

Relazione Finale Borsa di Studio Fondazione Diabete Ricerca & MSD 2014

Di Gaia Chiara Mannino

Progetto

**Meccanismi molecolari che sottendono il trasporto di glucosio indotto da
Exenatide: il ruolo di AMPK**

Background

Il Diabete Mellito Tipo 2 (T2D) è una patologia cronica, caratterizzata da resistenza insulinica nei tessuti periferici, quali muscolo, fegato e tessuto adiposo, dovuta alla mancata attivazione di PI3-K (Fosfoinositide 3-chinasi) e da ridotta secrezione insulinica, morte delle beta-cellule e accumuli amiloidi [1-5]. Gli ormoni incretinici GIP (Peptide Inibitore Gastrico) e GLP-1 (Peptide simile al Glucagone-1), secreti rispettivamente dalle cellule K nel duodeno e dalle cellule L nell'ileo/colon, hanno un ruolo fondamentale nella regolazione della glicemia in seguito all'assunzione di carboidrati e lipidi durante i pasti. In particolare, le proprietà ipoglicemizzanti del GLP-1 dipendono dalla sua azione anoressizzante, di rallentamento dello svuotamento gastrico, riduzione della secrezione di glucagone e aumento della secrezione di insulina glucosio-dipendente [6-10]. Numerosi studi clinici hanno dimostrato che il trattamento con Exenatide (EXE), un agonista del recettore del GLP-1 (GLP-1R), è in grado di migliorare significativamente il controllo glicemico nei pazienti diabetici, con effetti diretti sul peso corporeo [11,12].

In diverse occasioni è stato dimostrato che il GLP-1R è presente anche nei tessuti extra-pancreatici [13]. Ciò ha portato alla formulazione di ipotesi secondo le quali, oltre all'azione incretinica, il GLP-1 abbia effetti benefici anche sul sistema cardiovascolare, sull'ipertensione e sul profilo lipidico di soggetti sani, insulino-resistenti e diabetici [14-18]. L'azione di induzione del trasporto di glucosio nel muscolo scheletrico del GLP-1 non è ancora stata chiarita, nonostante i numerosi studi su modelli animali [19] e line cellulari umane [20].

Recentemente, diversi farmaci incretino-mimetici quali exenatide, liraglutide, lixisenatide, e altri, sono stati testati nei trial clinici. È stato dimostrato che queste molecole, mimando l'azione dell'ormone endogeno GLP-1, migliorano nei soggetti diabetici il controllo glicemico e la funzionalità delle beta-cellule, le quali risultano più sensibili ai secretagoghi esterni [21].

L'exenatide (EXE) è una versione sintetica dell'Exendin-4, un agonista del GLP-1R estratto dal veleno della lucertola *Heloderma suspectum*, e si trova attualmente disponibile in commercio come ipoglicemizzante (approvato dall'FDA e dall'AIFA) [22,23]. EXE ha il 52% di identità amminoacidica con il GLP-1, è più resistente alla degradazione da parte dell'enzima DPP-IV [24], e ha effetti paragonabili sulla secrezione insulinica [24,25]. È importante notare che l'EXE ha un potere maggiore del GLP-1 come ipoglicemizzante [26]. È stato dimostrato che il GLP-1 stimola il trasporto del glucosio attraverso l'attivazione di un pathway che coinvolge PI3-K, AKT e p70s6k, ma EXE sembra condividere solo in parte queste caratteristiche nei miociti umani [27-29].

Sebbene ampiamente documentati, i suoi effetti sul metabolismo del glucosio potrebbero non limitarsi esclusivamente al potenziamento della secrezione insulinica glucosio-dipendente.

Risultati Preliminari

Recentemente abbiamo deciso di valutare se EXE fosse in grado di modulare la captazione del glucosio usando cellule di muscolo scheletrico di ratto L6 differenziate. Come riportato in figura 1a, abbiamo trattato i miotubi L6 con 100 nmol/l di EXE per 20 minuti (min) (stimolazione acuta) fino a 48 ore (h) (stimolazione cronica), ed abbiamo misurato la captazione del 2DG (2-deoxy-D-glucose), utilizzando l'insulina alla concentrazione di 100 nmol/l per 30 min come controllo positivo. Il risultato di questo esperimento ha dimostrato che EXE è in grado di indurre un aumento di circa 2 volte del trasporto di 2DG comparabile all'effetto dell'insulina (2.5 volte) già dopo 20 min di trattamento, e che la captazione del 2DG rimane stabilmente aumentata fino a 48 h rispetto al basale. In aggiunta, vale la pena notare che il trattamento contemporaneo di EXE ed insulina non ha alcun effetto additivo sul trasporto di 2DG (figura 1b), suggerendo che EXE agisca tramite l'attivazione di un pathway alternativo a quello dell'insulina.

