGF-1/IGF-2: IGF-2 si servirebbe sia di IGF-R1 che di IR per la trasduzione del segnale durante l'embriogenesi; in particolare, IR è espresso in due forme che derivano da splicing alternativo e che differiscono tra loro per un dominio di 12 amminoacidi nella regione carbossi-terminale della subunità extracellulare: è tale dominio a legare IGF-2 ed ad essere particolarmente espresso durante l'embriogenesi [49]. Il fenotipo letale dei KO per IR precluderebbe lo studio dettagliato della funzione del recettore nei diversi tessuti durante l'età adulta; per ovviare a questo problema sono stati creati diversi modelli di Knock-out "tessuto-specifici".

- MIRKO (Knock-out per il Recettore Insulinico nel Muscolo): questo modello presenta una riduzione del trasporto del glucosio insulino-dipendente, ma senza insulino-resistenza sistemica; i topi MIRKO sono ipertrigliceridemicici, hanno maggiori riserve di grasso e sviluppano la

Sindrome Metabolica. La mancanza di segnale insulinico nel muscolo sarebbe compensata da due vie alternative: quella mediata da IGF-1R e quella dovuta alla contrazione muscolare, in cui è coinvolta AMPK (la Proteina Chinasi attivata da AMP). I topi con delezioni a carico di IGF-1 specifiche per il tessuto muscolare, sviluppano in effetti Diabete, insulino-resistenza e disfunzione beta-cellulare. Ad ogni modo, i topi MIRKO mostrano, dopo un clamp iperinsulinemico-euglicemico, una sensibile riduzione nel trasporto di glucosio e nella sintesi del glicogeno intramuscolare; contestualmente, si rileva un aumento del trasporto di glucosio all'interno del tessuto adiposo, che ha presumibilmente un ruolo compensatorio [49]. Questi topi non presentano inoltre differenze nell'espressione di proteine di segnale, come IRS-1 o p85 α : ciò suggerisce che la loro sovraespressione non sia necessaria per il meccanismo compensatorio.

-FIRKO (Knock-out per il Recettore Insulinico nel tessuto adiposo): i topi con una delezione di IR specifica per il tessuto adiposo bianco e bruno sono stati generati utilizzando un transgene Cre dipendente dal promotore per il gene aP2, specifico per il tessuto adiposo. In questi topi, sebbene il trasporto basale del glucosio si mantenga inalterato, si riscontra maggiore lipolisi, riduzione della massa grassa e della concentrazione ematica di trigliceridi. I livelli di leptina sono normali e quindi insolitamente alti, vista la minore massa grassa. I tests da carico di glucosio effettuati sui topi FIRKO non hanno evidenziato sviluppo di insulino-resistenza o intolleranza al glucosio.

-LIRKO (Knock-out per il Recettore Insulinico nel fegato): questi topi sono stati generati mediante il sistema Cre-LoxP utilizzando il promotore dell'albumina per ottenere l'espressione di Cre specificamente nel fegato; a due mesi di età, i topi LIRKO sono gravemente iperglicemici, iperinsulinemici con una cospicua massa beta-cellulare; inoltre, l'azione dell'insulina non è sufficiente ad inibire la gluconeogenesi.

- β IRKO(Knock-out per il Recettore Insulinico nelle β -cellule): questi topi presentano, alla nascita, normali livelli di glucosio ed insulina circolanti ma, intorno alle 8 settimane di età, mostrano scompensi nella prima fase della secrezione insulinica che possono determinare intolleranza al glucosio e talvolta Diabete [53]. La delezione di IR e/o di altre proteine coinvolte nella trasduzione del segnale insulinico evidenzia come tale segnale regoli la secrezione dell'insulina stessa; i meccanismi con cui ciò avviene sono molteplici e non ancora del tutto noti. I topi β IRKO sono ottenuti utilizzando un promoter per Ins2 (l'omologo murino del gene dell'insulina umano) per ottenere ricombinazione Cre-dipendente.

2.2.2 Topi knock-out per le proteine IRSs.

L'unicità del dominio contenente le fosfo-tirosine, proprio di ognuna delle proteine IRSs, ha fatto presupporre che esse avessero anche un'azione specifica per ogni tessuto: l'utilizzo di modelli murini KO per ciascuna di queste proteine ha fornito un quadro piuttosto chiaro di quali siano i fenotipi determinati dalla mancanza di queste proteine (tabella 1).

Tabella 1. Fenotipi murini prodotti dalla mancanza delle proteine IRSs [58].

Murine phenotypes produced by IRS protein deficiency								
Genotype	Body weight	Fasting glucose	Insulin levels	Glucose tolerance	Insulin resistance	β -cell mass	Life expectancy	Other abnormalities
IRS1 ^{-/-}	-50%	Normal	Hyperinsulinemia	Normal	Yes (muscle major site)	Twofold	>1.5 years	Decreased leptin
IRS2 ^{-/-}	-10%	—	6–8 wks 10–12 wks ↓	Impaired	Yes (liver major site)	-50%	10 weeks (males)	Increased leptin, female adiposity and infertility
IRS1 ^{+/-} IRS2 ^{+/-}	-70%	Normal	Hyperinsulinemia	Impaired	Yes	Twofold	>1 year	—
IRS1 ^{+/-} IRS2 ^{-/-}	-50%	—	Hypoinsulinemia	Severely impaired	Yes	-90%	5–6 weeks	—
IRS1 ^{-/-} IRS2 ^{+/-}	Not viable	—	—	—	—	—	—	—
IRS3 ^{-/-}	Normal	Normal	Normal	Normal	No	?	?	—
IRS4 ^{-/-}	-10%	Slight decrease	Normal	Normal	No	?	?	Reduced fertility

-Topi IRS-1^{-/-}. I topi knock-out per IRS-1 risultano più piccoli dei WT alla nascita e crescono in modo proporzionale alle loro dimensioni ridotte,

mantenendo, fino a 4 mesi di età, pesi corporei inferiori del 50% rispetto ai WT [54]. Oltre alla resistenza all'insulina ed a IGF-1, i topi IRS-1^{-/-} risultano essere intolleranti al glucosio: la delezione di IRS1 provoca, in particolare, gravi difetti nella sintesi del glicogeno muscolare *in vivo* e, parimenti, la riduzione di circa il 50% del trasporto di glucosio intramuscolare. Si riscontra la riduzione dell'attivazione della PI3-K indotta dall'insulina e del trasporto del glucosio e risulta ridotto anche l'altro importante ruolo di questo ormone, il ruolo mitogeno, come evidenziato dalla minore attività delle chinasi p70S6 e MAP e da ridotti livelli di traduzione dell'mRNA e di conseguenza di sintesi proteica [55]. I topi Knock-out per IRS-1 hanno una normale risposta iperplastica delle β -cellule all'insulino-resistenza; la mancanza di IRS-1 determina un minor contenuto di insulina nelle isole ed una ridotta secrezione della stessa in fase acuta, dopo stimolo con glucosio o arginina [56]. Sebbene la causa dell'azione stimolante da parte dell'arginina non sia ancora del tutto chiara, la riduzione della risposta delle β -cellule ad essa ed al glucosio fa pensare che la mancanza di IRS-1 in queste cellule infici la secrezione insulinica nelle sue fasi finali. Il contenuto di insulina delle isole dei topi KO per IRS-1 è minore rispetto ai WT ma in realtà, per via del ritardo nella crescita a cui i topi IRS-1^{-/-} sono soggetti, il rapporto tra la grandezza delle isole e la massa corporea è maggiore in questi topi, rispetto ai controlli: ciò, insieme ad una maggiore proporzione di isole più grandi, fa sì che l'insulinemia sia leggermente più alta nei topi KO per IRS-1. La secrezione insulinica misurata *in vitro*, dopo stimolo con glucosio, risulta minore nei topi IRS-1^{+/-} rispetto ai WT, ed ancor più ridotta nei KO, ad indicare un effetto del dosaggio genico sulla risposta. Nelle beta-cellule KO in coltura, la trasfezione con il gene di IRS-1 ripristina il contenuto di insulina, ad indicare un ruolo di IRS-1 anche nella regolazione delle riserve dell'ormone nelle beta-cellule. Studi in cui è stato

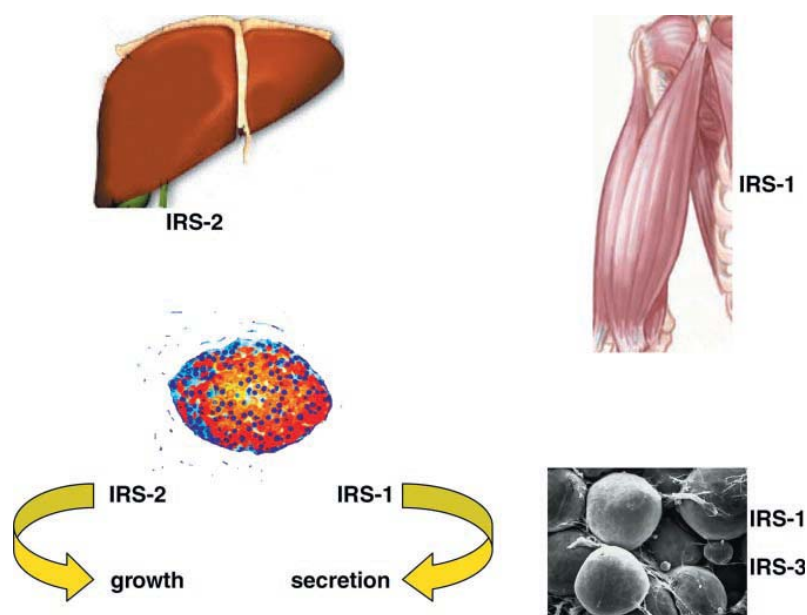


Fig.13 Funzione tessuto-specifica delle proteine IRS-1 ed IRS-2. IRS-1 sembra essere il principale mediatore del segnale insulinico nel muscolo scheletrico, nel tessuto adiposo e per la secrezione insulinica da parte delle β -cellule; IRS-2 è importante per il metabolismo del fegato e la proliferazione e la resistenza all'apoptosi delle β -cellule; IRS-3 giocherebbe un ruolo complementare a quello di IRS-1 nel tessuto adiposo [49].

utilizzato come modello murino il doppio eterozigote $IR^{+/-}/IRS1^{+/-}$, hanno evidenziato una severa insulino-resistenza ed una significativa riduzione dell'attivazione della PI3K [57].

-Topi IRS2^{-/-}. Tre giorni dopo la nascita, i topi IRS2 KO sono iperglicemici ed intorno alle 3-6 settimane di vita risultano essere intolleranti al glucosio; i livelli di insulina a digiuno sono tre volte più alti della norma ed a due mesi di età questi topi presentano un ridotto metabolismo del glucosio sistemico ed una parziale riduzione della produzione di glucosio epatico dopo stimolo con insulina, cosa che suggerisce una grave insulino-resistenza nel fegato e nel muscolo scheletrico. A 10 settimane di età, i topi IRS-2 KO sono diabetici ed a 12 settimane, se non curati, diventano gravemente iperglicemici e muoiono per disidratazione e coma iperosmolare dovuto a polidipsia e poliuria [58]. L'analisi morfometrica delle sezioni del pancreas dei topi WT e IRS2 KO a 4 settimane di età (quando si verifica un incremento nella massa delle beta-cellule nei topi di controllo) rivela una

significativa riduzione del numero delle isole, ben il 50% in meno, in assenza di IRS-2 e si riscontra anche un minor contenuto insulinico delle stesse. L'espressione di IRS-2 si rileva, negli animali WT, sia nelle beta-cellule che nell'epitelio del dotto pancreatico, dove può regolare il bilancio tra proliferazione e differenziamento delle isole. Nel pancreas umano normale, IRS-2 è espresso nelle cellule duttali ed acinari, oltre che nelle isole; in presenza di un cancro, IRS-2 risulta sovraespresso e ciò induce a pensare che possa regolare il segnale mitogenico e contribuire a stimolare la crescita del tumore. Lo scompenso delle beta-cellule che si riscontra nella patogenesi del T2D sembra essere dovuto, nei topi IRS-2 KO, ad una maggiore percentuale di apoptosi accompagnata da minore capacità di generare nuove cellule o di favorire la sopravvivenza di quelle preesistenti [59]. Senz'altro, la normale sintesi e la secrezione dell'insulina dipendono dall'interazione o da un bilanciamento nel segnale delle proteine IRSs nelle beta-cellule. Nel tessuto adiposo, la concentrazione e la produzione di glicerolo e la concentrazione plasmatica degli acidi grassi liberi (FFA), che indicano il livello di lipolisi, risultano del tutto paragonabili tra i topi WT, IRS-1^{-/-} e IRS-2^{-/-} [60]; durante il clamp iperinsulinemico-euglicemico, la riduzione dell'inibizione della lipolisi è minore nei topi IRS-2^{-/-}, rispetto ai topi IRS-1^{-/-}. Ciò potrebbe indicare un'importanza maggiore di IRS-1 nella ri-esterificazione dei grassi (plausibilmente attraverso l'azione mediata dall'insulina sull'utilizzo del glucosio da parte del tessuto adiposo), mentre IRS-2 avrebbe un'azione diretta sull'inibizione della lipolisi (presumibilmente agendo sulla lipasi ormono-sensibile). La condizione di insulino-resistenza riscontrata utilizzando doppi eterozigoti IR^{+/-}/IRS-2^{+/-} è risultata meno grave di quella dei doppi eterozigoti IR^{+/-}/IRS1^{+/-}.

-Topi IRS-3-/-. La mancanza di IRS-3 non ha apparentemente alcun effetto sullo sviluppo ed il metabolismo dei topi; ciò è plausibilmente dovuto all'effetto di compensazione da parte di IRS-1.

-Topi IRS-4-/-. I topi deficitari per IRS-4 presentano una leggera intolleranza al glucosio e difficoltà a riprodursi. Il loro fenotipo è simile a quello dei topi IRS-1 KO, seppur più lieve. Gli squilibri nel metabolismo del glucosio causati dall'assenza di IRS-1 e/o di IRS-2 non sono stati riscontrati in topi knock-out per IRS-3 o IRS-4 [60].

2.2.3 Topi knock-out per altri intermedi della via di trasmissione del segnale insulinico.

-Topi deficitari di Akt.

La completa inattivazione di Akt risulta essere incompatibile con la sopravvivenza cellulare; uno studio più approfondito è stato possibile generando topi knock-out per una o più delle sue tre isoforme. I topi deficitari di Akt1 mostrano una maggiore mortalità alla nascita ed un peso inferiore del 30% rispetto ai topi di controllo; i topi Akt2 KO, invece, crescono normalmente ma presentano elevati livelli di glucosio a digiuno, elevata gluconeogenesi epatica ed insulino-resistenza periferica. Infine, nei topi deficitari di Akt3, nonostante una normale omeostasi del glucosio, si riscontra uno sviluppo ridotto del cervello, dovuto ad una minore proliferazione cellulare. Questi studi rivelano come le tre isoforme di Akt abbiano dei ruoli differenti e non ridondanti [61]. Per approfondire quest'aspetto, sono stati creati topi con delezioni combinate a carico delle diverse isoforme: i topi deficitari di Akt1 e di Akt2 muoiono subito dopo la nascita, pesano ben il 50% in meno del normale e presentano atrofia muscolare, un ritardo nel processo di ossificazione e incompleto sviluppo della pelle. I topi deficitari di Akt1 ed Akt3 muoiono circa 12 giorni dopo la nascita ed il loro sistema nervoso e l'apparato circolatorio non sono del tutto sviluppati. Infine, sorprendentemente, i topi KO per Akt2 ed Akt3 si sviluppano e crescono normalmente, pur presentando intolleranza al

glucosio (solo i maschi) e ridotta sensibilità all'insulina (entrambi i sessi). Tale risultato, confermato anche nei topi Akt1+/-Akt2-/-Akt3-/-, induce a concludere che l'isoforma Akt1 sia sufficiente per svolgere tutte le funzioni di Akt, relative allo sviluppo embrionale e post-natale [61].

-Topi deficitari della proteina Glut4.

I topi con un knock-out completo di Glut4 presentano un forte ritardo nella crescita, ipertrofia cardiaca e ridotto sviluppo del tessuto adiposo. Diventano leggermente insulino-resistenti, condizione che nei maschi si accompagna ad iperglicemia; i maschi eterozigoti diventano diabetici ma senza obesità: il fatto che il fenotipo degli eterozigoti sia peggiore di quello degli omozigoti è presumibilmente dovuto ad un fenomeno di compensazione da parte di altri trasportatori GlutX/Glut8, che si verificherebbe solo negli omozigoti. Il fenotipo dei topi Glut4 KO indica che questo trasportatore è in effetti necessario per il trasporto del glucosio insulino-dipendente, ma non per il mantenimento dell'omeostasi glucidica. I topi knock-out per Glut4 a livello muscolare risultano moderatamente insulino-resistenti ed intolleranti al glucosio, a sottolineare l'importanza di questa proteina per il metabolismo muscolare; la mancanza di Glut4 nel tessuto adiposo determina la riduzione del trasporto del glucosio insulino-dipendente, iperinsulinemia ed insulino-resistenza epatica. Poiché il trasporto del glucosio negli adipociti rappresenta solo il 10% circa del consumo corporeo dello stesso, questo fenotipo indica che un cambiamento nella sensibilità insulinica nell'adipocita può influenzare gravemente il metabolismo sistemico [49].

3. IL POLIMORFISMO IRS-1 G972R E LA PATOGENESI DEL DIABETE DI TIPO 2.

3.1 I principali polimorfismi di IRS-1.

L'analisi molecolare del gene *irs-1* ha rivelato l'esistenza di diversi polimorfismi a suo carico (fig.14), che sono globalmente diffusi con maggior frequenza nei soggetti affetti da T2D rispetto ai soggetti sani e consistono nelle seguenti sostituzioni amminoacidiche [10]:

Codone	Sostituzione
170	Pro-Arg
209	Met-Thr
513	Ala-Pro
809	Ser-Phe
819	Gly-Arg
893	Ser-Gly
972	Gly-Arg
1221	Arg-Cys

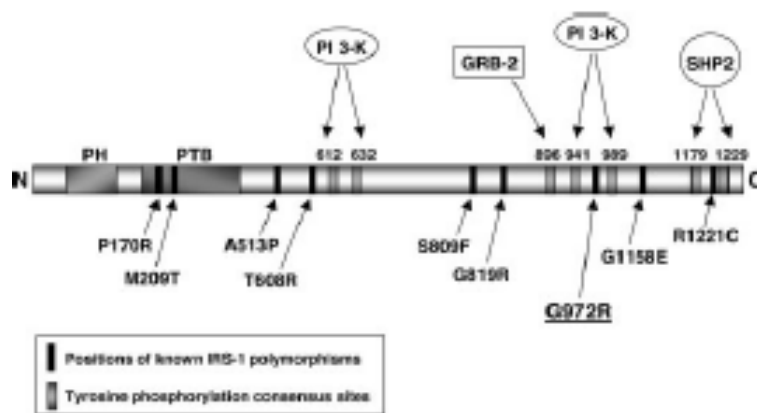


Fig.14 Diagramma schematico di IRS-1 umano. Sono indicati tutti i polimorfismi conosciuti, gli specifici siti di fosforilazione in tirosina e le proteine contenenti il dominio Src homology-2, note per interagire con IRS-1 a livello di questi siti [11].

La variante Ser→Gly⁸⁹³ interessa un sito di IRS-1 collocato immediatamente a monte del dominio di legame per la porzione SH2 di Grb2, una proteina adattatore che lega IRS-1 alla via mitogena Ras/MAPK; altri due polimorfismi, Gly→Arg⁸¹⁹ e Arg→Cys¹²²¹ sono stati trovati in soggetti eterozigoti anche per la variante Arg⁹⁷²; sebbene la cisteina¹²²¹ sia collocata tra due potenziali siti di fosforilazione in tirosina (Y¹¹⁷⁹ e Y¹²²⁹) che si ritengono coinvolti nel legame con la fosfatasi specifica per la tirosina SHP-2, nessuno di questi due polimorfismi mostra di compromettere l'espressione o la funzione di IRS-1, se espresso nelle cellule Cos7[10]. Uno studio effettuato su una popolazione giapponese di soggetti diabetici evidenzia l'esistenza di altri tre polimorfismi, in particolare le sostituzioni Pro→Arg¹⁷⁰, Met→Thr²⁰⁹, Ser→Phe⁸⁰⁹: due di queste, Arg¹⁷⁰ e Thr²⁰⁹ si trovano nel dominio PTB di IRS-1. La loro peculiarità ha portato a studiare il segnale insulinico in cellule 32D esprimenti tali varianti, che presentano, dopo stimolo con insulina, un più debole legame tra IRS-1 ed IR, una riduzione della fosforilazione di IRS-1, dell'attivazione della PI-3K e delle MAPK, oltre che della sintesi del DNA [10]. Il significato funzionale della variante Ser→Phe⁸⁰⁹ non è stato studiato *in vitro* e tale polimorfismo è stato riscontrato solo in soggetti affetti da Diabete di tipo 2, che risultano iperglicemici sia a digiuno che dopo i pasti rispetto ai diabetici che non esprimono la mutazione. L'analisi del fenotipo di soggetti diabetici eterozigoti per il polimorfismo Pro⁵¹³ non mostra alcuna differenza significativa rispetto a soggetti diabetici che non sono portatori della mutazione.

3.2 Il polimorfismo G972R IRS-1

Tra tutti i polimorfismi di IRS-1 noti, il più diffuso risulta essere la sostituzione Gly (G)→Arg (R) a livello del codone 972; diversi studi, ma non tutti [62], confermano l'associazione tra questo polimorfismo e la patogenesi del Diabete di tipo 2: presumibilmente, le ragioni dell'associazione debole o assente riscontrata in alcuni di essi sono da ricercarsi nelle differenze etniche che determinano il background genetico della patologia. Ad esempio, la frequenza del polimorfismo G972R rilevata in un gruppo di soggetti giapponesi, costituito da soggetti diabetici e di controllo, risulta inferiore rispetto alle popolazioni corrispondenti di soggetti Caucasiche (3.8 vs 10.6 % per i soggetti affetti da T2D e 4.0 vs 6.5 % per i soggetti di controllo): nel gruppo di soggetti giapponesi, tuttavia, la sensibilità all'insulina, misurata per mezzo di un clamp iperinsulinemico-euglicemico, risulta ridotta del 22% nei soggetti normali e del 29% nei soggetti affetti da T2D portatori del polimorfismo, rispetto ai gruppi corrispondenti di soggetti sani o diabetici ma privi del polimorfismo [10]. In realtà, essendo il Diabete una malattia nella cui patogenesi sono implicate molteplici cause, il polimorfismo G972R IRS-1 potrebbe agire in combinazione con fattori ambientali, quali la dieta, l'attività fisica e l'età, che possono contribuire alla suscettibilità al Diabete: in effetti, uno studio effettuato su una popolazione di soggetti obesi non diabetici, in cui è stata analizzata l'associazione tra presenza del polimorfismo e obesità, evidenzia come tale associazione riduca fino al 50% la sensibilità insulinica [63] (figura 15). Il polimorfismo G972R è comunque più frequente nei soggetti obesi non diabetici rispetto ai soggetti non obesi [64] ($p < 0.002$): i soggetti obesi portatori del polimorfismo presentano un BMI significativamente maggiore ($p < 0.001$), maggiori livelli di insulina ($p < 0.01$) e trigliceridi ($p < 0.03$) a digiuno ed un HOMA-IR più elevato ($p < 0.001$) rispetto ai

soggetti obesi di controllo; nessuna di queste differenze è stata riscontrata tra i soggetti magri, portatori o meno del polimorfismo (tabella 2).

Independent variable	Regression coefficient (95% CI)	p
Age	0.03 (0.014 to 0.046)	0.0003
Sex	-0.08 (-0.24 to 0.09)	0.35
Body-mass index	-0.061 (-0.080 to -0.042)	<0.0001
Waist-hip ratio	-1.8 (-2.9 to -0.6)	0.003
VO ₂ max	0.016 (0.009 to 0.024)	<0.0001
Tobacco consumption	0.0004 (-0.0006 to 0.0007)	0.92
Alcohol consumption	-0.016 (-0.073 to 0.040)	0.57
Use of oral contraceptives	-0.31 (-0.47 to -0.13)	0.0005
IRS-1 codon-972 status	0.17 (-0.05 to 0.38)	0.13
Body-mass index \geq 25 kg/m ² and IRS-1 codon-972 mutation	-0.7 (-1.1 to -0.3)	0.0008

n=366; 11 codon-513 polymorphism carriers, 1 homozygous carrier of codon-972 polymorphism, and 2 non-obese wild-type subjects with partially missing data excluded.

Fig.15 La combinazione della variante Arg⁹⁷² e dell'obesità è associata con la riduzione del 50% nella sensibilità insulinica. Analisi di regressione multipla con la sensibilità insulinica come variabile dipendente nei soggetti di controllo o portatori del polimorfismo G972R [63].

Anche in questo caso, l'analisi multivariata conferma che la mutazione G972R IRS-1 è significativamente associata ($p < 0.009$) con la riduzione della sensibilità insulinica nel gruppo di soggetti obesi [64].

	Obese Subjects		Lean Subjects	
	GR + RR (n = 32)	GG (n = 125)	GR + RR (n = 13)	GG (n = 144)
Age (years)	46.0 \pm 2.5 ^d	52.9 \pm 1.4	63.6 \pm 1.0	57.4 \pm 3.2
Body mass index (kg/m ²)	36.5 \pm 1.1 ^a	32.3 \pm 0.4	24.2 \pm 0.7	24.6 \pm 1.7
Blood glucose (mmol/L)	5.16 \pm 0.2	4.69 \pm 0.1	4.23 \pm 0.9	4.26 \pm 1.6
Fasting plasma insulin (pmol/l)	200.7 \pm 25.8 ^b	119.0 \pm 10.7	45.1 \pm 3.5	55.9 \pm 2.8
HOMA _{IR}	6.32 \pm 0.8 ^c	3.28 \pm 0.2	1.19 \pm 0.4	1.59 \pm 0.4
% β -cell function (log)	2.51 \pm 0.07	2.36 \pm 0.04	2.22 \pm 0.1	2.34 \pm 0.2
Plasma lipids (mmol/l)				
Total cholesterol	5.69 \pm 0.26	5.65 \pm 0.10	5.65 \pm 0.22	5.88 \pm 0.18
Total triglycerides	2.11 \pm 0.36	1.73 \pm 0.10	1.72 \pm 0.09	1.78 \pm 0.26
HDL cholesterol	1.23 \pm 0.07	1.35 \pm 0.03	1.51 \pm 0.04	1.44 \pm 0.04
LDL cholesterol	3.32 \pm 0.2	3.55 \pm 0.11	3.33 \pm 0.22	3.57 \pm 0.07

Data are given as means \pm SEM. GG + GR = carriers; GG = non-carriers of IRS-1 mutation.

^a $p < 0.001$ obese carriers of G972R mutation vs obese non-carriers

^b $p < 0.01$ obese carriers of G972R mutation vs obese non-carriers, adjusted for age and BMI.

^c $p < 0.001$ obese carriers of G972R mutation vs obese non-carriers, adjusted for age and BMI.

^d $p < 0.03$ obese carriers of G972R mutation vs obese non-carriers

Differences between control carriers vs control non-carriers were all non-significant

The statistical analysis of HOMA_{IR}, total triglycerides and plasma insulin were done on log-transformed values but the untransformed values are given in table. Continuous variables were compared by *t* test and categorical variables by χ^2 test

Tabella 2. Misura del grasso corporeo e dei parametri metabolici di soggetti obesi o magri, in presenza del polimorfismo G972R. RR= portatori omozigoti del polimorfismo; GR= portatori del polimorfismo nella sua forma eterozigote; GG= soggetti non portatori del polimorfismo [64]

Anche in assenza di obesità, oltre alla riduzione della sensibilità all'insulina ($p < 0.03$), si riscontra, in soggetti portatori del polimorfismo G972R, un maggior livello ematico di trigliceridi ($p < 0.01$), un valore più alto del rapporto tra colesterolo totale e colesterolo HDL ($p < 0.01$), livelli più alti di acidi grassi liberi ($p < 0.04$), di pressione sistolica ($p < 0.04$) e dello spessore dell'intima-media ($p < 0.02$): ciò induce a pensare che la presenza di questa variante possa contribuire alla patogenesi delle malattie cardiovascolari associate con il Diabete di Tipo 2, producendo una serie di squilibri metabolici associati con l'insulino-resistenza [65]. Significativamente, isole pancreatiche umane ottenute da donatori portatori del polimorfismo, mostrano un ridotto contenuto di insulina, minor rilascio della stessa ed un maggior numero di granuli secretori immaturi [66]. I soggetti omozigoti per il polimorfismo G972R sono estremamente rari; lo studio effettuato su uno di essi [63], ne evidenzia il minor livello di insulina a digiuno ma anche minore sensibilità alla stessa e ridotta tolleranza al glucosio; sottoposto ad un trattamento di 24 ore con Dexametasone, il soggetto sviluppava una forma transiente di Diabete.

3.3 Meccanismi molecolari tramite i quali il polimorfismo G972R di IRS-1 altera l'azione insulinica.

3.3.1 Ridotta associazione di p85 con IRS-1 dopo stimolo in vitro con insulina.

Un risultato estremamente interessante sull'azione del polimorfismo G972R, riscontrato in diversi studi effettuati *in vitro*, è la significativa riduzione dell'associazione tra IRS-1 e la subunità regolatoria della PI3K, p85, dopo stimolo con insulina. Tale riduzione è osservata in numerosi modelli cellulari quali cellule muscolari L6 (fig.16) [67] e β -cellule RIN1046-38 (fig.17A) [68] sovraesprimenti la variante; isole pancreatiche umane ottenute

da donatori portatori del polimorfismo (fig.17B) [23]; e cellule endoteliali ottenute da cordoni ombelicali di donne portatrici della variante G972R (fig.17C) [69].

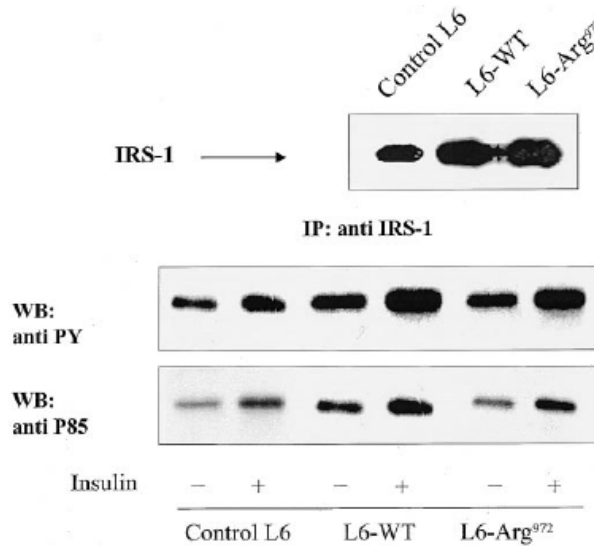
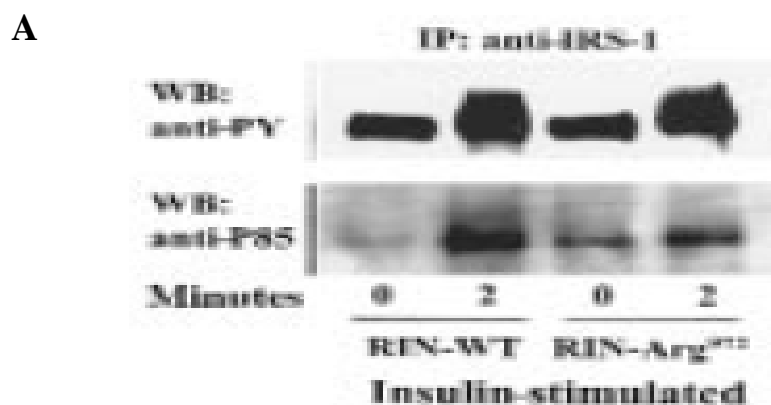


Fig.16 Espressione della variante 972 di IRS-1 e riduzione dell'associazione di p85 con IRS-1 fosforilato in tirosina dopo stimolo con insulina. Cellule muscolari L6 di controllo o trasfettate stabilmente con IRS-1 WT o G972R-IRS-1 e trattate con insulina 100nM per 2 minuti a 37 C. Dopo immunoprecipitazione (IP) con anticorpo anti-IRS-1 e SDS-PAGE, i lisati cellulari sono stati analizzati tramite immunoblot (WB) con anticorpo anti fosfotirosina totale (pannello superiore) o anti-p85 [67].

La minore associazione tra IRS-1 e p85, dovuta alla presenza del polimorfismo, causa una più debole trasduzione del segnale insulinico e di conseguenza una ridotta azione *in toto* dell'ormone in questi modelli cellulari.



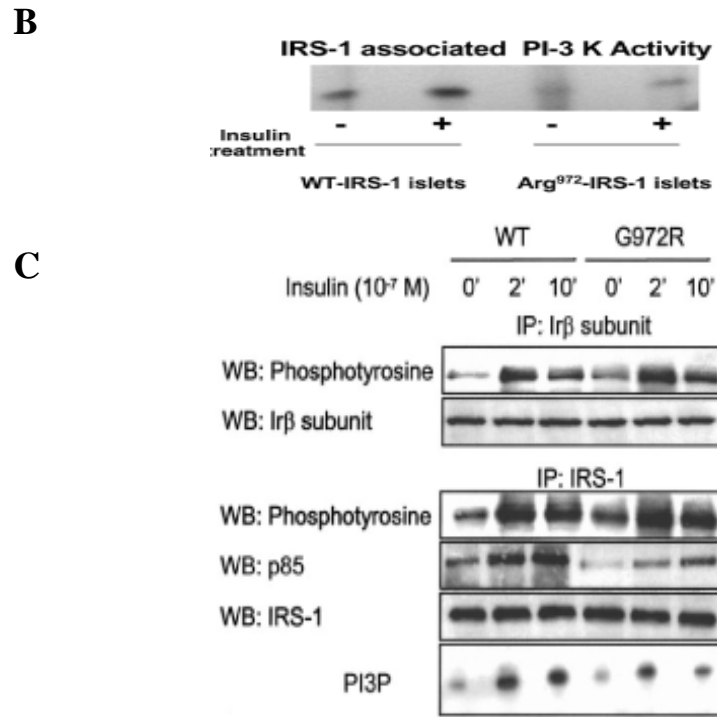


Fig.17 Riduzione dell' associazione di p85 alla variante G972R di IRS-1 dopo stimolo con insulina *in vitro*. (A) Beta-cellule RIN sovraesprimenti IRS-1 WT o la sua variante G972R incubate con insulina 100 nM per 2 minuti a 37C. Dopo immunoprecipitazione (IP) con anticorpo anti-IRS-1 e SDS-PAGE, i lisati cellulari sono stati analizzati per immunoblot (WB) con anticorpo anti fosfotirosina totale (pannello superiore) o anti-p85. (B) Isole pancreatiche umane (n=200) di donatori recanti la forma WT od il polimorfismo G972R di IRS-1 dopo stimolo per 2 minuti con insulina. (C) cellule HUVEC wt per IRS-1 o recanti il polimorfismo G972R, dopo stimolo con insulina. Viene valutata la fosforilazione totale in tirosina di IRS-1(WB) da parte di IR (dopo IP e WB anti-IRβ) e l'associazione di p85 (WB) con IRS-1(dopo IP e WB anti-IRS-1) [68, 22, 69].

3.3.2 Il polimorfismo G972R compromette l'azione dell'insulina, in modo specifico per i diversi tipi cellulari.

- Riduzione *in vitro* del trasporto del glucosio nelle cellule muscolari.

Da uno studio in cui sono state utilizzate cellule muscolari L6 di controllo e cellule L6 trasfettate con la forma WT di IRS-1 o la sua variante G972R, emerge che IRS-1 WT sovraespresso determina l'aumento delle quantità dei trasportatori GLUT1 e GLUT4 a livello della membrana plasmatica, in

condizioni basali e dopo stimolo con insulina, mentre la presenza del polimorfismo G972R ne determina la riduzione; inoltre si riscontra, in presenza del polimorfismo, una sensibile riduzione dell'attività di GSK-3 (fig.18) [67]. La riduzione dell'associazione di p85 con IRS-1, unita alla conseguente riduzione della fosforilazione di Akt, riscontrata dopo stimolo con insulina in presenza del polimorfismo [67], indica come quest'ultimo possa indebolire il riciclo basale di GLUT1 e GLUT4 e la traslocazione insulino-dipendente di GLUT4 a livello di membrana [67].

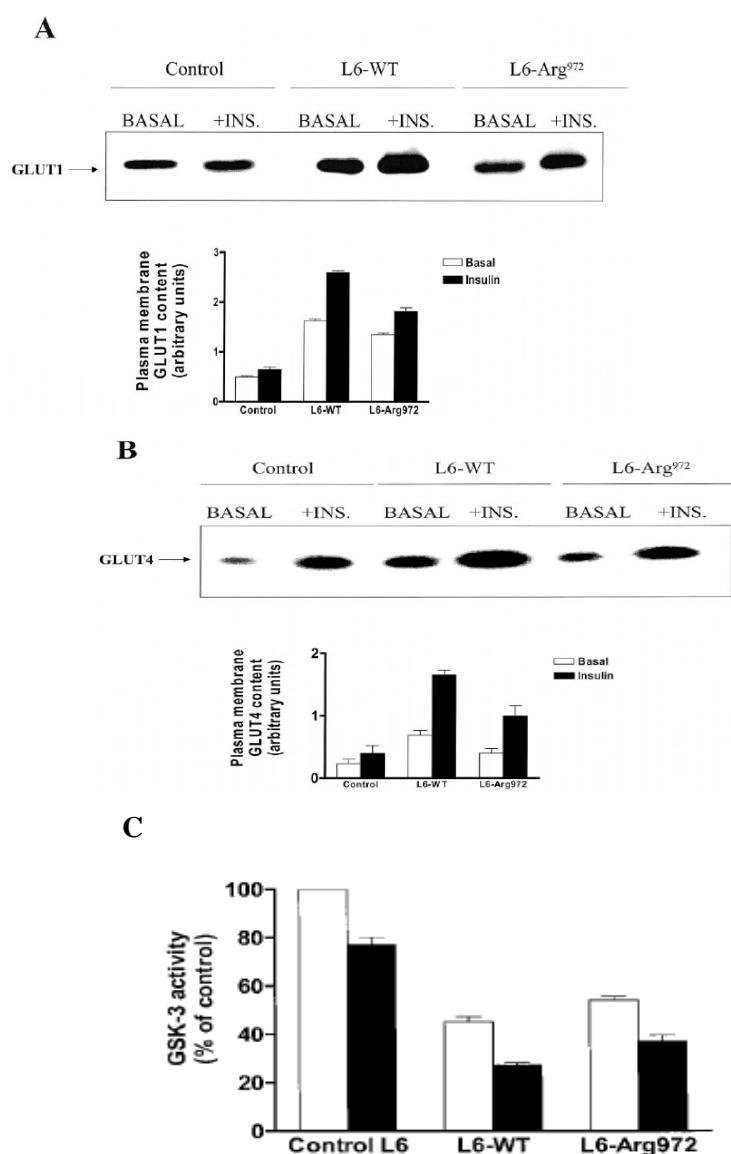


Fig.18 Traslocazione a livello della membrana plasmatici dei trasportatori di glucosio nelle cellule muscolari L6. Cellule di controllo, sovraesprimenti IRS-1 WT o la variante G972R di IRS-1 sono state incubate in presenza (■) od in assenza (□) di insulina 100nM. (A) Le membrane plasmatiche sono state preparate, lisate e analizzate con anticorpo anti-GLUT1 o (B) anti-GLUT4. I livelli di espressione proteica di GLUT1 e GLUT4 sono stati quindi valutati per densitometria (C) Dopo

immunoprecipitazione con anticorpo anti-GSK-3, l'attività dell'enzima è stata misurata come capacità di fosforilare il peptide Glicogeno Sintasi, aggiunto al lisato cellulare; i risultati sono espressi come percentuale del valore massimo trovato nelle cellule L6 di controllo non trattate [67].

- Riduzione *in vitro* della secrezione insulinica e della sopravvivenza nelle β -cellule.

Confrontando β -cellule RIN1046-38 di controllo con β -cellule trasfettate con la forma WT o G972R di IRS-1, si riscontra, dopo incubazione con glucosio, un aumento della secrezione insulinica in presenza di IRS-1 WT sovraespresso e la sua riduzione in presenza del polimorfismo G972R (fig.19) [68]; non si rilevano particolari differenze nel livello proteico e dell'mRNA dell'insulina tra le β -cellule WT e G972R, ad indicare che il polimorfismo non influenza la sintesi dell'ormone [68]; la riduzione significativa (ben il 59%) dell'associazione tra p85 ed IRS-1, riscontrata nelle cellule RIN1046-38 sovraesprimenti la variante G972R rispetto a quelle sovraesprimenti IRS-1 WT, suggerisce che la via IRS-1/PI3K abbia un ruolo nel processo di secrezione dell'insulina. Oltre all'azione metabolica, è noto che l'insulina è in grado anche di promuovere la replicazione e la sopravvivenza cellulare: Akt fosforilato, infatti, fosforila a sua volta la proteina BAD (appartenente alla famiglia delle proteine BCL-2, che regolano l'apoptosi) a livello della serina¹³⁶: ciò fa sì che BAD si dissocia dalla proteina anti-apoptotica Bcl-X_L, che altrimenti sequestrerebbe per esercitare la propria azione pro-apoptotica, e si leghi invece alle proteine citoplasmatiche 14-3-3; Bcl-X_L, così liberata, può promuovere la sopravvivenza cellulare bloccando il segnale delle caspasi [22]. Nelle isole pancreatiche esprimenti la variante G972R, si riscontra la riduzione della fosforilazione insulino-dipendente di BAD a livello della ser¹³⁶ ed un aumento dell'associazione tra BAD stessa e BCL-X_L [22]; inoltre, valutando il numero degli eventi ipodiploidi nelle isole siero-deprivate e poi trattate con insulina, si riscontra l'incapacità dell'ormone di inibire l'apoptosi in presenza del

polimorfismo (fig.20). Ciò è di nuovo da attribuire alla riduzione della trasduzione del segnale insulinico in presenza del polimorfismo, evidenziata dalla ridotta associazione di p85 a IRS-1 [22].