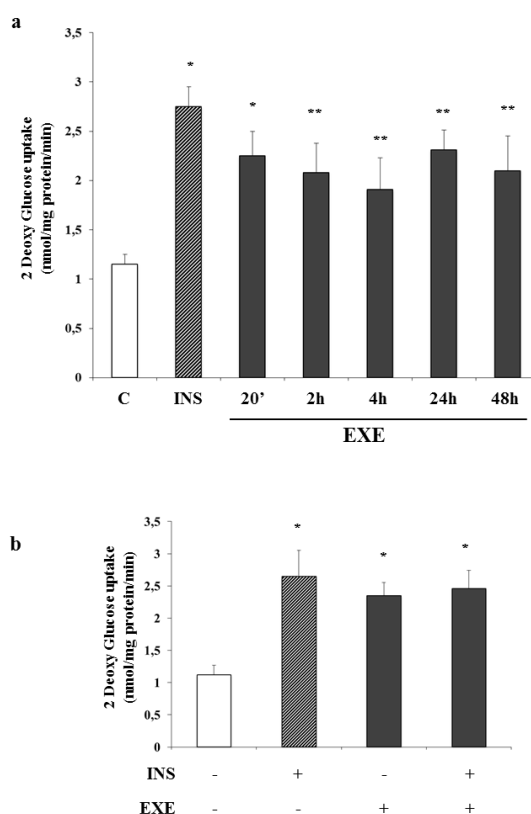


Figura 1. (a) EXE induce il trasporto di 2DG in miotubi L6 di ratto. I miotubi sono stati piastrati in piastre 6-well e stimolati con 100 nmol/l EXE per 20 min, 2, 4, 24, e 48 h e con 100 nmol/l di insulina (INS) per 30 min come controllo. **(b)** I miotubi sono stati stimolati con 100 nmol/l EXE per 20 min, con 100 nmol/l INS per 30 min o con entrambi. Dopo il trattamento il trasporto del 2DG è stato misurato. I risultati riportano le medie $\pm$ DS di esperimenti in triplicato ($n=3$). L'analisi statistica è stata effettuata usando il test t di Student; * $p<0.001$, ** $p<0.01$ vs controllo.

Poiché recentemente in un modello animale transgenico di cardiomiopatia dilatativa è stato dimostrato che gli effetti benefici dell'EXE sull'omeostasi del glucosio, sulla funzione cardiaca e sulla sopravvivenza in generale sono mediati da AMPK (AMP-activated protein kinase) [30], ho deciso di studiare in dettaglio gli effetti di EXE su AMPK. È noto che AMPK ha un ruolo

importante nella biogenesi mitocondriale, nell'inibizione della sintesi di acidi grassi tramite attivazione di ACC (acetyl-coenzyme A carboxylase), e nella regolazione dell'uptake del glucosio [31-33]. Come riportato in figura 2 (a e b), EXE è risultato capace di indurre la fosforilazione della porzione catalitica di AMPK (AMPK α) sul suo sito Thr172, e sul suo diretto substrato ACC a livello di Ser78/80, già dopo 20 min e fino a 48 h di trattamento, in cellule L6 differenziate (miotubi).