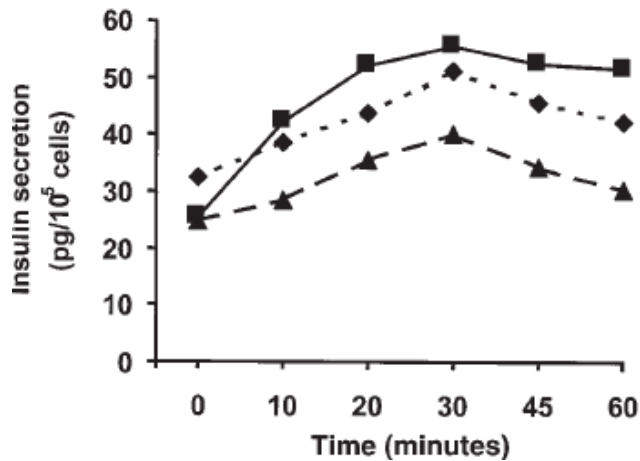


Fig.19 Time-course della secrezione insulinica stimolata dal glucosio. Le cellule RIN1046-38 di controllo (♦), quelle sovraesprimenti IRS-1 WT(■) e quelle sovraesprimenti IRS-1 G972R (▲) sono state incubate con Glucosio 2.8 mM per il tempo indicato e la concentrazione di insulina valutata dal sovrinatante tramite RIA [68].

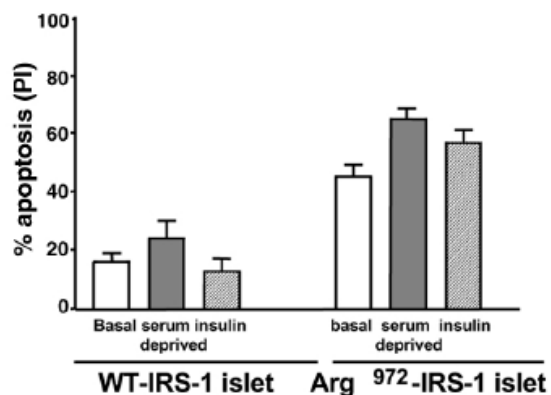


Fig.20 Le isole pancreatiche umane esprimenti il polimorfismo G972R-IRS-1 sono più vulnerabili all'apoptosi da siero-deprivazione delle isole esprimenti IRS-1 WT. L'apoptosi risulta aumentata nelle isole esprimenti il polimorfismo G972R rispetto a quelle WT per IRS-1, sia in condizioni basali (barra bianca) che dopo siero-deprivazione (barra grigio scuro); l'aggiunta di insulina per 24 ore (barra grigio chiaro) dopo la siero-deprivazione, riduce l'apoptosi nelle isole WT ma non in quelle esprimenti il polimorfismo [22].

- Riduzione *in vitro* dell'attività insulino-dipendente di eNOS nelle cellule endoteliali umane.

La disfunzione endoteliale è una condizione propria della patogenesi dell'aterosclerosi e degli stati insulino-resistenti, come il Diabete di tipo 2, l'obesità e l'ipertensione; la vasocostrizione propria della disfunzione endoteliale è dovuta alla riduzione dell'attività insulino-dipendente dell'enzima NO Sintetasi Endoteliale (eNOS), che indurrebbe la vasodilatazione, dopo la fosforilazione da parte di Akt sul residuo di Serina¹¹⁷⁷. In presenza del polimorfismo G972R nelle cellule endoteliali HUVEC, oltre ad una più debole trasduzione del segnale dell'insulina, che comincia dalla riduzione dell'associazione di p85 con IRS-1, si riscontra la riduzione della fosforilazione di eNOS proprio a livello del residuo di serina¹¹⁷⁷, rispetto alle HUVEC di controllo: ciò indica come il polimorfismo G972R possa contribuire alla patogenesi delle malattie cardiovascolari (fig.21) [69].

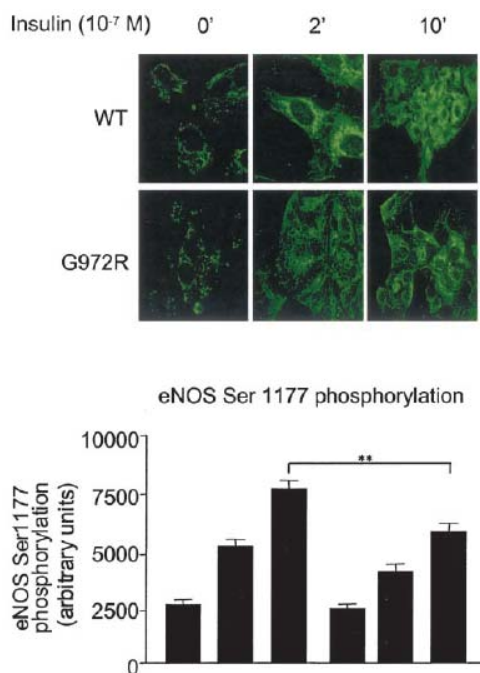


Fig.21 Fosforilazione di eNOS a livello della Serina¹¹⁷⁷ dopo stimolo con insulina nelle HUVEC WT ed esperimenti il polimorfismo G972R. Valutazione tramite saggio di immunofluorescenza [69]

3.3.3 La riduzione dell'azione dell'insulina da parte di G972R IRS-1 comincia dal recettore insulinico.

Il recente studio effettuato da Ron Kahn e collaboratori chiarisce ulteriormente il meccanismo molecolare alla base dell'impatto negativo che il polimorfismo G972R ha sulla trasduzione del segnale insulinico. Mediante l'utilizzo di peptidi ricombinanti, comprendenti i residui amminoacidici 925-1008 di IRS-1 o di IRS-1 G972R, Kahn dimostra infatti come il frammento IRS-1 925-1008 sia comunque fosforilato dopo incubazione con il recettore insulinico, nonostante la mancanza del residuo di tirosina⁹⁶⁰, necessario per una fosforilazione ottimale; nel caso del peptide 925-1008 G972R IRS-1, la fosforilazione risulta invece ridotta del 60% (fig.22) [11].

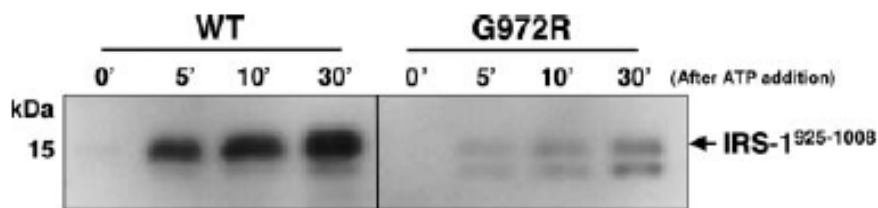


Fig.22 Fosforilazione *in vitro* dei frammenti ricombinanti IRS-1 (925-1008). I frammenti IRS-1(925-1008) WT e G972R sono stati incubati con il recettore insulinico in presenza di ATP 50 μ M ed è stato effettuato un time course di fosforilazione in tirosina, valutata tramite immunoblot con anticorpo anti-fosfotirosina [11].

L'analisi dei frammenti mediante spettrometria di massa conferma inoltre la significativa riduzione della fosforilazione a livello del residuo di tirosina⁹⁴¹, a monte del polimorfismo, rispetto al WT; non è stato invece possibile valutare la riduzione della fosforilazione a livello del residuo di tirosina⁹⁸⁹. Ulteriori esperimenti sono stati effettuati per confermare l'associazione dei frammenti ricombinanti col recettore insulinico e si osserva che entrambi i frammenti legano il recettore, ma tale legame è maggiore in presenza del polimorfismo (fig.23).

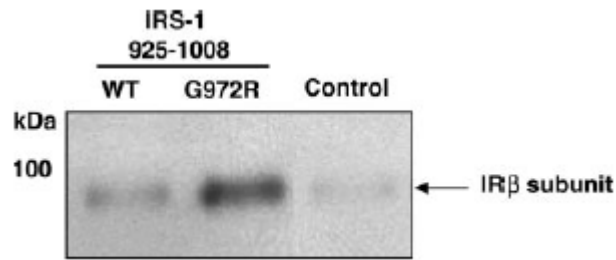


Fig.23 IRS-1(925-1008) si lega al recettore insulinico. Proteine di fusione IRS-1 (925-1008) WT e G972R, legate ad istidina sono state incubate con il recettore insulinico e ATP 50 μ M e fatti passare attraverso una resina ad affinità per il metallo, specifica per l'istidina; il campione di controllo era costituito da solo recettore insulinico, fatto passare attraverso la resina. Dopo SDS-PAGE, i campioni sono stati analizzati tramite immunoblot (IB) con anticorpo anti-subunità β del recettore insulinico[11].

La preincubazione dei frammenti IRS-1 (925-1008) WT e G972R col recettore insulinico, seguita dall'aggiunta di ATP e da un time-course per valutare l'autofosforilazione del recettore insulinico, mostra come, nel caso di incubazione col frammento WT, l'autofosforilazione del recettore sia significativa e costante durante l'esperimento; nel caso invece di incubazione col frammento G972R, l'autofosforilazione risulta fortemente ridotta: tale osservazione è molto importante, poiché indica che il frammento IRS-1 (925-1008) G972R agisce da inibitore competitivo sull'autofosforilazione di IR (fig.24). Il medesimo frammento è risultato in grado di inibire anche l'autofosforilazione di IGF-1R [11].

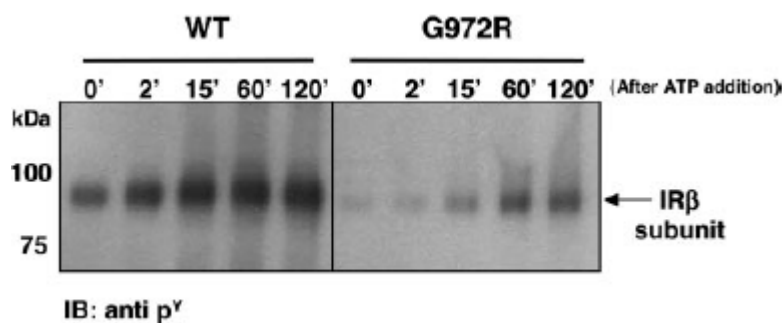


Fig.24 IRS-1 (925-1008) G972R inibisce l'autofosforilazione del recettore insulinico. Dopo l'aggiunta di ATP ed il time-course per verificare l'autofosforilazione di IR, i campioni, costituiti dai frammenti IRS-1 (925-1008) WT e G972R preincubati col recettore insulinico, sono stati separati tramite SDS-PAGE. I livelli di autofosforilazione di entrambi i recettori sono stati valutati tramite immunoblot (IB) con anticorpo anti-fosfotirosina (p^Y).[11]

Non è ancora chiaro quale sia il meccanismo preponderante nel determinare la ridotta fosforilazione di IRS-1 in presenza del polimorfismo G972R, se il cambiamento conformazionale di IRS-1 stesso, dovuto al polimorfismo, oppure il cambiamento di carica dovuto alla sostituzione della glicina⁹⁷² con un'arginina o se la ridotta fosforilazione di IRS-1 sia una conseguenza dell'inibizione dell'autofosforilazione di IR e quindi della sua azione chinastica; il polimorfismo G972R potrebbe interferire con il sito di legame all'ATP del dominio tirosina-chinastico di IR, a livello del residuo di lisina¹⁰¹⁸: l'arginina⁹⁷² del polimorfismo ha carica simile alla lisina¹⁰¹⁸ ed è noto che, se viene meno la capacità di legare l'ATP a livello di questo sito, viene meno anche l'attività tirosina-chinastica [11]. Tutti questi meccanismi, fin qui valutati *in vitro*, potrebbero contribuire all'azione inibitoria del polimorfismo G972R-IRS-1 sulla trasduzione del segnale insulinico.

4. SCOPO DELLO STUDIO

Tra le possibili cause della patogenesi del Diabete di Tipo 2 e degli squilibri metabolici ad esso legati, *in primis* l'insulino-resistenza, vi è l'interazione tra fattori genetici ed ambientali. Il polimorfismo Gly(G)→Arg(R)⁹⁷² di IRS-1 indebolisce la trasduzione del segnale insulinico *in vitro* in diversi modelli cellulari; dagli studi effettuati su soggetti portatori del polimorfismo, che abbiano sviluppato o meno il Diabete in concomitanza con una condizione di obesità, si evince come i soggetti esprimenti la variante G972R, presentino una ridotta sensibilità insulinica e una serie di fattori di rischio metabolici e cardiovascolari (quali un'elevata concentrazione di glucosio a digiuno ed elevati livelli dei trigliceridi plasmatici e dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno), rispetto ai soggetti che non la esprimano [63]: ciò suggerisce che la presenza del polimorfismo G972R aggravi il fenotipo di insulino-resistenza associato all'obesità. I soggetti non obesi, diabetici e prediabetici, portatori del polimorfismo, presentano invece livelli ridotti di insulina a digiuno [10]; soggetti con normale tolleranza al glucosio, eterozigoti per questo polimorfismo, presentano una minore secrezione di insulina in seguito ad un test da carico con glucosio e durante un clamp iperglicemico, rispetto ai soggetti non esprimenti la variante [10]. Il polimorfismo G972R potrebbe quindi contribuire, combinandosi con altri fattori genetici od ambientali, non solo all'insorgenza dell'insulino-resistenza, ma anche alla riduzione della secrezione insulinica, l'altra caratteristica preponderante del Diabete di tipo 2. Alla luce di questi risultati, lo scopo del nostro studio è valutare *in vivo* :

a) l'impatto del polimorfismo Gly→Arg⁹⁷² sull'omeostasi del glucosio e la sensibilità all'insulina;

b) quanto avrebbe potuto incidere sulla gravità del fenotipo l'interazione del polimorfismo con altri fattori ambientali, coinvolti nella patogenesi del Diabete di Tipo 2.

Abbiamo quindi generato un modello murino sovraesprimente la variante G972R della proteina IRS-1 umana (il topo Tg972): l'isolamento dei tessuti implicati nel mantenimento dell'omeostasi del glucosio, dopo stimolo *in vivo* con insulina, ci ha permesso di valutare l'efficienza della trasduzione del segnale a livello molecolare, in topi WT e sovraesprimenti la variazione G972R; attraverso la valutazione ripetuta dei parametri metabolici è stato possibile determinare come il polimorfismo interagisca con un fattore come l'età, noto per peggiorare il quadro associato all'insulino-resistenza ed al diabete di tipo 2; infine, sottoponendo i topi di entrambi i genotipi ad una dieta ad alto contenuto di grassi, abbiamo valutato se e come l'interazione tra polimorfismo e obesità aggravasse l'eventuale insulino-resistenza, in relazione all'infiammazione associata con l'aumento della massa grassa e implicata nella patogenesi della Sindrome Metabolica.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Il modello animale G972R.

5.1.1 Generazione di topi sovraesprimenti G972R-IRS-1 umano.

Il gene *irs1-G972R* umano è stato clonato nel sito di restrizione EcoRI del vettore pCAGGS, sotto il promotore ubiquitario della beta-actina, che era fuso, immediatamente a monte, con l'enhancer del citomegalovirus (CMV.IE enhancer). Per la generazione di topi transgenici, il costrutto è stato linearizzato tramite digestione con appropriati enzimi endonucleasici ed iniettato in pronuclei murini, nel laboratorio della Prof.ssa Fatima Bosch (Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain). L'identificazione dei founders è stata effettuata mediante Southern Blot su DNA estratto dalle code e la presenza del polimorfismo è stata quindi confermata mediante digestione enzimatica con l'enzima MvaI per il quale la mutazione inserisce una sequenza consenso.

5.1.2 Estrazione di DNA genomico dalla coda dei topi.

Il DNA genomico è stato estratto dalla coda dei topi utilizzando il Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguendo le istruzioni del produttore.

5.1.3 Genotipizzazione mediante Reazione a Catena della Polimerasi (PCR).

Per la genotipizzazione sono stati utilizzati i seguenti primers, specifici per il transgene:

forward 5'-CTTCTGTCAGGTGTCCATCC-3' ;

reverse 5'- TGGCGAGGTGTCCACGTAGC-3'.

Lo schema di amplificazione utilizzato è il seguente: 3 minuti a 94°; 30 secondi a 94°, 30 secondi a 58°, 45 secondi a 72°, per 37 cicli ; 3 minuti a 72 gradi. Il prodotto di amplificazione, una porzione del costrutto transgenico, è di 255 bp. La polimerasi utilizzata è stata la *Taq Platinum* ad una concentrazione finale di 0.125 U/μl; la miscela di reazione è stata preparata utilizzando il 10X PCR Rxn Buffer e il MgCl₂ come cofattore enzimatico alla concentrazione finale di 1.5 mM; è stato utilizzato il 100 mM dNTP Set PCR Grade alla concentrazione finale di 0.125 mM; DMSO al 10%, per favorire l'apertura della doppia elica. Il volume finale della reazione di PCR è di 20 μl in H₂O trattata con DEPC (DiEtilPiroCarbonato). Tutti i reagenti utilizzati nella reazione di PCR sono stati acquistati dalla ditta Invitrogen. Il Thermal Cycler utilizzato è il modello geneAmpPCR System 9700 (Applied Biosystems).

5.1.4 Procedure analitiche.

Diete utilizzate.

I tenori analitici delle diete utilizzate sono i seguenti:

-dieta standard (Normal Diet, ND, o ad alto contenuto di carboidrati):
16% proteine, 63% carboidrati, 2.5% grassi (SC, 5% delle calorie derivate dai grassi);

-dieta ad elevato contenuto di grassi (High Fat Diet, HFD): 21% proteine, 38.5% carboidrati, 23% grassi (60% delle calorie derivate dai grassi). Entrambe le diete sono state fornite dalla ditta Research Diets. Le operazioni di peso e controllo della glicemia, a digiuno ed in condizione di libero accesso al cibo, sugli animali sottoposti a dieta grassa sono state effettuate settimanalmente.

Misura della glicemia e dell'insulinemia.

Il sangue è stato prelevato dalla cavità retro-orbitale del topo, mediante l'utilizzo di capillari eparinizzati (Vitrex) e i livelli di glucosio sono stati misurati usando un glucometro commerciale (LifeScan, Johnson & Johnson) e le striscette reattive OneTouch Ultra. Il siero, ottenuto dalla centrifugazione dei campioni di sangue a 6000 rpm per 5 min a temperatura ambiente, è stato utilizzato per la determinazione dell'insulinemia. Il dosaggio dell'insulina nel siero è stato eseguito utilizzando il kit Ultrasensitive Mouse Insulin Elisa Kit (Mercodia), seguendo le istruzioni del produttore. Per il calcolo del rapporto tra glucosio plasmatico e insulina (G/I), il valore della glicemia misurato a digiuno (mg/dl) è stato diviso per quello dell'insulina, misurato nella medesima condizione (ng/ml).

IPGTT ed ITT.

I Test di Tolleranza al glucosio (IPGTT) ed i Test di Tolleranza all'insulina (ITT) sono stati eseguiti su animali sottoposti a dieta normale (ND) e a dieta grassa (HFD), a 3 e 6 mesi di età. Dopo un digiuno notturno (circa 15 ore di digiuno), i Test di tolleranza al glucosio sono stati effettuati iniettando 2g/Kg di peso corporeo di D-glucosio per via intraperitoneale (IP). Campioni di sangue sono stati prelevati dalla cavità retro-orbitale del topo a 0, 30, 60, 90 e 120 minuti dopo l'iniezione di glucosio, misurando la glicemia ad ogni punto della curva tramite il glucometro automatico (LifeScan, Johnson & Johnson). Test di tolleranza

all'insulina sono stati effettuati iniettando per via intraperitoneale insulina umana (Lilly Research Laboratories; 0.75U/Kg di peso corporeo) dopo 4 ore di digiuno. Il sangue è stato prelevato a 0, 10, 30 e 60 min dalla cavità retro-orbitale del topo con misurazione della glicemia come descritto precedentemente.

5.2 Stimolazione *in vivo* con insulina.

Dopo sei ore di digiuno, i topi WT e Tg972 sono stati anestetizzati mediante un'iniezione intraperitoneale di Pentobarbital (40 mg/Kg corporeo). 5U di insulina umana sono state iniettate nella vena porta epatica e dopo 3 minuti i tessuti sono stati raccolti e congelati istantaneamente in azoto liquido.

5.3 Preparazione degli estratti proteici tissutali, degli immunoprecipitati e analisi Western Blot.

I lisati proteici di tessuto adiposo bianco, muscolo scheletrico, fegato, cuore, pancreas e isole pancreatiche sono stati preparati utilizzando un buffer di lisi contenente Triton 1%, Glicerolo 1%, EDTA 2mM, NaCl 137 mM, TrisHCl 20 mM (pH 7.6), MgCl₂ 20 mM e CaCl₂ 20 mM a cui venivano aggiunti, poco prima dell'utilizzo, i seguenti inibitori di proteasi: 2mM PMSF, 2mM Na₃VO₄, 10 mM NaPP, 10 mM NaF, 8µg/ml Leupeptina. I pezzi anatomici sono stati posti in tubi di polipropilene (Falcon), mantenuti in ghiaccio e omogenizzati. L'omogenato è poi stato trasferito in tubi da 1.5 ml (Eppendorf), incubato a 4°C per 45 minuti e quindi centrifugato a 13000 rpm per 15 minuti, alla temperatura di 4°C. Infine, il sovrantante è stato trasferito in nuovi tubi da 1.5 ml. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo Bradford (Protein Assay Kit, BioRad). L'analisi Western Blot è stata condotta

come di seguito descritto: 100 µg di proteine sono stati separati mediante SDS-PAGE e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa. I campioni da separare in SDS-PAGE venivano prima bolliti per 5 min in un tampone di caricamento costituito da buffer di lisi e 4X Laemmli buffer (20 mL di glicerolo, 4 g di SDS, 25 mL di 0,5 M Tris a pH 6.8 contenente 0,4% SDS, 10 mg di blu di bromofenolo, portato a volume finale di 50 mL con H₂O bidistillata) e poi raffreddati in ghiaccio per altri 5 min prima di essere analizzati in Western Blot. La separazione elettroforetica delle proteine è stata condotta a temperatura ambiente ad un voltaggio costante di 60 V. Il processo di trasferimento, della durata massima di due ore e trenta minuti, è stato eseguito utilizzando il tampone Tris/Glicina (25 mM Tris, 192 mM Glicina) con 20% di metanolo, utilizzando un amperaggio costante di 75 mA. Al termine del trasferimento, la membrana è stata lavata con H₂O distillata per eliminare eventuali residui di acrilammide e incubata per due ore in una soluzione di blocco costituita da 1X TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl pH 7,6 con HCl), contenente 0.1% Tween-20 (TBS-T 0,1%) e 5% di latte in polvere privo di grassi; questa soluzione è in grado di bloccare i siti di interazione idrofobica riducendo al minimo le interazioni aspecifiche antigene-anticorpo. Dopo tre lavaggi di 10 min, ognuno in TBS-T 0.1%, la membrana di nitrocellulosa è stata incubata con l'anticorpo specifico per la proteina di interesse, detto anticorpo primario, a 4°C per tutta la notte in costante agitazione. Al termine dell'incubazione sono stati eseguiti altri tre lavaggi di 10 min ognuno in TBS-T 0.1% e in seguito la membrana è stata incubata a temperatura ambiente in una soluzione contenente l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima HRP (HorseRadish Peroxidase). Le proteine sono state rilevate tramite Chemiluminescenza Enzimatica (ECL). Le immagini ottenute sulle lastre fotografiche sono state acquisite e quantificate tramite il

programma Quantity One 4.1.1 dello strumento Versadoc (Bio-Rad). Quando opportuno i lisati proteici sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione prima della corsa elettroforetica. Gli immunoprecipitati sono stati preparati in tubi eppendorf da 1.5 mL incubando 1 mg di proteine dei lisati totali, su un agitatore rotante a 4°C per tutta la notte (Over Night, O/N) in presenza dell'anticorpo primario. Il giorno seguente, sono stati aggiunti ai campioni 60 µl della resina proteina A ed i campioni sono stati tenuti in agitazione per altre due ore. Sono quindi stati eseguiti tre lavaggi con un Wash buffer (composizione: 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.6), 1% NP-40 a cui venivano aggiunti, poco prima dell'utilizzo, 1mM PMSF e 1mM Na₃VO₄), centrifugando di volta in volta a 4°C per 1 min alla massima velocità. Dopo l'ultimo lavaggio il sopranatante viene eliminato e si aggiungono 30 µL di 4X Laemmli buffer. Successivamente i campioni sono stati scaldati a 95°C per 5 min e centrifugati alla massima velocità. Infine, dopo aver eliminato la resina, i campioni sono stati caricati sul gel di poliacrilammide. Gli anticorpi utilizzati sono i seguenti: anti-IRS1, antiphospho-Tyr941 IRS-1 (Biosource International), anti-phospho-Tyr989 IRS-1 (Santa Cruz Biotechnologies), anti-IRS-2, anti PI3K p85 subunit (Upstate Biotechnology), anti- phospho-Ser473Akt, anti-Akt, anti-phospho-Ser21/Ser9 α/βGSK3 (Cell Signalling Technology), anti total phosphotyrosine (Becton and Dickinson). La resina proteina A è stata fornita dalla ditta Amersham.

5.4 Estrazione dell'RNA totale e analisi quantitativa dell'espressione genica mediante Real-Time PCR.

L'RNA totale è stato isolato dal tessuto adiposo bianco utilizzando il metodo del TRIzol (Invitrogen), soluzione monofasica di fenolo e

guanidina isotiocianato, seguendo le istruzioni. 2 µg di RNA sono stati retrotrascritti a 37°C per 2 h utilizzando l'High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) seguendo le istruzioni. Le condizioni della reazione di trascrizione inversa sono state: 10 min a 25°C e 120 min a 37°C. 50 ng di cDNA sono stati utilizzati nelle reazioni di Real-Time PCR, condotte in duplicato, utilizzando lo strumento ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) in un volume totale di 25 µl utilizzando la TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e il 20X TaqMan Gene Expression assay, contenente TaqMan MGB probe marcato con il reporter dye FAM (6-carboxy-fluorescein) e i primers per la PCR. I campioni così preparati sono stati dispensati in MicroAmp Optical 96-well Reaction Plates (Applied Biosystems). Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti per tutti i primers: 50°C per 2 min; 95°C per 10 min; 95°C per 15 sec e 60°C per 1 min (40 cicli). I primer relativi ai geni presi in esame sono: Adiponectina (Mm00456425_m1); Resistina (Mm00445641_m1); PPAR-γ (Mm01184321_m1); Leptina (Mm00434759_m1). Il gene costitutivo (housekeeping) utilizzato come riferimento è stato quello della β-actina (Mm00607939_s1). Tutti i primers utilizzati nelle reazioni di Real-Time PCR sono stati forniti dalla ditta Applied Biosystems. Il valore di ciclo soglia (Ct) per ogni campione è stato valutato in duplicato ed i livelli di espressione sono stati determinati comparando i Ct di ogni gene di interesse rispetto al Ct del gene di riferimento.

5.5 Purificazione delle isole pancreatiche e valutazione della secrezione insulinica.

Ogni topo è stato iniettato nel dotto pancreatico con 3 ml di una soluzione 1mg/ml di Collagenasi di tipo P (Boehringer Mannheim) in

Buffer Hanks, tenuta in ghiaccio; una volta isolati, i pancreas sono stati tenuti in ghiaccio, in fiasche da 75 cm² (Falcon), fino al momento di essere incubati per 16 minuti a 37°. Dopo l'incubazione, i pancreas sono stati di nuovo messi in ghiaccio; quindi sono stati aggiunti 30 ml di Buffer Hanks + 10% di Fetal Calf Serum e Gentamicina allo 0.1%. Il tutto è stato trasferito in tubi da 50 ml (Falcon, due tubi per fiasca) ed è stato agitato fino ad ottenere una sospensione. Sono stati aggiunti Buffer Hanks, FCS al 10% e Gentamicina allo 0.1% fino a volume e la sospensione è stata centrifugata per 4 minuti a 11000 rpm. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in 30 ml di Hanks, 10% FCS e Gentamicina allo 0.1% e filtrato in tubi puliti; al termine il filtro è stato ripulito con 20 ml di Hanks + 10% FCS + 0.1% Gentamicina. Il tutto è stato di nuovo centrifugato a 1000 rpm per 4 minuti, il pellet risospeso in 20 ml di Histopaque (Sigma), diviso in due tubi ed agitato fino ad ottenere una soluzione omogenea, su cui 10 ml di Hanks senza siero sono stati stratificati molto lentamente, per ottenere un gradiente; il tutto è stato centrifugato per 10 minuti a 2400 rpm senza freno. Le isole pancreatiche della stessa grandezza così ottenute (100-150µm), sono state selezionate a mano e tutti gli esperimenti effettuati con isole di un singolo gruppo di raccolta. Le isole sono state lavate in medium M199 con FBS e tenute in coltura per 48 ore a 37°. L'esperimento di secrezione è stato effettuato in piastre 12-well (15-25 isole per pozzetto). Dopo l'incubazione, il mezzo è stato raccolto, centrifugato e conservato a -20° per le successive misure del contenuto di insulina, che è stato valutato come rapporto tra i mg di insulina presenti nel mezzo al termine dell'incubazione e la quantità di insulina rimasta nelle isole; tale rapporto è quindi stato normalizzato per il contenuto di DNA totale delle isole presenti nel pozzetto.

5.6 Analisi istologica del pancreas.

Il pancreas, ottenuto da topi di età compresa tra i quattro ed i sei mesi, è stato fissato O/N in paraformaldeide al 4% e incluso in paraffina. Sezioni consecutive di 10 μ m sono state montate su vetrini, deparaffinate con xilene e colorate mediante ematossilina-eosina. La colorazione per l'insulina o il glucagone è stata effettuata utilizzando il kit Histomouse-SP (Zymed Laboratories Inc.), secondo le istruzioni del produttore. Sei sezioni per ogni pancreas sono state acquisite ad un ingrandimento del 10X e del 20X e quantificate per la misura della superficie: le aree corrispondenti alle β -cellule sono state misurate dividendo le aree positive all'immunoreattività con insulina per la superficie totale del pancreas. A questo scopo è stato utilizzato il software Lucia G Version 4.61 (Build 64) on Lucia.

5.7 Valutazione del contenuto di insulina.

Per valutare il contenuto di insulina, i pancreas sono stati tenuti O/N a -20° in un Buffer di estrazione acido-etanolo (1.5 % HCl, 75% etanolo); gli estratti sono stati conservati a -20° .

5.8 Trasporto del glucosio *in vivo* durante un IPGTT.

2g/kg corporeo di glucosio marcato radioattivamente (2-Deossi-D-[1,2,³H]-glucosio, in quantità pari a 10 μ Ci/ per topo, Amersham Biosciences), misto a destrosio al 20%, è stato iniettato in topi di sei mesi di età, appartenenti ad entrambi i genotipi e di uguale peso. I campioni di sangue sono stati ottenuti dalla cavità retroorbitale a 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minuti dopo l'iniezione ed utilizzati per valutare l'attività specifica

del glucosio. A questo scopo, 3 μ l di plasma sono stati privati delle proteine con 200 μ l di acido perclorico al 3.5%, centrifugati e neutralizzati con 45 μ l di KHCO₃ 2.2M. La radioattività è stata misurata con un rivelatore a scintillazione (LS 6500, Beckman Instruments); l'attività specifica del glucosio (valutata in degenerazioni per minuto per micromole) è stata calcolata dividendo la radioattività del campione per la concentrazione del glucosio, e l'area sotto la curva è stata integrata per la durata dell'esperimento (120 minuti). A 120 minuti, i topi sono stati sacrificati ed i tessuti congelati istantaneamente in azoto liquido. Per determinare l'accumulo tissutale di 2-deossiglucosio-6-fosfato (2-DOG-6-fosfato), una quantità di tessuto tra i 100 ed i 500 mg (tricipite e tessuto adiposo perigonadale) è stata omogeneizzata in 2 ml di acqua distillata e 1.6 ml dell'omogenato sono stati trasferiti in 1.6 ml di acido perclorico al 7%. Il campione è stato centrifugato per rimuovere le proteine precipitate ed il sovrinatante è stato neutralizzato per 30 minuti con 625 μ l di KHCO₃ 2.2M. Il precipitato è stato rimosso per centrifugazione ed il sovrinatante diviso in aliquote da 800 μ l. Un'aliquota è stata utilizzata per determinare la radioattività totale dovuta al trizio, un'altra è stata fatta passare attraverso una resina a scambio anionico per rimuovere il 2-DOG-6 fosfato marcato. La colonna è stata lavata con 3 ml di acqua distillata e la radioattività dell'acqua eluata è stata misurata con un rivelatore a scintillazione. La differenza tra la radioattività totale e quella dell'eluato, dovute al trizio, rappresenta il 2-deossi-D- [1,2,³H]-glucosio-6-fosfato accumulato. Il pellet proteico è stato digerito per 20 minuti a 55° con KOH 1N e la concentrazione proteica determinata con il metodo di Bradford (Bio-Rad). Per calcolare l'uptake di 2-DOG, i conteggi (degenerazioni per minuto) sono stati divisi per l'area integrata di attività specifica del glucosio sotto la curva e per il contenuto proteico del campione.

5.9 Incorporazione del 2-DOG in glicogeno epatico durante un IPGTT.

Il fegato, fino a quel momento conservato a -80°C , è stato polverizzato con mortaio e pestello in azoto liquido e digerito con 500 μl di KOH 1N. Il contenuto proteico è stato valutato con il metodo di Bradford. Aliquote da 350 μl sono state aggiunte ad un volume doppio di etanolo al 100% ghiacciato. Le macromolecole sono quindi state fatte precipitare O/N a -20° e separate tramite centrifugazione a 1680 g per 30 minuti. Dopo 3 lavaggi con etanolo al 66%, a -20° , il pellet è stato fatto asciugare e lasciato dissolvere per 15 minuti a 55° in 100 μl di KOH 1N. Il prodotto della digestione è stato diluito con 300 μl (tre volumi) di 0.25N HCl:0.15N di sodio acetato 1:1. L'incorporazione della radioattività dovuta al trizio è stata misurata in un ml di prodotto digerito. Per determinare l'incorporazione del 2-DOG in glicogeno epatico, la radioattività dovuta al trizio nei conteggi del glicogeno (degenerazioni per minuto) è stata divisa per l'area integrata dell'attività specifica del glucosio e normalizzata per il contenuto proteico. Anche le concentrazioni di glicogeno sono state normalizzate per il contenuto proteico.

5.10 Analisi statistica.

I risultati degli studi sperimentali sono espressi come medie \pm la deviazione standard (SD). Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il test ANOVA o il t-test di Student, come indicato. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$.

6. RISULTATI.

6.1 La variante G972R di IRS-1 umano è sovraespressa ubiquitariamente nei topi transgenici Tg972.

Abbiamo ottenuto due linee di topi transgenici, denominate L1 ed L2, in cui abbiamo verificato l'effettiva sovraespressione della proteina G972R-IRS-1 umana rispetto ai topi di controllo (topi wild-type o WT), provenienti dalle medesime cucciolate dei transgenici; nella fig. 25 sono riportati i risultati, ottenuti in cinque diversi esperimenti, del Western Blot effettuato su fegato (a), muscolo scheletrico (b), tessuto adiposo bianco (c), cuore (d), pancreas intero (e) e isole pancreatiche (f) di un topo transgenico per ognuna delle due linee L1 ed L2 e di un topo WT a tre mesi di età; i lisati proteici sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione ed immunoblot con anticorpo anti-IRS-1.

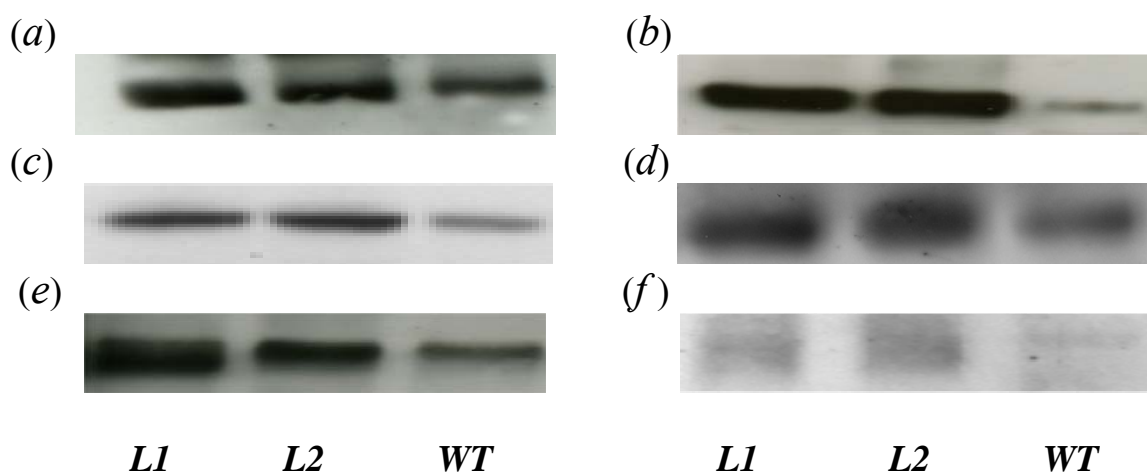


Fig. 25 Sovraespressione di IRS-1 nelle due linee L1 ed L2 di topi transgenici. I fegati (a), i muscoli (b), i tessuti adiposi (c), i cuori (d), i pancreas interi (e) e le isole pancreatiche (f) dei topi transgenici L1 ed L2 e dei topi WT sono stati lisati e la sovraespressione di IRS-1 verificata tramite immunoprecipitazione e Western Blot con anticorpo anti-IRS-1.

Non sono state riscontrate differenze significative tra le due linee di topi transgenici, nei parametri metabolici, nel peso e nella lunghezza; pertanto,

per gli esperimenti successivi abbiamo deciso di utilizzare la linea L₁. Confrontando topi Tg972 e WT fino a otto mesi di età, non abbiamo riscontrato differenze significative nel peso e nella lunghezza. Nella fig. 26 è riportato un grafico che mostra l'andamento del peso dei topi di entrambi i genotipi fino a 40 settimane di età.

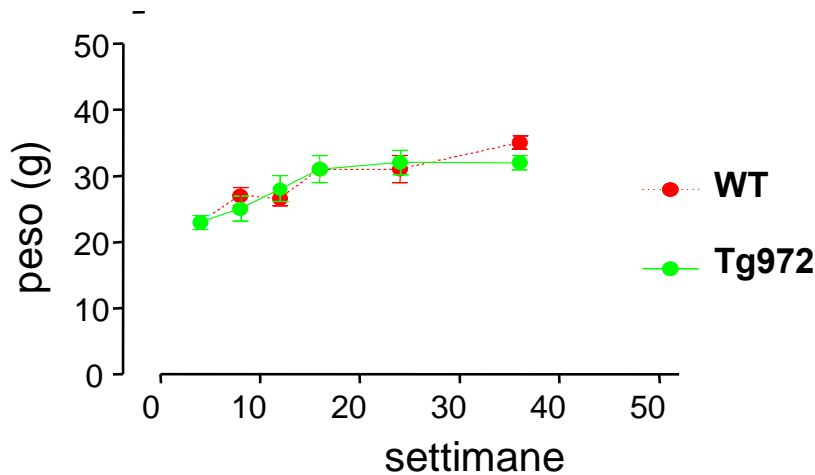


Fig. 26 Andamento dei pesi nei topi Tg972 e WT fino a 40 settimane di età.

6.2 Caratterizzazione metabolica dei topi Tg972 a 3 e 6 mesi di età.

Per comprendere l'effetto della variante G972R-IRS-1 sul metabolismo del glucosio a livello sistemico, sono state valutate le glicemie e le insulinemie di topi di entrambi i genotipi a 3 e 6 mesi di età, a digiuno e nutriti *ad libitum*, sottoposti a dieta normale (tabella 3). A tre mesi di età, i livelli di glucosio e di insulina a digiuno e non, sono risultati leggermente più elevati, anche se non in modo significativo, nei topi Tg972 rispetto ai WT (n= 30-45 per i topi WT; n= 25-40 per i Tg972, tabella 3); tuttavia, i tests da carico IPGTT ed ITT hanno evidenziato una tendenza significativa dei topi transgenici verso una condizione di insulino-resistenza ed intolleranza al glucosio (fig. 27, n=5-10 per genotipo, $P < 0.01$).

	Topi WT		Topi Tg972	
	3 mesi	6 mesi	3 mesi	6 mesi
Glicemia non a digiuno (mg/dl)	120±30 (n=30)	140±20 (n=25)	132±42.9 (n=25)	165±43 [#] (n=30)
Insulinemia non a digiuno (ng/ml)	1.1±0.25 (n=20)	1.2 ±0.6 (n=15)	0.95±0.43 (n=22)	0.75±0.4 [†] (n=12)
Glicemia a digiuno (mg/dl)	75±21 (n=45)	85±22 (n=20)	82±20 (n=40)	115±34 [#] (n=28)
Insulinemia a digiuno (ng/ml)	0.65±0.14 (n=15)	0.75±0.4 (n=18)	0.55±0.4 (n=17)	0.52±0.4 (n=16)

Tabella 3. Parametri metabolici dei topi WT e Tg972 a 3 e 6 mesi di età, sottoposti a dieta normale. I campioni sono stati ottenuti da topi maschi, nutriti *ad libitum* o dopo un digiuno O/N. I dati sono espressi come media ± SD. [#] P<0.01, [†]P<0.05 per i topi Tg972rispetto ai WT, a sei mesi di età. Analisi statistica effettuata con t- test di Student.