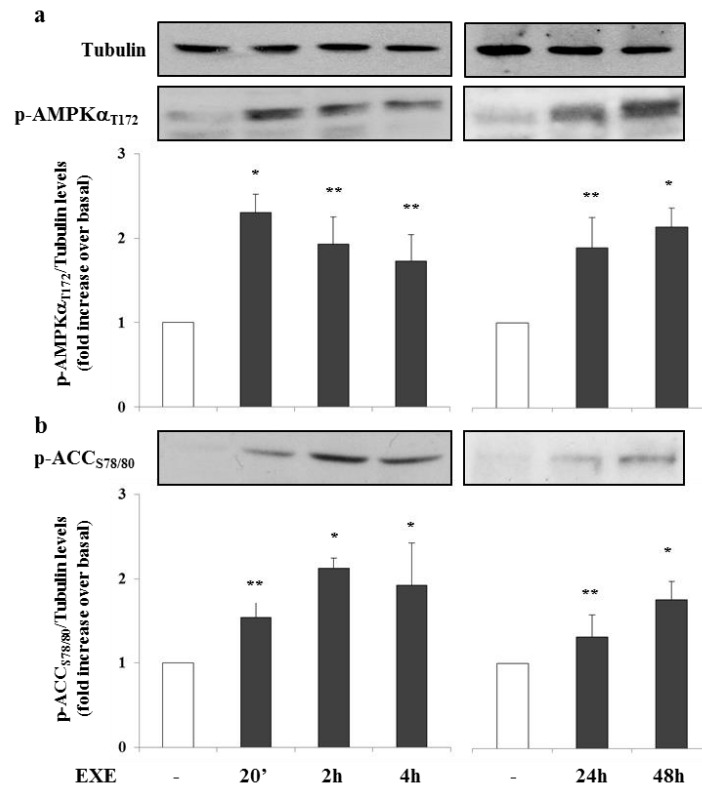


Figura 2. EXE induce l'attivazione di AMPK α in miotubi L6 di ratto: Time course. I miotubi sono stati piastrati in piastre 6-well e stimolati con 100 nmol/l EXE per 20 min, 2, 4, 24, e 48 h. Le cellule sono state lisate e quantità uguali di proteina sono state incubate con anticorpi specifici per p-AMPK α T172 (a), e p-ACC S78/S80 (b). Per normalizzare i livelli di fosforilazione i filtri sono stati strappati e incubati con anticorpi anti tubulina (a, pannello superiore). L'analisi statistica è stata effettuata usando il test *t* di Student; **p*<0.001, ***p*<0.01 vs basale.

Poiché gli effetti di EXE sulla regolazione del metabolismo del glucosio nel muscolo scheletrico sono ancora poco noti e oggetto di numerose ricerche, ho deciso di studiare i meccanismi molecolari potenzialmente coinvolti nell'azione di EXE usando cellule L6 di ratto.

Risultati

- È noto che EXE, come altri analoghi del GLP-1, agisce legandosi al recettore del GLP-1 (GLP-1R). Per questo motivo è stato necessario verificare attraverso esperimenti di Western Blot (WB) che il GLP-1R fosse espresso in cellule L6 differenziate (miotubi - Tb) ed indifferenziate (mioblasti - Bl).

Per questo motivo, ho utilizzato lisati di tessuto adiposo (A), muscolare (M), epatico (L) e cerebrale (B) di babbuino, insieme a gastrocnemio umano (SkM), linee cellulari α -TC1 e β -TC3 murine, come controllo. Come riportato in figura 3a, il GLP-1R è espresso sia nei miotubi che nei mioblasti. Allo stesso modo il gastrocnemio umano ed i tessuti epatici e cerebrali di babbuino mostrano la presenza di GLP-1R, che è invece risultato debolmente espresso nel tessuto adiposo di babbuino e assente in cellule α -TC1 (figura 3b).

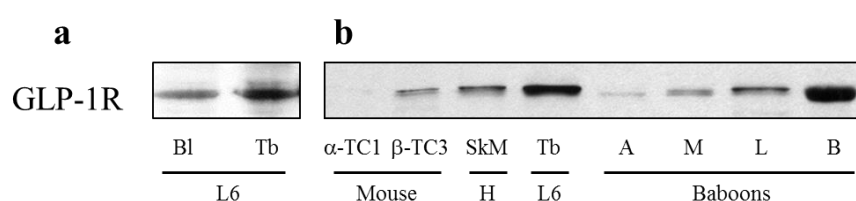


Figura 3. Presenza del Glp-1R determinata tramite Western Blot immunoblotting con anticorpo specifico per il GLP-1R in linee cellulari murine α -TC1 e β -TC3, mioblasti (Bl) e miotubi (Tb) L6, muscolo scheletrico umano (SkM), tessuto adiposo (A), muscolare (M), epatico (L) e cerebrale (B) di babbuino.

Per gli esperimenti di Real Time PCR quantitativa con SYBR Green sono stati disegnati i seguenti primers specifici per il GLP-1R di ratto:

FORWARD STRAND: 5'-AGTTCCGCTGCTGTTTCGTTA-3'

REVERSE STRAND: 5'-AGGAAGTTGACCCCGATTGC-3'

Il gene per la beta-2 microglobulina (B2M) di ratto è stato utilizzato come normalizzatore.

I primers utilizzati sono di seguito indicati:

FORWARD STRAND: 5'-ACTGAATTCACACCCACCGA-3'

REVERSE STRAND: 5'-ATTACATGTCTCGGTCCCAGGT-3'

Per chiarire gli effetti di EXE nel trasporto del glucosio ho trattato cellule L6 differenziate (miotubi) con EXE per 20 min, con insulina per 30 min, entrambe le molecole alla concentrazione di 100 nmol/l, da sole o in combinazione. Le cellule sono state successivamente lisate con un buffer specifico e le proteine estratte sono state utilizzate per esperimenti di WB. Come indicato nel progetto ho studiato le maggiori molecole coinvolte nel pathway dell'insulina ottenendo i risultati di seguito riportati.

- A differenza dell'insulina, EXE non è stato in grado di indurre l'attivazione del recettore dell'insulina (IR), misurata come fosforilazione delle tirosine della subunità β dell'IR e

fosforilazione totale di IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1) con esperimenti di immunoprecipitazione (figura 4).