A sei mesi, invece, i topi transgenici sono risultati iperglicemici in entrambe le condizioni (P<0.01, n=20-25 per i topi WT; n=28-30 per i topi Tg972, tabella 3 e fig. 29) ed il loro livello di insulina era inadeguatamente basso, particolarmente in condizioni di libero accesso al cibo (p<0.05, n=12-15 per genotipo), rispetto ai livelli ematici di glucosio (tabella 3, n= 15-18 per i topi WT; n=17-21 per i topi Tg972; P<0.001).

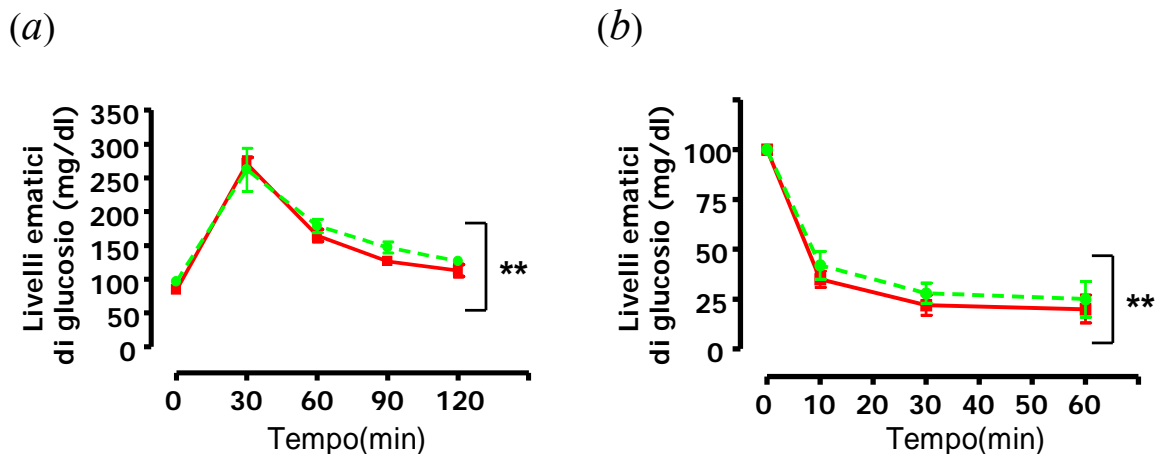


Fig 27. IPGTT e ITT su topi WT e Tg972 a tre mesi di età. (a) Concentrazioni di glucosio dopo un test da carico intraperitoneale di glucosio (IPGTT, pannello a) e dopo un test di tolleranza all'insulina (ITT, pannello b) nei topi WT (●) e Tg972(●) a tre mesi di età. I dati sono espressi come medie ± SD; l'analisi statistica è stata effettuata con il test 2-way ANOVA (n=5-10 per genotipo).

I tests da carico IPGTT ed ITT sui topi di entrambi i genotipi a 6 mesi di età, hanno messo in evidenza un netto peggioramento del fenotipo dei topi

Tg972, paragonati ai WT, rispetto ai tests effettuati in precedenza (fig. 28, n=5-10 per genotipo, P<0.0001).

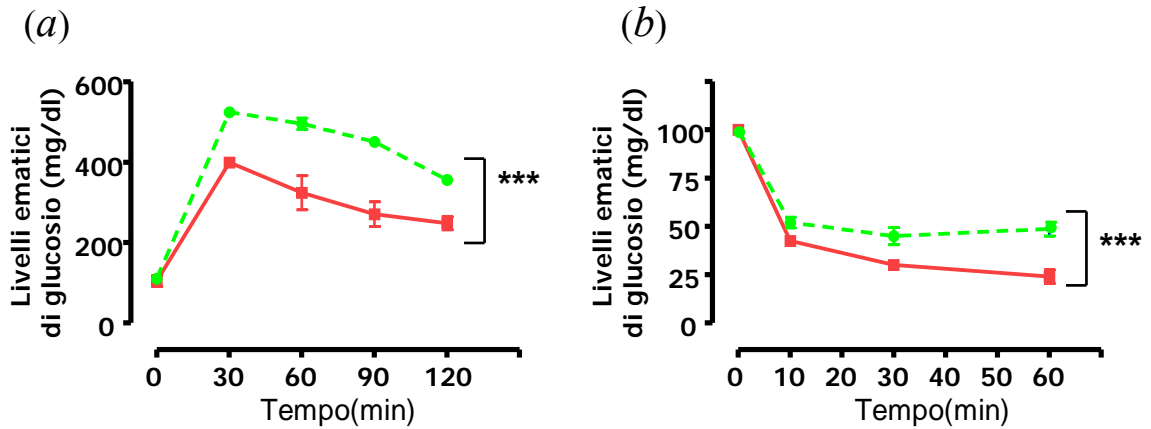


Fig 28. IPGTT e ITT su topi WT e Tg972 a sei mesi di età. (a) Concentrazioni di glucosio dopo un test da carico intraperitoneale di glucosio (IPGTT, pannello a) e dopo un test di tolleranza all'insulina (ITT, pannello b) nei topi WT (●) e Tg972(●) a sei mesi di età. I dati sono espressi come medie \pm SD; l'analisi statistica è stata effettuata con il test 2-way ANOVA (n=5-10 per genotipo).

Il rapporto glucosio/insulina (fig. 29), anch'esso valutato a sei mesi di età su topi di entrambi i genotipi, è risultato significativamente più elevato nei topi Tg972 rispetto ai WT, costituendo un ulteriore indice della condizione di ipoinsulinemia, ora manifesta nei transgenici (rapporto valutato come [mg/dl]/[ng/ml], n=12-14 per genotipo, P<0.0001).

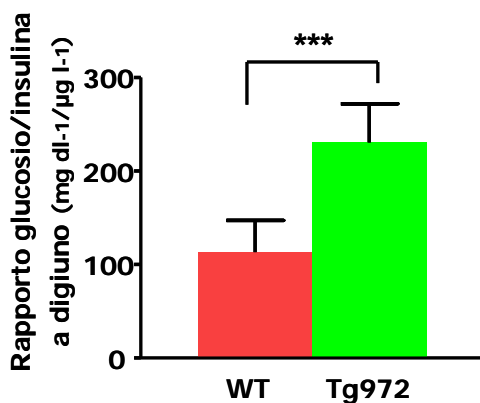


Fig.29. Il rapporto glucosio/insulina nei topi WT e Tg972 a sei mesi di età. Valutato come mg dl-1/ng ml-1, su 12-14 topi per genotipo. ***p<0.0001 per i topi Tg972 rispetto ai WT. Analisi statistica effettuata con t-test di Student.

6.3 Le possibili cause del fenotipo riscontrato nei topi Tg972 a sei mesi di età: insulino-resistenza periferica o ridotta secrezione insulinica?

6.3.1 Analisi della morfologia del pancreas.

Per valutare l'efficienza della secrezione insulinica nei topi transgenici, abbiamo analizzato la morfologia ed il contenuto di insulina dei pancreas di topi WT e Tg972, oltre ad effettuare un test di secrezione insulinica sulle loro isole pancreatiche; l'età che abbiamo considerato era compresa fra i 4 ed i 6 mesi, essendo questo il momento in cui l'ipoinsulinemia nei topi transgenici diventa manifesta. Come si può osservare dalle fig. 30 e 31, in cui sono mostrate sezioni di pancreas di topi WT (fig. 30 pannelli *a* e *c*; fig. 31 pannelli *a* e *c*) e Tg972 (fig. 32, pannelli *b* e *d*; fig. 33 pannelli *b* e *d*), rappresentative di 4 diversi animali per genotipo (e di sei sezioni per ogni topo), non ci sono differenze significative nel numero e nella struttura delle isole. Le immagini sono state ottenute dopo colorazione con anticorpo anti-insulina (fig. 30) o anti-glucagone (fig. 31) e sono mostrate ad un ingrandimento 10X (fig. 30 e 31, pannelli *a* e *b*) e 20X (fig. 30 e 31, pannelli *c* e *d*). Anche l'analisi morfometrica dell'area delle β -cellule non ha evidenziato differenze tra i due genotipi (fig.32); le aree beta-cellulari sono state calcolate come percentuale dell'area totale dei pancreas analizzati ed i loro valori, che si riferiscono a sei sezioni per topo, ottenute da 4 topi per genotipo, sono espressi come media \pm SD.

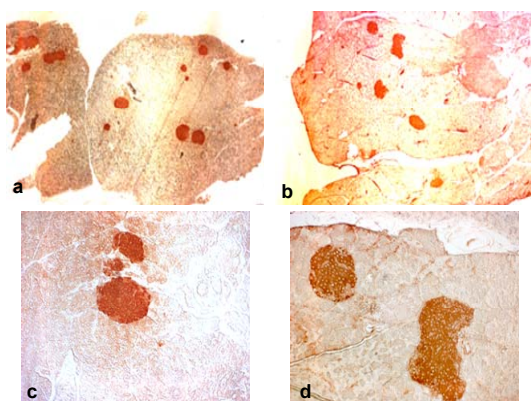


Fig. 30 Sezioni di pancreas di topi Tg972 e WT colorate con anticorpo anti-insulina. Le immagini, mostrate ad un ingrandimento 10X (pannelli *a* e *b*) e 20X (pannelli *c* e *d*), sono rappresentative di sei sezioni per ogni topo, ottenute da 4 topi WT (*a*, *c*) e 4 topi Tg972 (*b*, *d*) di età compresa tra i quattro ed i sei mesi.

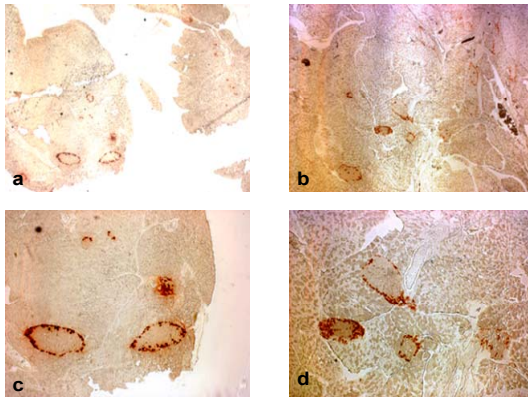


Fig. 31 Sezioni di pancreas di topi Tg972 e WT colorate con anticorpo anti-glucagone. Le immagini, mostrate ad un ingrandimento 10X (pannelli *a* e *b*) e 20X (pannelli *c* e *d*), sono rappresentative di sei sezioni per ogni topo, ottenute da 4 topi WT (*a*, *c*) e 4 topi Tg972 (*b*, *d*) di età compresa tra i quattro ed i sei mesi.

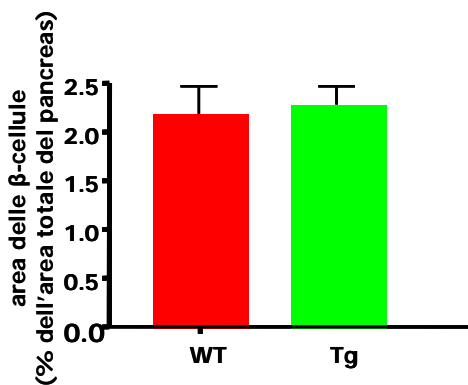


Fig. 32 Analisi morfometrica dell'area delle beta-cellule. L'analisi è stata eseguita su sei diverse sezioni per topo, ottenute da 4 topi per genotipo, di età compresa tra i quattro ed i sei mesi. I risultati sono espressi come media \pm SD.

6.3.2 Valutazione del contenuto totale di insulina nel pancreas.

Non abbiamo riscontrato differenze significative fra i due genotipi nel contenuto pancreatico di insulina, normalizzato per il contenuto proteico dell'intero pancreas (3.445 ± 2.41 e 3.875 ± 2.49 ng insulina/microgrammi di proteine totali nei WT e nei Tg972, rispettivamente).

6.3.3 Valutazione della secrezione insulinica *in vitro*.

La secrezione insulinica, valutata *in vitro* su isole pancreatiche di topi di entrambi i genotipi, dopo incubazione con diverse concentrazioni di glucosio, è risultata fortemente ridotta nei topi transgenici, ad ogni concentrazione di glucosio utilizzata ($p < 0.0001$). L'esperimento è stato effettuato due volte, in quadruplicato, su topi di età compresa tra i quattro ed i sei mesi: il rilascio di insulina è stato valutato come rapporto tra i mg di insulina presenti nel mezzo al termine dell'incubazione e la quantità di insulina rimasta nelle isole. Tale rapporto è quindi stato normalizzato per il contenuto di DNA totale delle isole presenti nel pozzetto; ed è espresso nella fig.33 come media \pm SD.

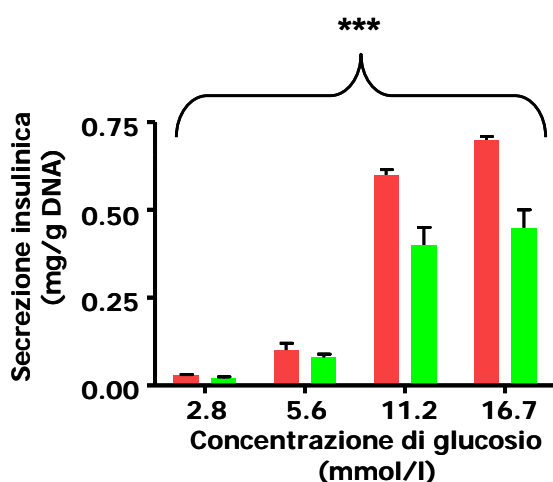


Fig. 33 Valutazione della secrezione insulinica dopo stimolo con diverse concentrazioni di glucosio, su isole pancreatiche di topi WT e Tg972. Le isole sono state ottenute da topi WT e Tg972 di età compresa tra i quattro ed i sei mesi; il risultato è rappresentativo di due esperimenti, ciascuno effettuato in quadruplicato. I dati sono espressi come media \pm SD. *** $p < 0.0001$ per i topi WT rispetto ai 972; l'analisi statistica è stata eseguita con il test 2-way ANOVA.

6.3.4 Valutazione dell'insulino-resistenza periferica.

Abbiamo valutato il trasporto del glucosio, marcato radioattivamente (2-DOG), nel tessuto adiposo (fig. 34a, $n=5$ per genotipo) e nel muscolo (fig. 34b, $n=5$ per genotipo) di topi appartenenti ad entrambi i genotipi, a sei mesi

di età e la sua incorporazione in glicogeno a livello epatico (fig.34c, n=5 per genotipo). Tale valutazione è stata effettuata al termine di un IPGTT ed i risultati sono espressi come rapporto tra le moli di 2-DOG ed i milligrammi di proteine per minuto: nei topi Tg972 è stata riscontrata una riduzione del trasporto del glucosio pari al 42% ($p < 0.01$) nel tessuto adiposo e al 40% ($p < 0.05$) nel muscolo scheletrico, rispetto ai WT. Anche l'incorporazione del 2-DOG in glicogeno epatico è risultata fortemente ridotta nei topi transgenici rispetto ai WT (riduzione del 42%, $p < 0.0001$).

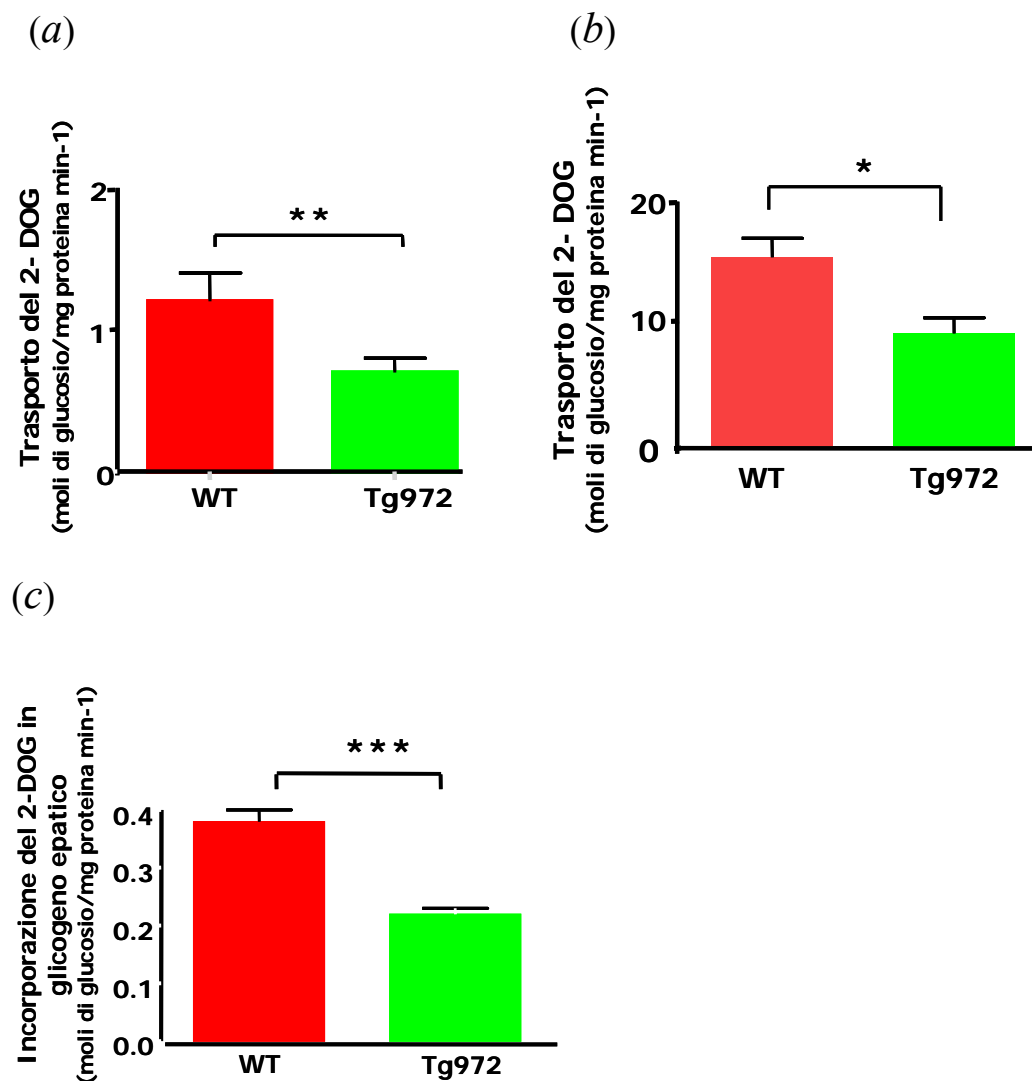


Fig. 34 Alterazione dell'azione periferica dell'insulina in presenza del polimorfismo G972R.

Il trasporto del 2-DOG è stato valutato durante un IPGTT nel muscolo scheletrico (a) e nel tessuto adiposo (b) di topi di entrambi i genotipi e dell'età di sei mesi. (c) Valutazione dell'incorporazione del 2-DOG come glicogeno epatico. I dati sono espressi come moli/milligrammi di proteine per minuto e sono espressi come

medie \pm SD (n=5 per genotipo) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001 per i Tg972 rispetto ai WT; analisi statistica effettuata con il t-test di Student.

6.4 Effetto della variante G972R sui meccanismi molecolari alla base del fenotipo riscontrato nei tessuti target dell'insulina.

Per la valutazione della trasduzione del segnale insulinico dopo stimolo *in vivo* con l'ormone, topi anestetizzati, appartenenti ad entrambi i genotipi, sono stati iniettati con 5 U di insulina nella vena porta epatica; tre minuti dopo i tessuti sono stati raccolti ed utilizzati per i Western Blot.

6.4.1 Valutazione in vivo della fosforilazione di IRS-1 a livello dei residui di tirosina 941 e 989.

Le immagini riportate nella figura 35 mostrano le fasi iniziali della trasduzione del segnale insulinico nel fegato di topi WT e Tg972 e sono rappresentative di 5 esperimenti, effettuati su 4 topi per genotipo, di età compresa tra i 3 ed i 4 mesi. Dopo immunoprecipitazione con anticorpo anti-IRS-1 ed immunoblot con anticorpo anti-IRS-1 o anti-fosfotirosina (pY), abbiamo valutato la fosforilazione totale in tirosina di IRS-1 nei topi di entrambi i genotipi (pannello *b*, fig. 35): quest'ultima è risultata maggiore nei topi Tg972, in modo proporzionale e paragonabile all'incremento dell'espressione di IRS-1 (pannello *a*, fig. 35) (p<0.01, n=4 per genotipo). Tale incremento è stato quantificato tramite densitometria: i valori ottenuti per la pY nei transgenici sono stati dapprima normalizzati per quelli relativi a IRS-1 sovraespresso; quindi tutti i valori misurati (sia quelli dei Tg972 che quelli dei WT, prima e dopo lo stimolo) sono stati normalizzati rispetto al valore relativo al WT basale, ed espressi, per la rappresentazione grafica, come percentuale rispetto ad esso; il WT basale è stato espresso graficamente

con il valore rappresentativo di 100 Unità Arbitrarie (u.a.). L'immagine della densitometria relativa alla fosforilazione totale in tirosina di IRS-1 nei topi WT e Tg972, dopo stimolo con insulina, è mostrata nella fig. 36.

Abbiamo osservato, dopo lo stimolo con insulina, una forte riduzione della fosforilazione di IRS-1 a livello dei residui di tirosina 941 e 989, come si evince dalle immagini dei Western Blot mostrate nella fig. 35, pannelli *c* (rappresentativo del blot con anticorpo anti IRS-1pY⁹⁴¹) e *d* (rappresentativo del blot con anticorpo anti IRS-1pY⁹⁸⁹). La densitometria su queste immagini ha evidenziato nei topi Tg972, dopo stimolo con insulina, una riduzione della fosforilazione della tirosina⁹⁴¹ e della tirosina⁹⁸⁹ di IRS-1, rispettivamente del 75% ($p < 0.01$, $n = 4$ per genotipo) e del 73% ($p < 0.05$, $n = 4$ per genotipo) rispetto ai WT. Tali quantificazioni sono mostrate nella fig. 37, pannello *a* (Y⁹⁴¹) e *b* (Y⁹⁸⁹): i valori ottenuti sono stati normalizzati in modo analogo a quelli relativi a IRS-1-pY totale.

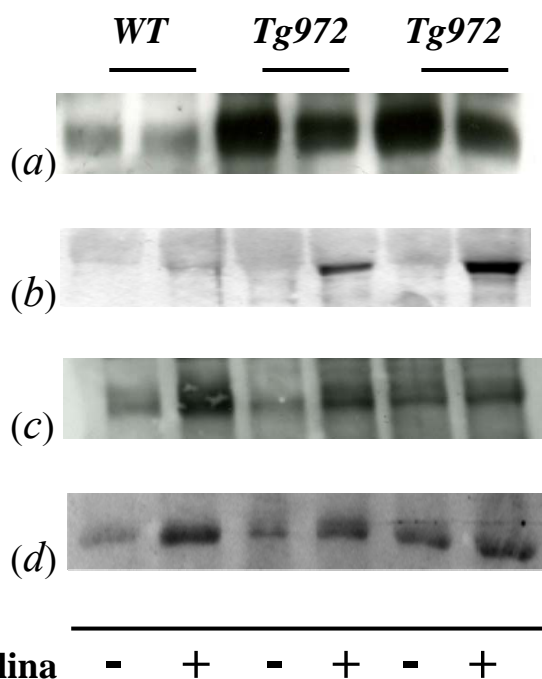


Fig. 35 La variante G972R altera la trasduzione del segnale insulinico nelle sue fasi iniziali. Dopo 6 ore di digiuno, topi maschi WT (lane 1 e 2) e Tg972 (lanes 3-6) di età compresa tra i 3 ed i 4 mesi, sono stati iniettati con 5U di insulina ed i tessuti raccolti come indicato nei Metodi. Per l'analisi della trasduzione del segnale insulinico nelle sue fasi precoci, i lisati proteici sono stati immunoprecipitati con anticorpo anti-IRS-

1 e poi analizzati con anticorpo anti-IRS-1(a), anti pY totale(b), anti IRS-1 pY941 (c) e anti-IRS-1 pY989 (d). le immagini sono rappresentative di 5 esperimenti.

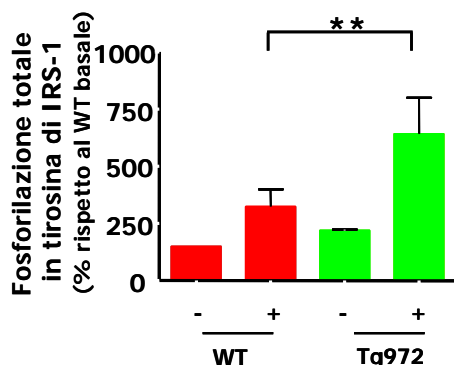


Fig 36 Valutazione densitometrica della fosforilazione totale in tirosina di IRS-1. I valori ottenuti nei transgenici sono stati normalizzati per quello relativo ad IRS-1 sovraespresso e quindi per il valore relativo al WT basale; i valori sono stati riportati in percentuale rispetto al valore del WT basale, e sono espressi come media \pm SD. Per il WT basale è stato scelto un valore rappresentativo di 100 unità arbitrarie. ** $p < 0.01$ per i Tg972 rispetto ai WT; analisi statistica effettuata con t-test di Student ($n = 4$ topi per genotipo). le immagini sono rappresentative di 5 esperimenti.

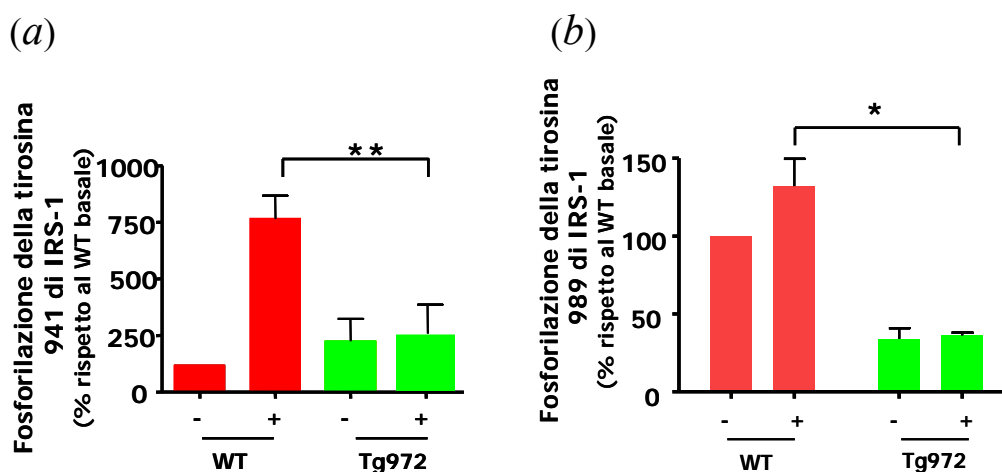


Fig 37 Valutazione densitometrica della fosforilazione di IRS-1 a livello dei residui di tirosina 941 e 989. I valori di fosforilazione di IRS-1 a livello della tirosina 941 (a) e 989 (b), relativi ai transgenici, sono stati normalizzati per quello relativo ad IRS-1 sovraespresso e quindi per il valore relativo al WT basale; i valori sono stati riportati in percentuale rispetto al WT basale e sono espressi come media \pm SD. Per il WT basale è stato scelto un valore rappresentativo di 100 unità arbitrarie. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ per i Tg972 rispetto ai WT; analisi statistica effettuata con t-test di Student ($n = 4$ topi per genotipo). Le immagini sono rappresentative di 5 esperimenti

6.4.2 Valutazione in vivo dell'associazione di p85 con IRS-1.

L' immunoprecipitazione con anticorpo anti-IRS-1, seguita da immunoblot con anticorpo anti-p85 su lisati di fegato, ottenuti dopo stimolo con insulina

da topi di entrambi i genotipi, ci ha permesso di confermare, per la prima volta *in vivo*, una forte riduzione dell'associazione di p85 con IRS-1 nei topi transgenici ($p < 0.0001$ per i topi Tg972 rispetto ai WT, $n=4$ per genotipo). Nella fig. 38, pannello *a*, è mostrata la sovraespressione di IRS-1 nei topi utilizzati per l'esperimento, dopo immunoprecipitazione ed immunoblot con anticorpo anti-IRS-1; nel pannello *b* è invece mostrato il risultato della coprecipitazione di IRS-1 e p85; le immagini sono rappresentative di 5 esperimenti, effettuati su topi di età compresa tra i 3 ed i 4 mesi. Nel pannello *c* sono invece mostrati i risultati dell'analisi densitometrica, espressi come medie \pm SD. I valori ottenuti sono stati normalizzati in modo analogo a quelli relativi a IRS-1-pY totale.

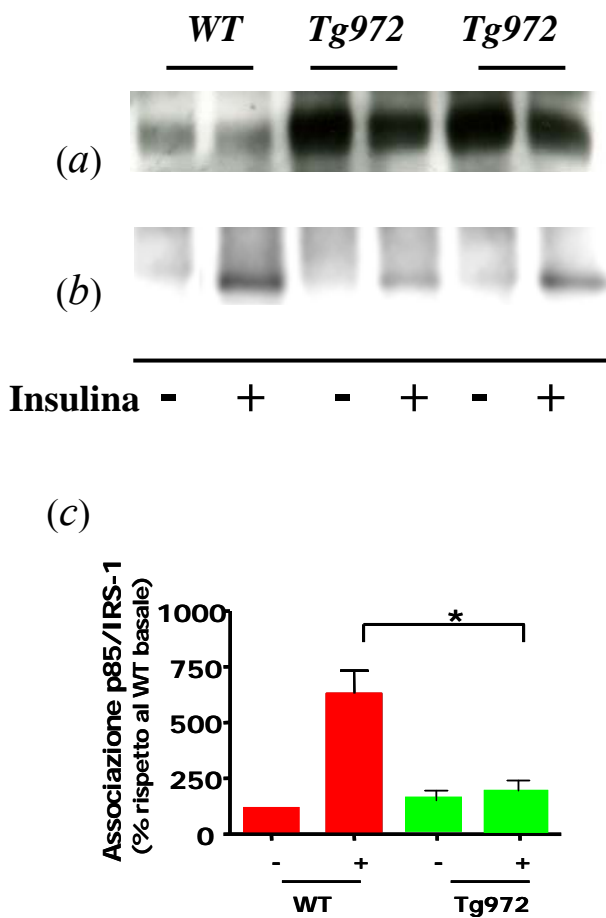


Fig. 38 Riduzione dell'associazione di p85 con IRS-1 in presenza del polimorfismo G972R dopo stimolo con insulina. Immunoprecipitazione ed (a) immunoblot con anticorpo anti-IRS1 o (b) con anticorpo anti-p85 dopo stimolo con insulina; (c) valutazione densitometrica dell'associazione tra p85 ed IRS-1.

* $p < 0.05$ per i topi Tg972 rispetto ai WT (n=4 per genotipo). Per il WT basale è stato scelto un valore rappresentativo di 100 unità arbitrarie. Analisi statistica effettuata con t-test di Student.

6.4.3 Valutazione dell'eventuale sovraespressione compensatoria di IRS-2 nei Tg972.

Nei topi transgenici non è risultata alcuna sovraespressione compensatoria di IRS-2 e neanche un aumento della sua fosforilazione totale in tirosina. Ciò è stato verificato, dopo stimolo *in vivo* con insulina, tramite immunoprecipitazione con anticorpo anti-IRS2 sui lisati di fegato, appartenenti a topi di entrambi i genotipi, cui è seguito l'immunoblot con anticorpo anti-IRS-2 (fig.39, pannello *a*) o con anticorpo anti-pY totale (fig. 39, pannello *b*). Nel pannello *c* della fig. 39 è mostrato il risultato dell'analisi densitometrica; le immagini della fig. 39 sono rappresentative di 3 esperimenti e sono state ottenute da 3 topi per genotipo, di età compresa tra i 3 ed i 4 mesi.

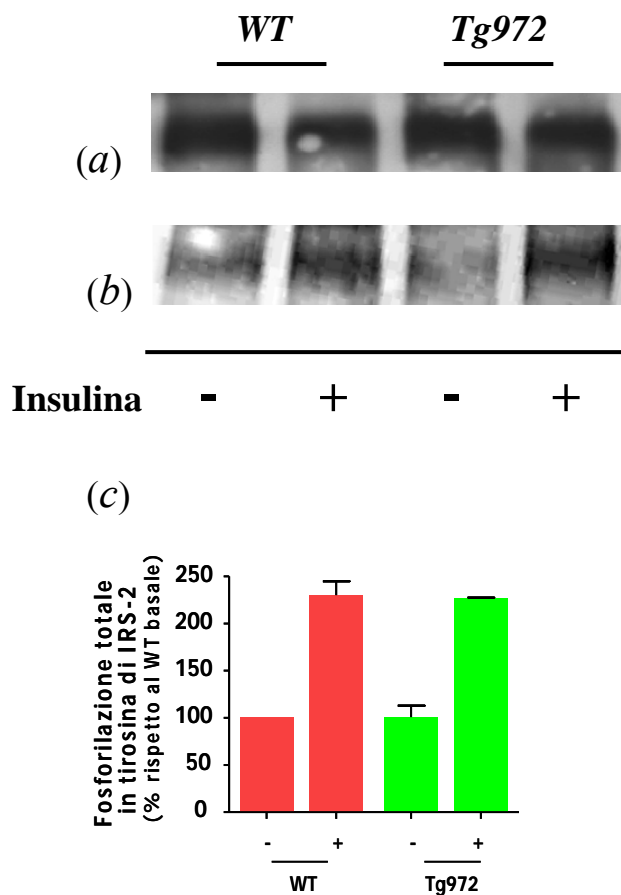
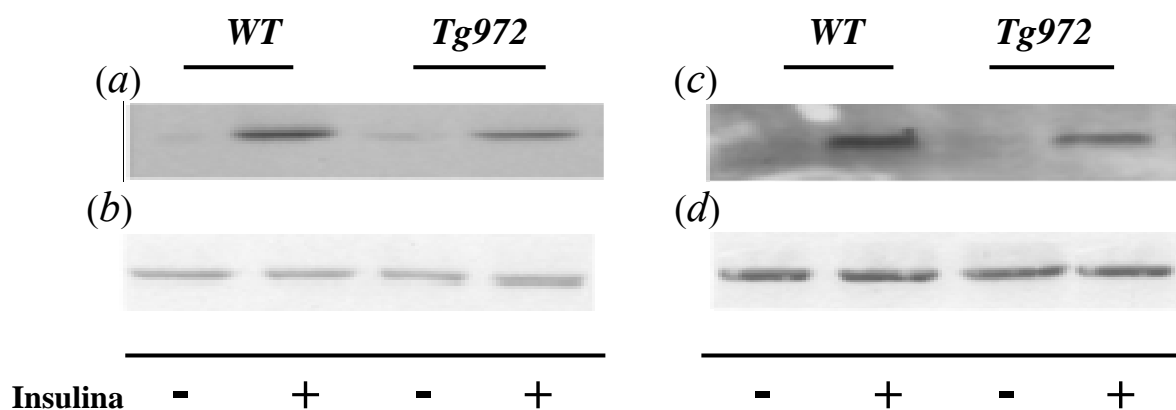


Fig. 39 Assenza di sovraespressione compensatoria di IRS-2. Immunoprecipitazione con anticorpo anti-IRS-2 ed immunoblot (a) con anticorpo anti-IRS-2 o (b) con anticorpo anti pY dopo stimolo con insulina. (c) valutazione densitometrica dell'espressione di IRS-2. Risultati espressi come media \pm SD. Per il WT basale è stato scelto un valore rappresentativo di 100 unità arbitrarie. Le immagini sono rappresentative di 3 esperimenti effettuati su 3 topi per genotipo.

6.4.4 Valutazione della fosforilazione *in vivo* di Akt nei tessuti bersaglio dell'insulina.

Muscolo e tessuto adiposo.

La fosforilazione di Akt a livello della serina 473, dopo stimolo *in vivo* con insulina, è risultata significativamente ridotta nel muscolo ($p < 0.01$, $n = 4-8$ per genotipo; fig. 40, pannello *a*) e nel tessuto adiposo ($p < 0.05$, $n = 4-8$ per genotipo; fig. 40, pannello *c*) dei topi Tg972 rispetto ai WT. I lisati utilizzati per questi esperimenti sono stati valutati in immunoblot anche con anticorpo anti-Akt totale, per la normalizzazione (fig. 40, pannello *b* per il muscolo, fig. 40 pannello *d* per il tessuto adiposo). Nei pannelli *e* (muscolo) ed *f* (tessuto adiposo) della fig. 40 sono mostrati i risultati delle analisi densitometriche, espressi come medie \pm SD. Le immagini sono rappresentative di 5 esperimenti, effettuati su topi di età compresa tra i 3 ed i 4 mesi.



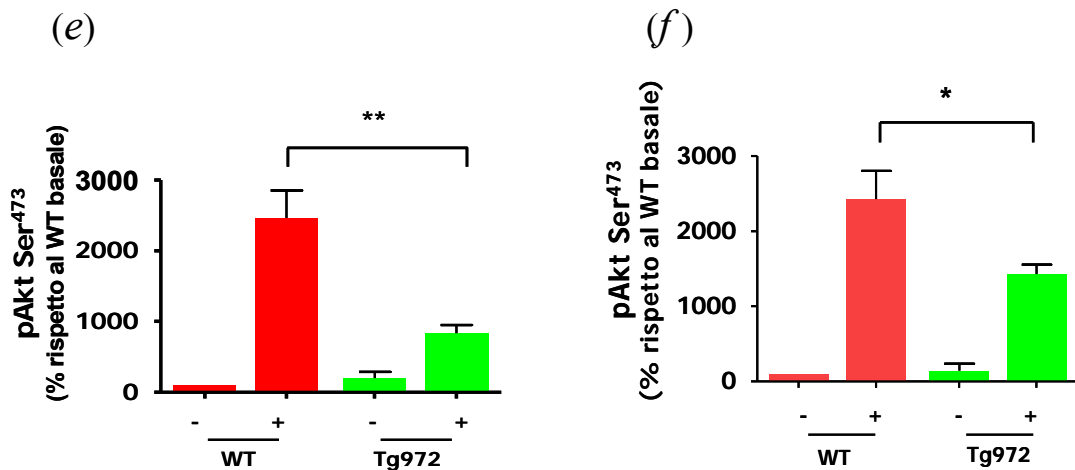


Fig.40 Riduzione della fosforilazione di Akt nel muscolo e nel tessuto adiposo dei topi Tg972 dopo stimolo con insulina. Fosforilazione di Akt a livello della serina 473 in topi WT e Tg972 dopo stimolo con insulina (pannello *a*, muscolo; pannello *c*, tessuto adiposo); blot con anticorpo anti-Akt totale per la normalizzazione (pannello *b*, muscolo; pannello *d*, tessuto adiposo). Valutazione densitometrica della fosforilazione di Akt (pannello *e*, muscolo; pannello *f*, tessuto adiposo). I risultati sono espressi come medie \pm SD. Per il WT basale è stato scelto un valore rappresentativo di 100 unità arbitrarie. Le immagini sono rappresentative di 5 esperimenti. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ per i topi Tg972 rispetto ai WT. Analisi statistica effettuata con t-test di Student..

Fegato.

Anche nel fegato la fosforilazione di Akt, a livello della serina 473, è risultata ridotta nei topi Tg972 rispetto ai WT, dopo stimolo con insulina ($p < 0.01$, $n = 4-8$ per genotipo; fig. 41, pannello *a*). I lisati sono stati analizzati con anticorpo anti-Akt totale per la normalizzazione (fig. 41, pannello *b*). Nel pannello *c* della fig. 41 sono mostrati i risultati dell'analisi densitometrica, espressi come medie \pm SD. Le immagini sono rappresentative di 5 esperimenti.

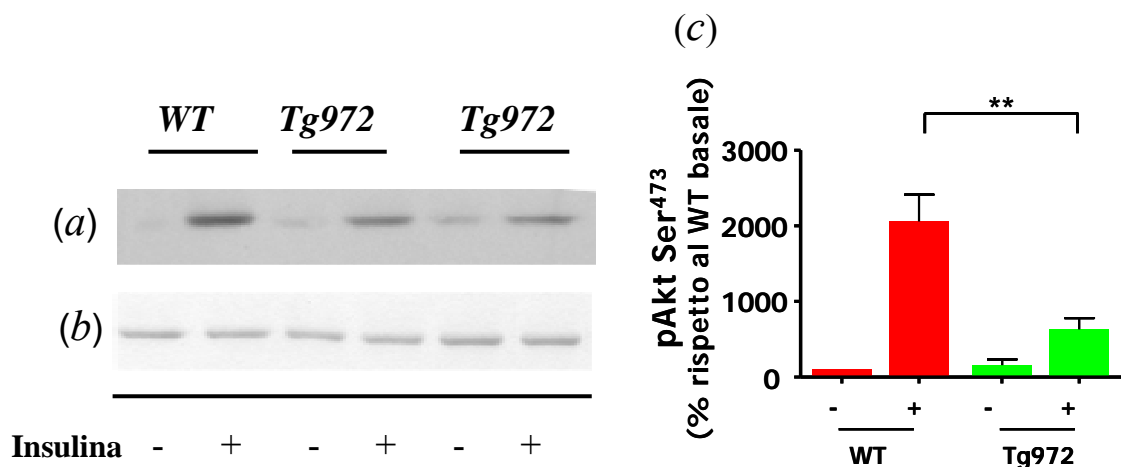


Fig.41 Riduzione della fosforilazione di Akt nel fegato dei topi Tg972 dopo stimolo con insulina. Fosforilazione di Akt a livello della serina 473 in topi WT e Tg972 dopo stimolo con insulina (pannello *a*); blot con anticorpo anti-Akt totale per la normalizzazione (pannello *b*). Valutazione densitometrica della fosforilazione di Akt (pannello *c*). I risultati sono espressi come medie \pm SD. Per il WT basale è stato scelto un valore rappresentativo di 100 unità arbitrarie. Le immagini sono rappresentative di 5 esperimenti. ** $p < 0.01$ per i topi Tg972 rispetto ai WT. Analisi statistica effettuata con t-test di Student.