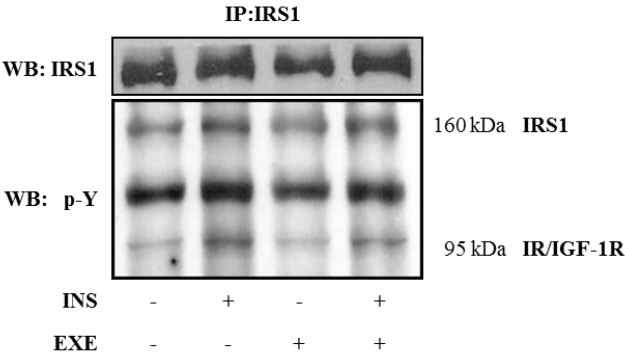


Figura 4. Miotubi L6 coltivati in piastre multi-well da 6 pozzetti stimolati con 100 nM Exenatide (EXE) for 20 min, 100 nM insulina (INS) per 30 min o con entrambe le molecole. Le cellule sono state successivamente lisate, uguali quantità di proteine sono stati immunoprecipitati con anticorpo specifico per IRS-1, e saturate con anticorpo specifico per le fosfo-tirosine. Per normalizzare i risultati le membrane dei WB sono state sottoposte a “stripping” e re-incubate con anticorpo specifico per IRS-1.

ii) In linea con questi dati, EXE non si è dimostrato in grado di influenzare l’attivazione della chinasi AKT e del suo substrato GSK3 β , valutate misurando il livello di fosforilazione rispettivamente delle serine 473 e 21/9 (figure 5a e b). Il trattamento con EXE ha invece dimostrato di indurre l’attivazione di AMPK α , misurata come fosforilazione del sito Thr172, aumentata di 2.5 volte rispetto al basale, e all’insulina, che, notoriamente, non agisce su AMPK (figura 5c). Di conseguenza il trattamento congiunto con insulina e EXE non ha mostrato la presenza di alcun effetto additivo su AKT o AMPK (figura 5a e c), suggerendo che EXE eserciti i propri effetti stimolatori sul trasporto del glucosio con un meccanismo indipendente dall’insulina, probabilmente tramite l’attivazione di AMPK.

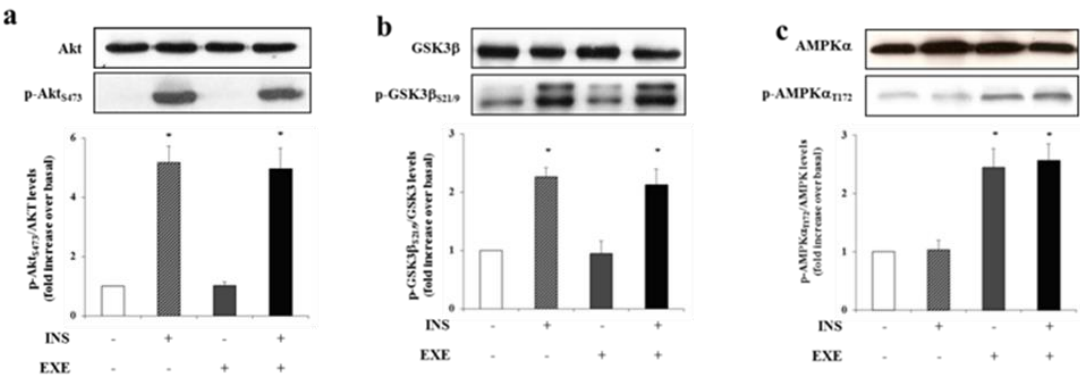


Figura 5. Miotubi L6 coltivati in piastre multi-well da 6 pozzetti stimolati con 100 nM Exenatide (EXE) per 20 min, 100 nM insulina (INS) per 30 min o con entrambe le molecole. Le cellule sono state successivamente lisate e analizzate con anticorpi fosfo-specifici: p-Akt S473 (a), p-GSK3 β S21/9 (b) e p-AMPK T172 (c). Per normalizzare i risultati le membrane dei WB sono state sottoposte a “stripping” e re-incubate con anticorpi rispettivamente specifici per AKT, GSK3 β e AMPK. I dati riportati rappresentano media $\pm$ DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L’analisi statistica è stata eseguita con la valutazione del test *t* di Student; **p* < 0.001 vs basale.

iii) Per esaminare l’effetto di EXE su AMPK α i miotubi L6 sono stati trattati con EXE a tempi crescenti di esposizione (20 min, 2, 4, 24 e 48 h) e ho misurato la fosforilazione di AMPK α sul sito Thr172 e del suo diretto substrato ACC sul sito Ser78/80 tramite WB. L’esperimento

di time-course dimostra che EXE è in grado di stimolare sia AMPK sia ACC dopo 20 minuti di esposizione, e che questo effetto stimolatorio è ancora osservabile dopo 48 ore di trattamento (figure 6a e b). Esperimenti di tipo dose-risposta hanno rivelato che la massima attivazione di AMPK corrisponde al trattamento con 100nM di EXE (figura 7).