6.4.5 Valutazione in vivo della ridotta attivazione di GSK-3 a livello epatico.

I lisati di fegato, utilizzati per la valutazione della fosforilazione di Akt, sono stati valutati in immunoblot con anticorpo anti-pGSK3Ser9 per valutare il livello di attivazione di questo enzima dopo stimolo con insulina: la sua fosforilazione è risultata sensibilmente ridotta nei topi transgenici ($p < 0.01$ per i topi Tg972 rispetto ai WT, $n = 4-8$ per genotipo; fig. 42, pannello *a*), per un valore pari al 56%. I lisati sono stati analizzati anche con anticorpo anti GSK-3 totale (fig. 42 pannello *b*) per la normalizzazione. Nel pannello *c* della fig. 42 sono mostrati i risultati dell'analisi densitometrica, espressi come medie \pm SD. Le immagini sono rappresentative di 5 esperimenti.

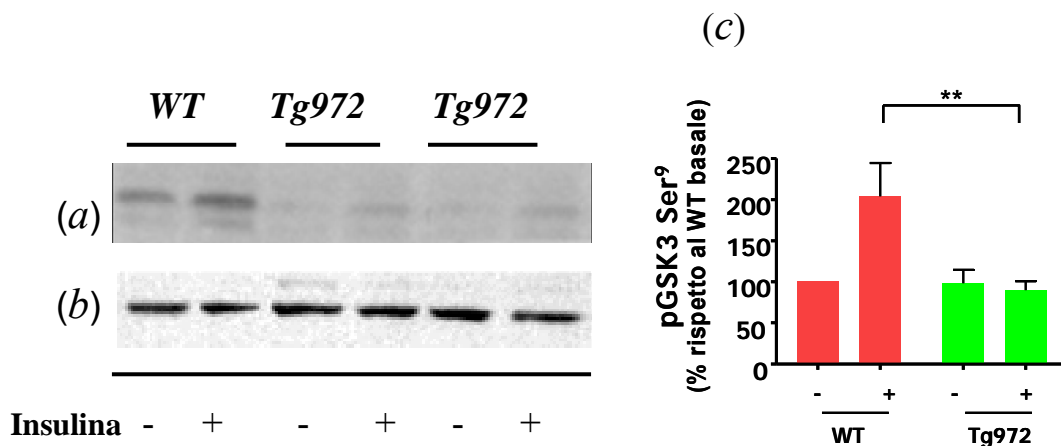


Fig. 42 Riduzione della fosforilazione di GSK-3 nel fegato dei topi Tg972 dopo stimolo con insulina. Fosforilazione di GSK-3 a livello della Serina 9 in topi WT e Tg972 dopo stimolo con insulina (pannello *a*); blot con anticorpo anti-GSK-3 totale per la normalizzazione (pannello *b*). Valutazione densitometrica della fosforilazione di GSK-3 (pannello *c*). I risultati sono espressi come medie \pm SD. Per il WT basale è stato scelto un valore rappresentativo di 100 unità arbitrarie. Le immagini sono rappresentative di 5 esperimenti. ** $p < 0.01$ per i topi Tg972 rispetto ai WT. Analisi statistica effettuata con t-test di Student.

6.5 Interazione tra il polimorfismo G972R e l'obesità nella patogenesi dell'insulino-resistenza.

6.5.1 Caratterizzazione metabolica dei topi Tg972 HFD a 3 e 6 mesi di età.

Durante la dieta grassa, abbiamo riscontrato un significativo aumento di peso nei topi Tg972 rispetto ai WT ($p < 0.0001$, $n = 15$ per genotipo; fig.43, pannello *a*) ed anche il peso del tessuto adiposo epididimale è risultato, al termine della dieta, sensibilmente maggiore nei transgenici rispetto ai WT ($p < 0.05$, $n = 15$ per genotipo; fig.43, pannello *b*). Con la dieta grassa, inoltre, l'insorgenza dell'insulino-resistenza e dell'intolleranza al glucosio nei Tg972 è risultata più precoce, come si evince dai test da carico IPGTT ($p < 0.0001$, $n = 8-12$ per genotipo; fig.43, pannello *c*) ed ITT ($p < 0.0001$, $n = 8-10$ per genotipo; fig.43 pannello *d*) effettuati su topi transgenici e WT dopo 3 mesi di dieta.

	Topi WT		Topi Tg972	
	3 mesi	6 mesi	3 mesi	6 mesi
Glicemia non a digiuno (mg/dl)	213±28 (n=19)	320±45 (n=12)	232±27 [§] (n=17)	370±65* (n=10)
Insulinemia non a digiuno (ng/ml)	2.41±0.51 (n=10)	3.1±0.45 (n=7)	3.41±1.07 [§] (n=9)	2.6±0.4* (n=7)
Glicemia a digiuno (mg/dl)	114±31 (n=21)	120±22 (n=11)	137±39 [§] (n=27)	160±17 [°] (n=8)
Insulinemia a digiuno (ng/ml)	1.96±0.34 (n=10)	2.2±0.4 (n=6)	2.1±0.34 (n=12)	1.4±0.3 [^] (n=7)

Tabella 4. Parametri metabolici dei topi WT e Tg972 a 3 e 6 mesi di età, sottoposti a dieta grassa. I campioni sono stati ottenuti da topi maschi, nutriti *ad libitum* o dopo un digiuno O/N. I dati sono espressi come media ± SD [§] $P < 0.05$ per i topi Tg972 HFD rispetto ai WT HFD a 3 mesi di età, * $P < 0.05$, [^] $P < 0.01$, [°] $p < 0.0001$ per i topi Tg972 HFD rispetto ai WT HFD a sei mesi di età. Analisi statistica effettuata con t-test di Student.

I topi Tg972 dopo 3 mesi di dieta grassa sono risultati iperglicemici sia se nutriti *ad libitum* ($p < 0.05$, $n = 17-19$ per genotipo, tabella 4) che a digiuno ($p < 0.05$, $n = 21-27$ per genotipo, tabella 4) ed iperinsulinemici in condizioni di

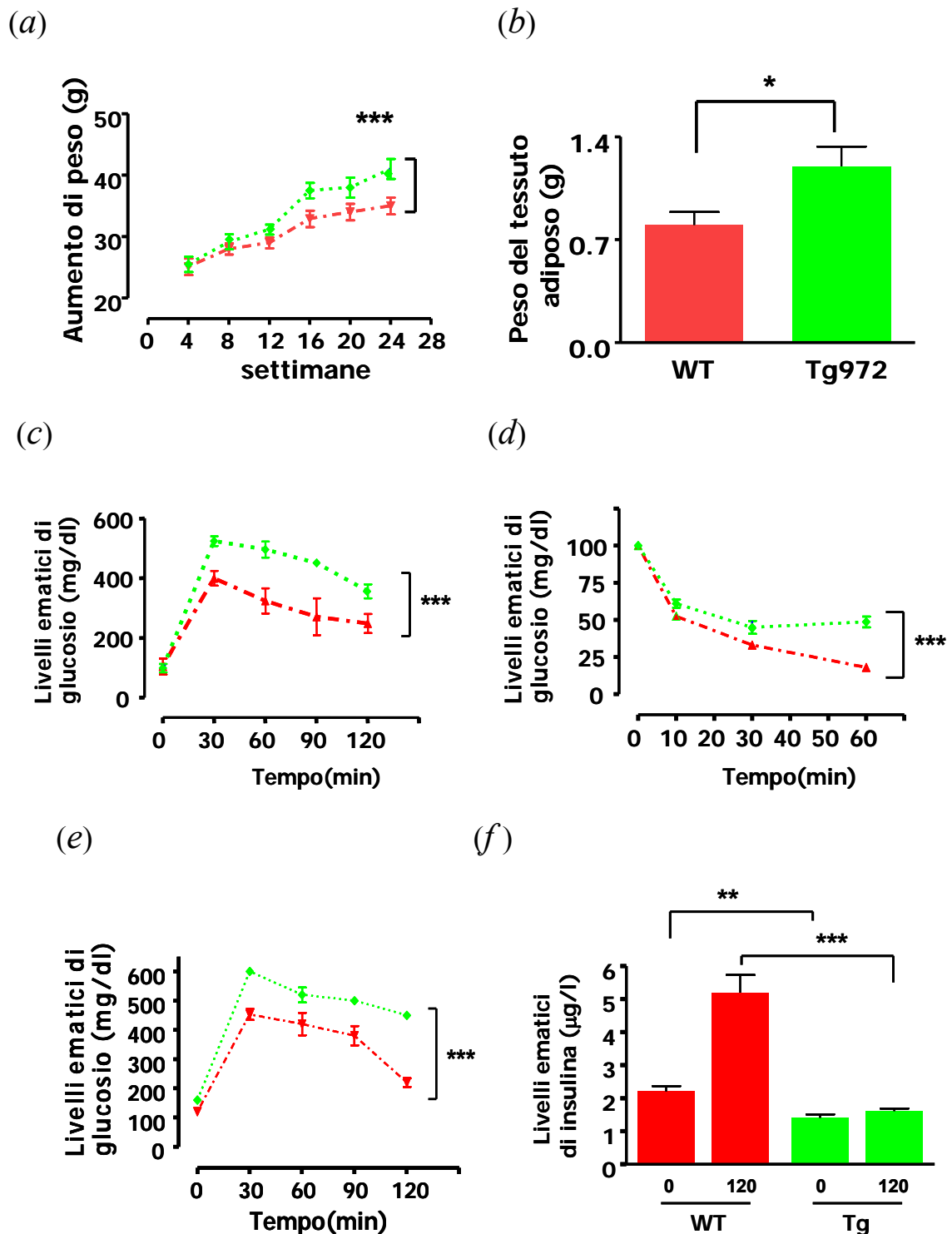


Fig.43 Parametri metabolici dei topi Tg972 e WT dopo 3 mesi di dieta grassa. (a) valutazione settimanale del peso corporeo dei topi Tg972 (●) e WT (●) durante la dieta grassa. *** $p < 0.0001$, $n = 15$ per genotipo. Dati espressi come medie \pm SD. Analisi effettuata con t-test di Student. (b) Valutazione del peso del tessuto adiposo dei topi Tg972 e WT al termine della dieta grassa. * $p < 0.05$, $n = 15$ per genotipo. I dati sono espressi come medie \pm SD. Analisi effettuata con t-test di Student. IPGTT (c) e ITT (d) sui topi Tg972 (●) e WT (●) dopo 3 mesi di dieta grassa; IPGTT sui topi Tg972 (●) e WT (●) dopo 6 mesi di dieta grassa. *** $p < 0.0001$, $n = 8-12$ per genotipo. I dati sono espressi come medie \pm SD. Analisi effettuata con test 2-way ANOVA. (f) Concentrazioni di insulina durante un IPGTT in topi Tg972 e WT dopo 6 mesi di dieta.

p<0.05, *p<0.0001 per i Tg972 rispetto ai WT (n=5-8 per genotipo). Analisi effettuata con t-test di Student. I dati sono espressi come medie \pm SD.

libero accesso al cibo (p<0.05, n=10-12 per genotipo, tabella 4). Ciò ci ha fatto pensare che la causa principale del fenotipo osservato nei transgenici dopo 3 mesi di dieta grassa fosse essenzialmente l'insulino-resistenza periferica; quando però la dieta si è protratta fino a sei mesi, i livelli di insulina sono risultati fortemente ridotti, sia a digiuno (p<0.01 per i Tg972 rispetto ai WT, n=6-7, tabella 4), che non a digiuno (p<0.05 per i Tg972 rispetto ai WT, n=7 per genotipo, tabella 4) con un peggioramento dell'iperglicemia in condizioni di libero accesso al cibo (p<0.05 per i Tg972 rispetto ai WT, n=10-12 per genotipo, tabella 4) e a digiuno (p<0.0001 per i Tg972 rispetto ai WT, n=8-11, tabella 4). Ciò potrebbe indicare la presenza, in questa fase, di un difetto di secrezione insulinica e questa ipotesi è rafforzata dal fatto che, dopo un IPGTT, i livelli di insulina nei topi Tg972 non sono significativamente diversi rispetto all'inizio del test e soprattutto sono molto più bassi rispetto a quelli dei WT (p<0.0001, n= 5-8 per genotipo; fig.43, pannello *f*); inoltre, i transgenici risultano gravemente intolleranti al glucosio rispetto ai WT (p<0.0001, n= 2-5 per genotipo; fig. 43, pannello *e*).

6.5.2 Livelli di espressione dei geni legati all'obesità nei due genotipi.

L'accrescimento della massa grassa è accompagnato, nei topi Tg972, da un sensibile aumento dei livelli di espressione di geni propri dell'obesità, come la leptina, la resistina e PPAR γ (p<0.05, n= 6-8 per genotipo; fig.44, pannelli *a*, *b*, *c*); l'unica adipochina, i cui livelli sono risultati più bassi nei transgenici è l'adiponectina, nota per avere un'azione insulino-sensibilizzante (p<0.05, n=6-8 per genotipo; figura 44, pannello *d*). L'espressione di questi geni è stata valutata tramite Real-time PCR su mRNA di tessuti adiposi di topi appartenenti ad entrambi i genotipi, dopo 3 mesi di dieta. I risultati sono

espressi come medie \pm SD, in unità arbitrarie (a.u.) di real-time PCR e sono rappresentativi di due diversi esperimenti, effettuati in triplicato.

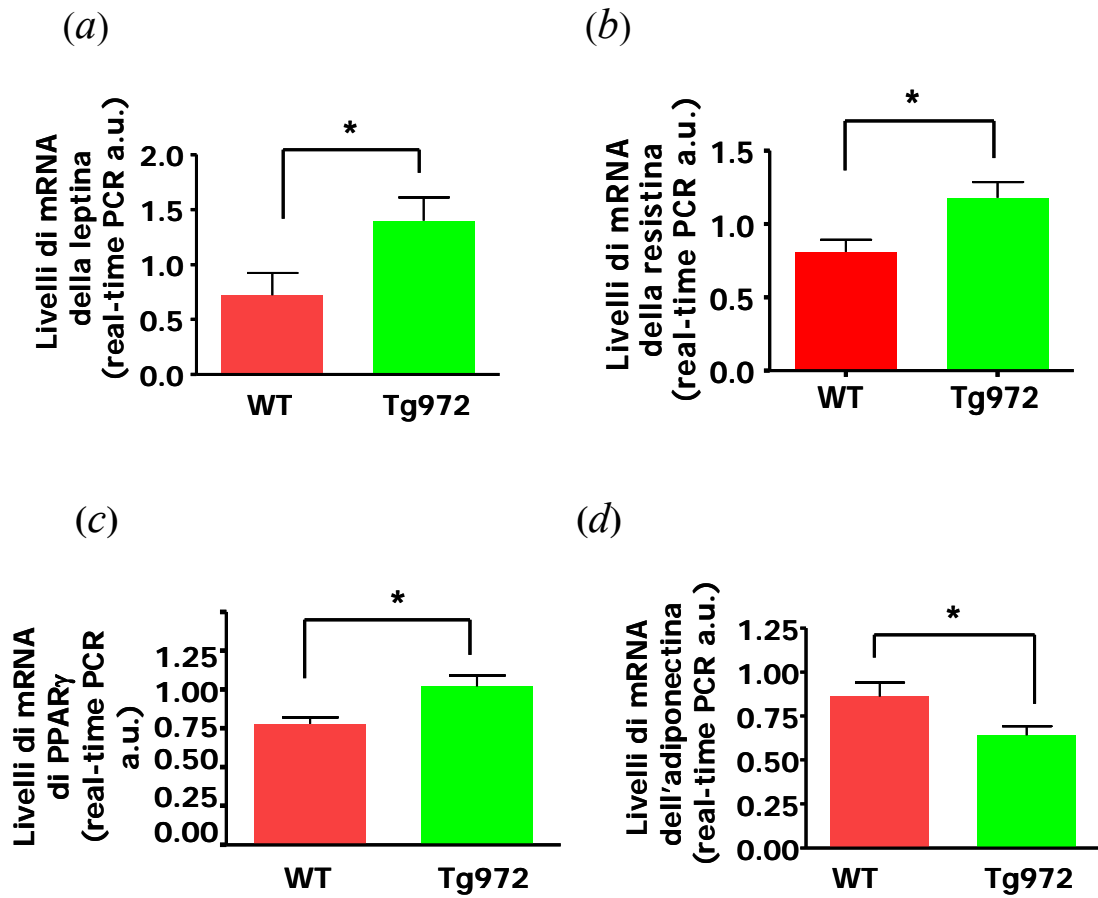


Fig.44 Espressione dei geni legati all'obesità nel tessuto adiposo di topi Tg972 e WT, dopo 3 mesi di dieta. I livelli della leptina (a), della resistina (b), di PPAR- γ (c) e dell'adiponectina (d) sono stati valutati tramite Real-time PCR su mRNA di tessuto adiposo di topi WT e Tg972. * $p < 0.05$, $n = 6-8$ per genotipo. I dati sono espressi come medie \pm SD.

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

La patogenesi del Diabete di tipo 2 è caratterizzata dalla combinazione tra insulino-resistenza periferica e ridotta capacità di secernere insulina da parte delle beta-cellule; nella maggioranza della popolazione prediabetica, la prima anomalia manifesta è l'insulino-resistenza, che precede l'intolleranza al glucosio [10]. Inizialmente, il pancreas cerca di compensare all'insulino-resistenza aumentando la produzione e la secrezione di insulina; allorchè tale compensazione non sia più possibile, si ha l'insorgenza del diabete vero e proprio. L'associazione tra predisposizione genetica e fattori ambientali quali la dieta, l'attività fisica e l'età, determina l'insorgenza della malattia. Data la natura poligenica del Diabete di tipo 2 e la sua forte componente ereditaria, non è possibile parlare di specifici geni "determinanti" la patogenesi della malattia, che cioè abbiano con essa una relazione diretta di causa-effetto; piuttosto, è proprio la sinergia d'azione tra i fattori ambientali e diversi possibili difetti genetici a determinare l'insorgenza del Diabete di tipo 2. In questo studio, abbiamo voluto valutare *in vivo* l'incidenza sulla patogenesi di questa malattia da parte del polimorfismo che, fra quelli a carico di IRS-1, risulta maggiormente diffuso nella popolazione e che comporta una sostituzione Gly→Arg a livello del codone 972: per farlo abbiamo generato un modello murino sovraesprimente tale variante, studiandone il fenotipo anche in relazione all'età o ad un fattore ambientale come l'obesità. Precedentemente, la sovraespressione del polimorfismo G972R in diversi modelli cellulari o l'utilizzo di cellule provenienti da donatori esprimenti il polimorfismo, aveva permesso di osservare *in vitro* la riduzione dell'azione dell'insulina in modo specifico per il tipo cellulare e, a livello molecolare, una più debole associazione tra IRS-1 e la PI3-K rispetto alle cellule di controllo [22, 67, 68, 69]. Una prima analisi, volta ad analizzare i parametri metabolici del modello murino da noi generato, non evidenzia sensibili

differenze nell'omeostasi del glucosio tra i topi Tg972 e quelli di controllo, all'età di tre mesi; i tests da carico IPGTT ed ITT mettono però in luce la tendenza dei transgenici verso una condizione di insensibilità all'insulina e di intolleranza al glucosio, fenotipo che diventa manifesto a sei mesi di età, quando i Tg972 risultano iperglicemici a digiuno e non, ed ipoinsulinemici in condizioni di libero accesso al cibo. I tests da carico IPGTT ed ITT mostrano come, a sei mesi d'età, i topi transgenici siano diventati, rispetto a quelli di controllo, gravemente intolleranti al glucosio ed insensibili all'insulina. Anche il rapporto glucosio/insulina, valutato in topi a digiuno, appartenenti ad entrambi i genotipi, è più elevato nei transgenici, a confermare la minore disponibilità di insulina. Il valore di questo rapporto è un indice della capacità di compensare ad una determinata concentrazione di glucosio con un'adeguata secrezione di insulina: nel caso dei Tg972, il valore più elevato di questo rapporto rispetto ai controlli, evidenzia la riduzione di tale capacità. Ci siamo chiesti se il fenotipo di insulino-resistenza ed intolleranza al glucosio, da noi riscontrato nei topi transgenici a sei mesi di età, fosse dovuto prevalentemente ad un difetto nella secrezione insulinica, o ad insulino-resistenza periferica. Per verificarlo, abbiamo effettuato un'analisi morfometrica, valutato l'area delle beta-cellule ed il contenuto di insulina dei pancreas di topi appartenenti ad entrambi i genotipi e di età compresa tra i quattro ed i sei mesi, senza riscontrare differenze significative; la secrezione insulinica, valutata su isole pancreatiche, ottenute da topi di entrambi i genotipi e di età compresa tra i quattro ed i sei mesi, risulta invece gravemente ridotta nei topi transgenici, ad ogni concentrazione di glucosio utilizzata. Parallelamente, il trasporto del glucosio nel muscolo e nel tessuto adiposo, valutato dopo un IPGTT, su topi di entrambi i genotipi a sei mesi d'età, risulta ridotto nei topi Tg972 rispetto ai controlli, contestualmente ad una minore incorporazione del glucosio in glicogeno epatico, anch'essa valutata dopo