- iv) Quando i miotubi L6 sono stati pre-trattati per 30 min con il Compound-C (CC), noto inibitore chimico di AMPK, gli effetti di EXE e dell' AICAR 2 mmol/l (5-amino-4-imidazole carboxamide riboside), un forte attivatore chimico di AMPK, sono risultati quasi completamente inibiti (figure 8a e b). Differentemente, l'attivazione di AMPK e ACC indotta da EXE e AICAR non ha subito interferenze quando i miotubi L6 sono stati pre-trattati con LY294002 (LY), un inibitore specifico di PI3-K (figure 8a e b), escludendo la possibilità di un coinvolgimento di questa chinasi nell'asse EXE/AMPK.

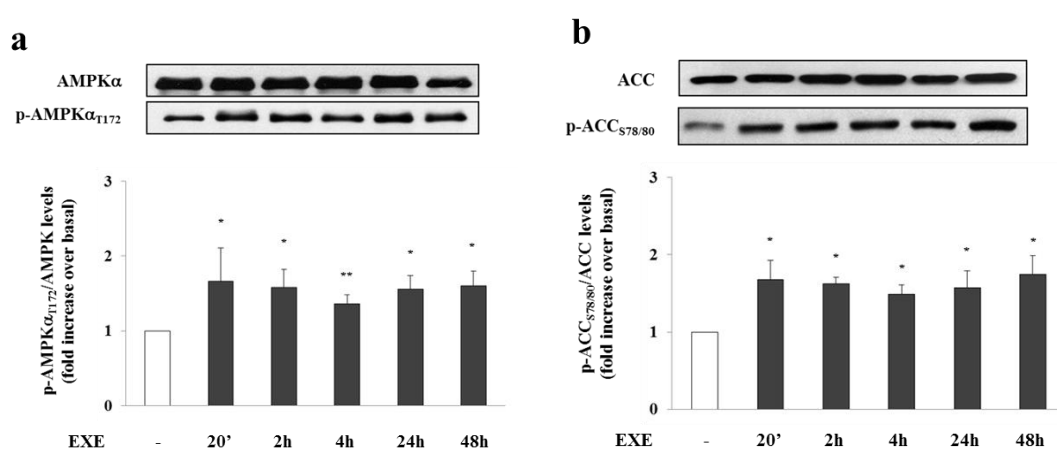


Figura 6. Time-course degli effetti di EXE su AMPK e ACC in miotubi L6 stimolati con EXE 100nM con tempi crescenti di incubazione. In figura sono riportati i livelli totali di proteina e la fosforilazione dei siti (a) T172 di AMPKα e (b) S78/80 di ACC. I dati rappresentano media±DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L'analisi statistica è stata eseguita con la valutazione del test *t* di Student; **p* < 0.01 ***p* < 0.05 vs basale.

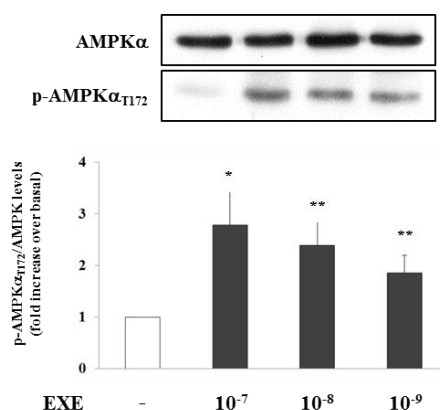


Figura 7. Effetti dose-risposta di EXE sulla fosforilazione di AMPK in miotubi L6 stimolati per 20 min con dosi scalari di EXE. In figura sono riportati i livelli totali di proteina e la fosforilazione del sito T172 di AMPKα. I dati rappresentano media±DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L'analisi statistica è stata eseguita con la valutazione del test *t* di Student; **p* < 0.01 ***p* < 0.05 vs basale.