un IPGTT: è quindi la compresenza dell'insulino-resistenza periferica e della ridotta secrezione insulinica a determinare il fenotipo da noi riscontrato nei topi transgenici a sei mesi di età. E' chiaro che l'età aggrava, nei transgenici, gli scompensi nel metabolismo del glucosio, come evidenziano anche i tests da carico effettuati sui topi a tre e sei mesi di età. Alla luce di questi risultati, abbiamo deciso di analizzare i meccanismi molecolari che sono alla base del fenotipo da noi riscontrato nei transgenici e, a questo scopo, abbiamo raccolto i tessuti di topi appartenenti ad entrambi i genotipi all'età di tre-quattro mesi, dopo averli anestetizzati e stimolati con insulina, iniettata nella vena porta epatica; il meccanismo molecolare alla base dell'azione inibitoria della variante G972R-IRS-1 sulla trasduzione del segnale dell'insulina, è stato chiarito di recente mediante una serie di esperimenti effettuati *in vitro* da Ron Kahn ed i suoi collaboratori, che hanno dimostrato come la presenza del polimorfismo G972R determini la riduzione della fosforilazione di IRS-1 a livello dei due residui di tirosina 941 e 989, indispensabili per l'associazione di IRS-1 con la PI3-K [11]. In questo studio, abbiamo potuto confermare, per la prima volta *in vivo*, come la variante G972R di IRS-1 determini non soltanto la riduzione della fosforilazione di IRS-1 a livello di questi importanti residui di tirosina e la conseguente riduzione della sua associazione con la PI3-K, ma anche una minore fosforilazione di Akt nel fegato (oltre che nel muscolo e nel tessuto adiposo) e quindi una più debole azione dell'insulina su un processo come la sintesi del glicogeno, la cui regolazione si ha molto più a valle di IRS-1. Inoltre, per valutare *in vivo* se l'interazione del polimorfismo G972R con un fattore ambientale come l'obesità potesse in qualche modo incidere sulla patogenesi del diabete di tipo 2, abbiamo sottoposto un gruppo di topi, appartenenti ad entrambi i genotipi, ad una dieta ad alto contenuto di grassi a partire dallo svezzamento: tale interazione accelera in effetti l'insorgenza dell'insulino-resistenza e

dell'intolleranza al glucosio [70], come si evince dai tests da carico effettuati dopo tre mesi di dieta grassa; inoltre i topi transgenici risultano iperglicemici a digiuno e non, ed iperinsulinemici in condizioni di libero accesso al cibo. Quando la dieta grassa si protrae fino a sei mesi di età, oltre all'iperglicemia insorge un evidente difetto nella secrezione insulinica: i topi transgenici diventano ipoinsulinemici a digiuno e non e l'IPGTT evidenzia una grave intolleranza al glucosio; inoltre, ad ulteriore conferma della ridotta secrezione insulinica, le concentrazioni dell'ormone valutate durante l'IPGTT non variano significativamente durante il test e soprattutto sono molto più basse di quelle dei WT. L'osservazione che i portatori obesi del polimorfismo G972R sono caratterizzati da ridotta sensibilità all'insulina, associata ad un insieme di alterazioni metaboliche, come una più alta glicemia a digiuno, ha indotto a pensare che questa variante contribuisca a peggiorare il fenotipo di insulino-resistenza associato all'obesità [63, 64]. I meccanismi molecolari alla base di questa interazione non sono ancora del tutto chiari, quindi il modello Tg972 è senz'altro utile per approfondire quest'aspetto: i topi transgenici acquistano più peso dei controlli durante la dieta grassa ed anche la massa del tessuto adiposo epididimale, al termine della dieta stessa, risulta maggiore nei Tg972 rispetto ai controlli; inoltre, proprio a livello del tessuto adiposo, riscontriamo una maggiore quantità dell'mRNA di geni propri dell'obesità, come la leptina e la resistina ed è interessante notare che i risultati di studi con microarrays, effettuati sui tessuti adiposi di soggetti obesi portatori del polimorfismo, evidenziano, in tali soggetti, una maggiore espressione dei geni della leptina e della resistina, rispetto ai soggetti di controllo dello stesso peso [71]. Ciò indica che il polimorfismo G972R potrebbe influenzare la sensibilità all'insulina anche agendo sulla regolazione genica, altro aspetto che può essere senz'altro utile ed interessante approfondire. Studi effettuati su soggetti diabetici evidenziano come il

polimorfismo G972R moduli l'azione dei farmaci specifici per la cura del Diabete di Tipo 2: ad esempio, la sulfonilurea, un farmaco in grado di aumentare la secrezione insulinica, è in genere utilizzata quando il Diabete di tipo 2 è ancora in uno stadio precoce; può capitare tuttavia che in alcuni pazienti esso non riesca a ridurre la glicemia, mentre in altri soggetti il trattamento con questo farmaco riesce per un breve periodo a controllare adeguatamente i livelli glicemici ma diventa inefficace in seguito. Quest'ultima eventualità, definita "fallimento secondario", risulta essere più frequente nei soggetti diabetici e portatori del polimorfismo G972R, rispetto ai soggetti diabetici che non lo esprimono [72]: quindi questa variante è in grado anche di influenzare la risposta alle terapie mediche da parte dei soggetti in cui è espressa. Inoltre, nei portatori del polimorfismo G972R è stata riscontrata anche una condizione di insulino-resistenza a livello cerebro-corticale [73]: alla luce delle ricerche effettuate nel campo della farmacogenetica, i topi Tg972 possono essere un ottimo modello per testare delle terapie individuali e mirate. In conclusione, dai risultati ottenuti nel nostro studio, risultano evidenti l'impatto negativo che il polimorfismo G972R ha sulla trasduzione *in vivo* del segnale insulinico ed il ruolo che tale variante ricopre nella patogenesi dell'insulino-resistenza; inoltre, la riduzione della secrezione insulinica da noi constatata nei topi transgenici conferma ulteriormente il ruolo giocato dal segnale insulinico stesso nell'induzione della secrezione dell'ormone da parte delle beta-cellule. E' evidente allora che un modello murino, sovraesprimente uno specifico difetto genico che riduca l'efficienza di tale segnale, sia un utile strumento per approfondire la comprensione dell'insorgenza dei difetti nella secrezione insulinica a livello molecolare e genetico e per poter sperimentare delle terapie specifiche. L'efficienza del metabolismo del glucosio nei topi transgenici si riduce ulteriormente se il polimorfismo è associato all'età o all'obesità: proprio per questo, la caratterizzazione del

modello murino che sovraesprime la variante G972R è senz'altro utile per comprendere meglio ed approfondire la dinamica delle interazioni tra fattori genetici ed ambientali, nella patogenesi del diabete di tipo 2.

8. BIBLIOGRAFIA.

- [1] Straub SG, Sharp GW: Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18(6):451-63, 2002
- [2] Pessin J, Saltiel AR: Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *JCI*, 106(2):165-169
- [3] Youngren JF: Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 64:873-891, 2007
- [4] Butler AA, LeRoith D: Minireview: tissue-specific *versus* generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 142(5):1685-1688, 2001
- [5] White MF: The IRS-signaling system: A network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 182:3-11, 1998
- [6] Wolf G, Trüb T, Ottinger E, Groninga L, Lynch A, White MF, Miyazaki M, Lee J, Shoelson SE: PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. *J Biol Chem* 270(46):27407-27410, 1995
- [7] Burks DJ, Wang J, Towery H, Ishibashi O, Lowe D, Riedel H, White MF: IRS Pleckstrin Homology domains bind to acidic motifs in proteins. *J Biol Chem* 237(47): 31061-31067, 1998
- [8] Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Tobe K, Ueki K, Yaki M, Akanuma Y, Stephens RM, Kaplan D, Yazaki Y, Kadowaki T: The role of the NPXY motif in the Insulin receptor in Tyrosine Phosphorylation of IRS-1 and Shc. *Endocrinology* 136(8): 3437-3443
- [9] Backer JM, WJason C, Zhang Y: *In vitro* binding and phosphorylation of insulin receptor substrate-1 by the insulin receptor. Role of the interactions mediated by the phosphotyrosine-binding domain and the pleckstrin homology domain. *Eur J Biochem* 245:91-96, 1997
- [10] Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R: Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 15, 2099-2111, 2001
- [11] McGettrick AJ, Feener EP, Kahn CR: Human Insulin Receptor Substrate-1(IRS-1) polymorphism G972R causes IRS-1 to associate with the Insulin Receptor and inhibit receptor autophosphorylation. *J Biol Chem* 280(8): 6441-6446, 2005
- [12] Saltiel AR, Kahn CR: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799-806, 2001
- [13] Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR: Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *JCI* 115(3):718-727, 2005
- [14] Giovannone B, Scadaferri ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A, Sbraccia P, Borboni P, Lauro R, Sesti G: Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signalling potential. *Diabetes Metab Res Rev* 16(6):434-41, 2000
- [15] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307(5712):1098-101, 2005
- [16] Lee J, Kim MS: The role of GSK-3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* 77, Suppl 1:S49-57, 2007
- [17] Watson RT, Pessin JE: Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp Cell Res* 271(1):75-83, 2001
- [18] Hou JC, Pessin JE: Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 19(4):466-73, 2007
- [19] Darvedet D, Sornet C, Vary T, Grizard J: Phosphatidylinositol 3-kinase and p70S6 kinase participate in the regulation of protein turnover in skeletal muscle by Insulin and Insulin-like growth Factor I. *Endocrinology* 137(10):4087-4094, 1996

- [20] Conejo R, Lorenzo M: Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts. *J Cell Physiol* 187(1):96-108, 2001
- [21] Navarro P, Valverde AM, Benito M, Lorenzo M: Insulin/IGF-1 Rescues Immortalized brown adipocytes from Apoptosis down-regulating Bcl-xS expression, in a PI 3-K and MAP kinase dependent manner. *Exp Cell Res* 243(2):213-221, 1998
- [22] Federici M, Hribal ML, Ranalli M, Marselli L, Porzio O, Lauro D, Borboni P, Lauro R, Marchetti P, Melino G, Sesti G: The common Arg⁹⁷² polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes apoptosis of human pancreatic islets. *Faseb J* 15 (1):22-24, 2001
- [23] Boden G, Schulman GI: Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32 (Suppl 3):14-23, 2002
- [24] Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG: Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med* 322:223-8, 1990
- [25] Cline GW, Petersen KF, Kissak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI: Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 341(4):240-6, 1999
- [26] Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin MF, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI: Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1 associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103(2):253-9, 1999
- [27] Arner P: Insulin resistance in Type 2 Diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab Res Rev* 18:S5-S9, 2002
- [28] Bergman RN, Finegood DT, Kahn SE: The evolution of β -cell dysfunction and insulin-resistance in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 32 (Suppl3):35-45, 2002
- [29] Robertson RP, Olson LK, Zhang HJ: Differentiating glucose toxicity from glucose desensitization: a new message from the insulin gene. *Diabetes* 43(9):1085-1089, 1994
- [30] Maedler K, Carr RD, Bosco D, Zuelig RA, Berney T, Donath MY: Sulfonylurea induced beta-cell apoptosis in cultured human islets. *J Clin Endocrinol Metab* 90(1):501-506, 2005
- [31] Maedler K: Beta-cells in Type 2 diabetes: a crucial contribution to pathogenesis. *Diabetes, obesity and metabolism* 10:408-420, 2008
- [32] Shimabukuro M, Zhou YT, Lee Y, Unger RH: Troglitazone lowers islets fat and restores beta-cell function of Zucker diabetic fatty rats. *J Biol Chem* 273(6):3547-50, 1998
- [33] Kasuga M: Insulin resistance and pancreatic beta-failure. *J Clin Invest* 116(7):1756-60, 2006
- [34] La Cava A, Matarese G: The weight of leptin in immunity. *Nature Rev Immunol* 4(5):371-379, 2004
- [35] Tilg H, Moschen AR: Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature* 6:772-783, 2006
- [36] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100(25):2473-2476, 1999
- [37] Maeda N, Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/CRP30. *Nature med* 8(7):731-737, 2002
- [38] Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H: Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 323(2):630-635, 2004
- [39] Berg AH, Combs TP, Scherer PE: ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13:84-89, 2002
- [40] Fantuzzi G: Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115(5):911-919, 2005

- [41] Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida H, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y: PPAR- γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50(9):2094-2099, 2001
- [42] Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura Y: Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52(7): 165-1663, 2003
- [43] Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, Pang Z, Chen AS, Ruderman NB, Chen H, Rossetti L, Scherer PE: Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome-proliferator-activated receptor- γ agonists. *J Biol Chem* 281(5):2654-2660, 2006
- [44] Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A: Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 174(9):5789-5795, 2005
- [45] Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM: Reduced Tyrosine Kinase activity in Obesity-Diabetes. Central role of Tumor necrosis Factor- α . *J Clin Invest* 94:1543-1549, 1994
- [46] Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS: Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389:610-614, 1997
- [47] Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB: Inflammation and Insulin Resistance. *J Clin Invest* 116(7):1793-1801, 2006
- [48] Plum L, Wunderlich FT, Baudler S, Krone W, Bruning JC: Transgenic and Knockout Mice in Diabetes Research: Novel Insights into Pathophysiology, Limitations and Perspectives. *Physiology* 20:152-161, 2005
- [49] Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D: Mouse models of Insulin Resistance *Physiology Reviews* 84(2),623-647,2004
- [50] Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees C, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B: Of mice and models: improved animal models for biochemical research. *Physiol genomics* 11(3):115-32, 2002
- [51] Bonifer C, Huber MC, Jagle U, Faust N, Sippel AE: Prerequisites for tissue-specific and position independent expression of a gene locus in transgenic mice. *J Mol Med* 74(11):663-71, 1996
- [52] Jaisser F: Inducible Gene Expression and Gene Modification in Transgenic Mice. *J Am Soc Nephrol* 11:S95-S100, 2000
- [53] Kulkarni RN Receptors for insulin and insulin-like-growth-factor-1 and insulin receptor substrate-1 mediate pathways that regulate islet functions. *Biochemical Society Transactions* 30, part 2, 2002
- [54] Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, Johnson RS, Kahn CR: Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene *Nature*,372:186-190,1994
- [55] Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa F, Aizawa S, Akanuma Y, Sonenberg N, Yazaki Y, Kadowaki T: Insulin Signaling and Insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, Insulin Receptor Substrate 1-Deficient Mice *Mol Cell Biol*, 16(6):3074-3084, 1996
- [56] Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, Bruning JC, Flier SF, Hanahan D, Kahn CR: Altered function of insulin receptor substrate-1 deficient mouse islets and cultured β -cell lines. *J Clin Invest* 104(12):R69-R75, 1999
- [57] Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, Accili D: Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1 and IRS-2. *J Clin Invest* 105(2):199-205, 2000
- [58] Burks DJ, White MF: IRS proteins and β -Cell function. *Diabetes* 50 (suppl.1): S140-S145, 2001
- [59] Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF: IRS-2 coordinates IGF-1 receptor-mediated β -cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 23(1):32-40,1999
- [60] Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI: Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism *in vivo*. *J Biol Chem* 275(50):38990-38994, 2000

- [61] Dummler B, Tschopp O, Hynx D, Yang Z, Dirnhofer S, Hemmings BA: Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable and display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol. Cell. Biol* 26(21):8042-8051, 2006
- [62] Van Dam RM, Hoebee B, Seidell JC, Schaap MM, Blaak EE, Feskens JM : The insulin receptor substrate-1 Gly972Arg polymorphism is not associated with Type 2 diabetes in two population-based study. *Diabet Med* 21(7):752-758, 2004
- [63] Clausen JO, Hansen T, Bjørbaek, C, Echwald SM, Urhammer SA, Rasmussen S, Andersen CB, Hansen L, Almind K, Winther K, Haraldsdóttir J, Borch-Johnsen K, Pedersen O: Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet* 346(8972):397-402, 1995
- [64] Baroni GM, Arca M, Sentinelli F, Buzzetti R, Capici F, Lovari S, Vitale M, Romeo S, Di Mario U: The G972R variant of the Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) gene, body fat distribution and insulin-resistance. *Diabetologia* 44(3):367-372, 2001
- [65] Marini MA, Frontoni S, Mineo D, Bracaglia D, Cardellini M, De Nicolais P, Baroni A, D'Alfonso R, Perna M, Lauro D, Federici M, Gambardella S, Lauro R, Sesti G: The Arg⁹⁷² variant in Insulin receptor Substrate-1 is associated with an atherogenic profile in offspring of Type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 88(7):3368-3371, 2003
- [66] Marchetti P, Lupi R, Federici M, Marselli L, Masini M, Boggi U, Del Guerra S, Patané G, Piro S, Anello M, Bergamini E, Purrello F, Lauro R, Lauro R, Mosca F, Sesti G, Del Prato S: Insulin secretory function is impaired in isolated human islets carrying the Gly(972)-Arg IRS-1 polymorphism. *Diabetes* 51(3):1419-1424, 2002
- [67] Hribal ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Borboni P, Accili D, Lauro R, Sesti G: The Gly-Arg⁹⁷² Amino Acid Polymorphism in Insulin Receptor Substrate-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85(5):2004-2013, 2000
- [68] Porzio O, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Accili D, Lauro R, Borboni P, Sesti G: The Gly972 to Arg polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic β -cells. *J Clin Invest* 104(3):357-364, 1999
- [69] Federici M, Pandolfi A, De Filippis EA, Pellegrini G, Menghini R, Lauro D, Cardellini M, Romano M, Sesti G, Lauro R, Consoli A: G972R IRS-1 variant impairs insulin regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in cultured human endothelial cells. *Circulation* 109(3): 399-405, 2004
- [70] Serino M, Menghini R, Fiorentino L, Amoruso R, Mauriello A, Lauro D, Sbraccia P, Hribal ML, Lauro R, Federici M: Mice heterozygous for Tumor necrosis factor- α Converting enzyme are protected from obesity-induced insulin resistance and diabetes. *Diabetes* 56(10):2541-2546, 2007
- [71] Hribal ML, Perego L, Cardellini M, Paganelli M, Andreozzi F, Pontiroli A, Folli F, Sesti G: Gene expression profiling in adipose tissue of G972R IRS-1 carriers. *Diabetes* 54 (Suppl 1): A270, 2005
- [72] Sesti G, Marini MA, Cardellini M, Sciacqua A, Frontoni S, Andreozzi F, Irace C, lauro D, Gnasso A, Federici M, Perticone F, Lauro R: The Arg972 variant in insulin receptor substrate-1 is associated with an increasing risk of secondary failure to sulfonylurea in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27(6):1394-98, 2004
- [73] Tschritter O, Preissl H, Henninge AM, Stumvoll M, Porubka K, Frost R, Marx H, Klosel B, Lutzenberger W, Birbaumer N, Haring HU, Fritsche A: The cerebrocortical response to hyperinsulinemia is reduced in overweight humans: a magnetoencephalographic study. *Proc Natl Acad Sci* 103:12103-8, 2006

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Renato Lauro per avermi dato la possibilità di sviluppare questa Tesi di Dottorato nel Laboratorio di Medicina Molecolare della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" da lui diretto.

Ringrazio il Prof. Massimo Federici, Tutor del mio Dottorato, per aver detto quello che quasi nessuno dice: "dire che hai molta voglia di lavorare, anche se non lo sai ancora fare, è la cosa migliore che puoi dire per presentarti"

Ringrazio infinitamente la Dottoressa Marta Letizia Hribal, per avermi aiutata, sostenuta e seguita in tutti i modi in cui potevo sperare che lo facesse, per avermi aperto un po' il suo cuore ed avermi confermato di essere la persona buona e splendida che mi è sembrata dal primo momento che l'ho vista. Ti vorrò bene tutta la vita.

Grazie alla Dottoressa Barbara Capuani, per essere stata la mia "vice-Marta", sempre con bontà, umiltà, per pura amicizia e nel pieno disinteresse; è anche questa disponibilità a trasmettere il proprio sapere che fa un grande ricercatore, non solo gli anni di esperienza.

Grazie alla Dottoressa Alessia Vivanti ed alla Dottoressa Roberta Amoruso, per essere state le compagne di questo viaggio, nella gioia e nella delusione.

Grazie al Sig. Ezio Caniglia per la simpatia, l'affetto ed il senso di fiducia e di stima che c'è stato sempre tra di noi.

Grazie al Dott. Marco Lombardo per la sua simpatia e per essere stato, forse senza saperlo, una presenza confortante, anche da lontano, nelle ore di laboratorio.

Grazie alla Dott.ssa Giulia Donadel, per la simpatia e la stima che mi ha sempre dimostrato.

Ringrazio i miei genitori ed i miei fratelli, perché li amo più della mia vita, per essermi stati vicino e per amarmi, fino a qui e da qui in avanti.

Grazie ad Alba, per essere nella mia vita.

... e grazie anche a te, Cristian.

*Un pensiero pieno d'amore va ai miei nonni Vincenza e Giuseppe,
a cui questa tesi è dedicata.*