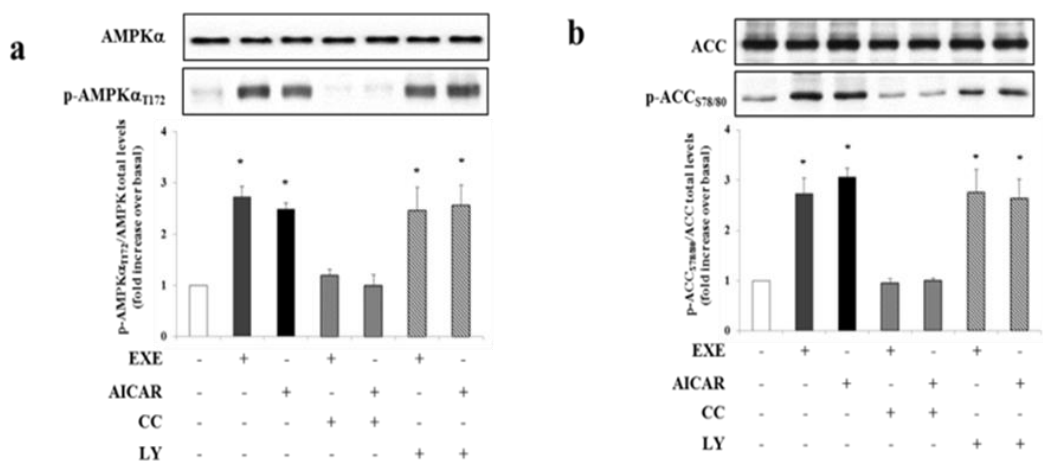


Figura 8. Miotubi L6 coltivati in piastre multi-well da 6 pozzetti pre-trattati con 40mM CC o 25mM LY per 30 min, stimolati con 100nM EXE per 20 min o con 2mM AICAR per 2 h. Le cellule sono state successivamente lisate e analizzate con anticorpi fosfo-specifici: **(a)** p-AMPKα T172 e **(b)** p-ACC S78/S80. Per normalizzare i risultati le membrane dei WB sono state sottoposte a “stripping” e re-incubate con anticorpi rispettivamente specifici per AMPK e ACC. I dati riportati rappresentano media±DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L’analisi statistica è stata eseguita con la valutazione del test *t* di Student; **p* < 0.001 vs basale.

• Poiché è stato recentemente dimostrato in adipociti 3T3-L1 che il ruolo funzionale di AMPK nella traslocazione del GLUT-4 (Glucose transporter type 4) passa per la via delle MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) [34], ho deciso di esaminare il coinvolgimento di alcuni importanti componenti di questa via. Stimolando i miotubi L6 con 100 nM EXE per 20 min, con la stessa concentrazione di insulina per 30 min, o con entrambe le molecole, non è stato possibile osservare alcuna modulazione di JNK (c-Jun N-terminal kinase) (non riportati in questa sede) ed ERK 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) da parte di EXE (figura 9), per cui è possibile escludere un coinvolgimento del pathway mitogenico tra gli effetti di EXE.

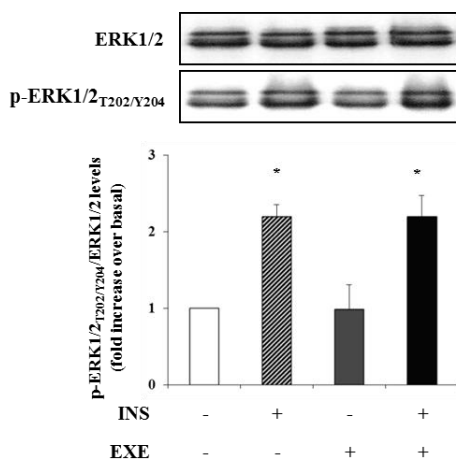


Figura 9. Miotubi L6 coltivati in piastre multi-well da 6 pozzetti stimolati con 100 nM Exenatide (EXE) per 20 min, 100 nM insulina (INS) per 30 min o con entrambe le molecole. Le cellule sono state successivamente lisate e analizzate con anticorpo fosfo-specifico p-ERK1/2 T202/Y204. Per normalizzare i risultati, le membrane dei WB sono state sottoposte a “stripping” e re-incubate con anticorpo specifico per ERK1/2. I dati riportati rappresentano media±DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L’analisi statistica è stata eseguita con la valutazione del test *t* di Student; **p* < 0.001 vs basale.

• I risultati degli esperimenti preliminari hanno dimostrato che EXE è in grado di indurre un aumento di circa 2 volte del trasporto di 2DG dopo 20 min di trattamento, e che EXE sembra agire tramite l'attivazione di un pathway alternativo a quello dell'asse insulina/PI3-K, quindi via AMPK. Per confermare questa ipotesi, ho esaminato gli effetti di EXE sul trasporto del glucosio pretrattando le cellule per 30 min con 25 mM LY294002 (LY), un noto inibitore di PI3-K, e ho utilizzato, come negli esperimenti precedenti, Compound-C (CC) e AICAR, come controllo chimico negativo e positivo, rispettivamente, dell'attivazione di AMPK. I risultati dimostrano che, nonostante insulina e EXE abbiano effetti paragonabili sulla captazione del 2DG, l'azione dell'insulina è mantenuta in presenza di CC, e completamente abolita dal trattamento con LY, viceversa gli effetti di EXE sono conservati in presenza di LY e aboliti dal trattamento con CC (figura 10). Ciò conferma l'esistenza di due meccanismi molecolari distinti che convergono a livello del trasportatore del glucosio GLUT4, ma indipendenti l'uno dall'altro.

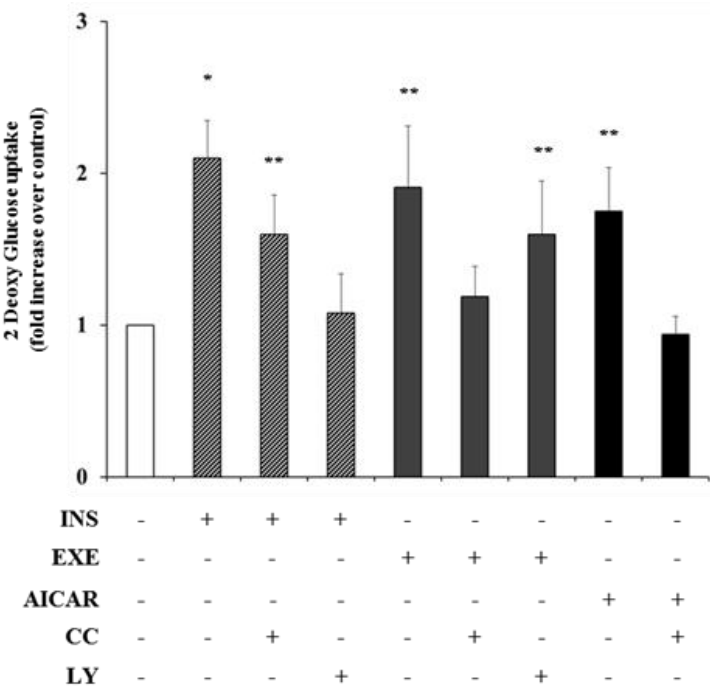


Figura 10. Miotubi L6 coltivati in piastre multi-well da 6 pozzetti pre-trattati con 40 nM CC o con 25 mM LY per 30 min, quindi stimolati con 100 nM Exenatide (EXE) per 20 min, 100 mM insulina (INS) per 30 min, o con 2 mM AICAR per 2 h. Le cellule sono state successivamente utilizzate per misurare la captazione di 2DG. I dati riportati rappresentano media±DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L'analisi statistica è stata eseguita con la valutazione del test *t* di Student; **p* < 0.001, ***p*<0.01 vs basale.

• Parallelamente, ho testato la capacità di EXE di regolare la captazione del glucosio in condizioni di insulino-resistenza. A tal fine i miotubi L6 sono stati pre-trattati con MGO (Methylglyoxal), un precursore degli AGEs (advanced glycation end products), prodotto in gran quantità in condizioni di iper-glicemia, che riduce la sensibilità insulinica nelle cellule muscolari [35]. Dopo esposizione ad MGO per 30 min, le cellule sono state utilizzate per valutare la captazione del 2DG in presenza di EXE o insulina. Gli effetti di EXE sul trasporto del glucosio sono risultati inalterati dalla pre-incubazione con MGO, in contrapposizione agli effetti dell'insulina che, come atteso, sono stati aboliti dalla presenza di insulino-resistenza (figura 11).

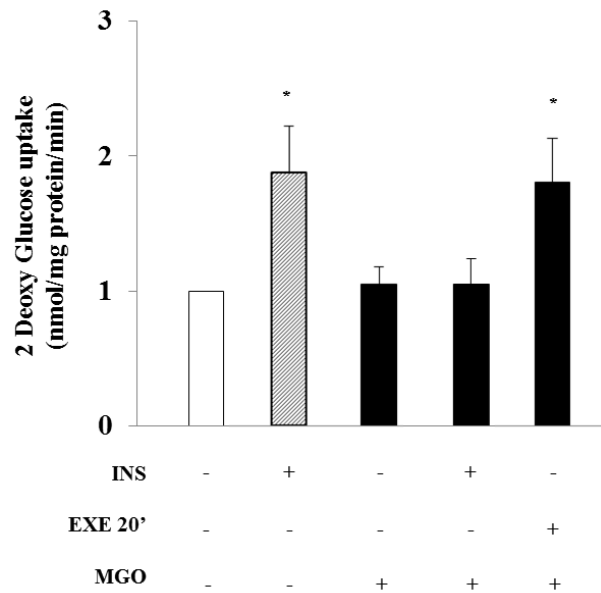


Figura 11. Miotubi L6 coltivati in piastre multi-well da 6 pozzetti pre-trattati con 2.5 mM MGO per 30 min, quindi stimolati con 100 nM Exenatide (EXE) per 20 min o con 100 nM insulina (INS) per 30 min. Le cellule sono state successivamente utilizzate per misurare la captazione di 2DG. I dati riportati rappresentano media $\pm$ DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L'analisi statistica è stata eseguita con la valutazione del test *t* di Student; **p* < 0.01 vs basale e trattamento con solo MGO.

- Per chiarire il ruolo di AMPK nel trasporto del glucosio EXE-dipendente, ho portato a termine:
 - i. esperimenti di silenziamento, attraverso siRNA specifici per le subunità catalitiche di AMPK $\alpha 1/\alpha 2$.
 - Tre siRNA ed un controllo (siRNA NR) sono stati trasfettati nei miotubi L6, utilizzando oligofectamina (Life Technologies, Carlsbad, CA) secondo le istruzioni del produttore. Esperimenti di western blot hanno confermato la down-regolazione dell'espressione di AMPK α di ~80% con il siRNA2 ($P < 0.001$, figura 12a), associata ad una marcata riduzione della fosforilazione di AMPK α sul sito Thr172 ($P < 0.001$, figure 12b).
 - ii. esperimenti di trasporto del 2DG in cellule L6 trasfettate con siRNA per AMPK $\alpha 1/\alpha 2$.
 - Nei miotubi L6 trasfettati con il siRNA2 il trasporto del glucosio indotto da EXE è risultato marcatamente ridotto rispetto al controllo non trattato e alle cellule trasfettate con gli altri siRNA e siRNA NR (figura 12c).

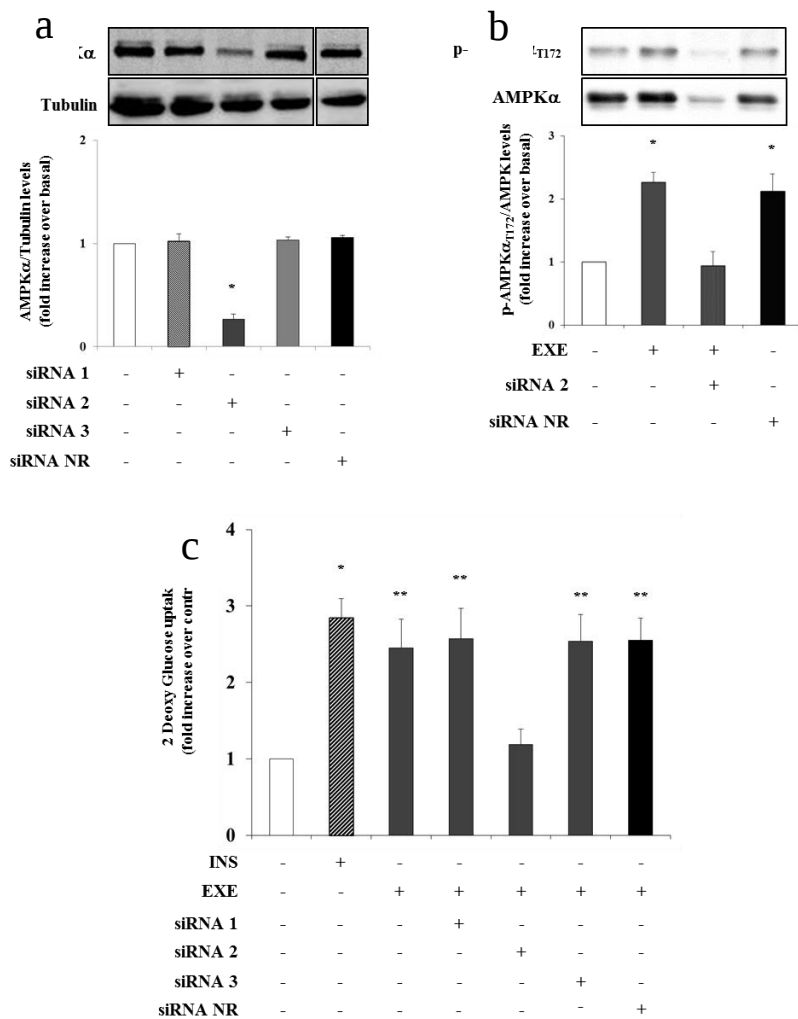


Figura 12. EXE induce la captazione del 2DG via AMPKα nei miotubi L6: i siRNA. Miotubi L6 coltivati in piastre multi-well da 6 pozzetti trasfettati con siRNA specifici per AMPK e stimolati con 100nM EXE per 20 min o con 100nM INS per 30 min. Le cellule sono state successivamente lisate e analizzate con anticorpi specifici per AMPKα (a) e p-AMPKα-T172 (b). Per normalizzare i risultati, le membrane dei WB sono state sottoposte a “stripping” e re-incubate con anticorpo specifico anti-tubulina (a) o anti-AMPKα (b). La captazione del 2DG (c) è stata valutata nelle stesse condizioni sperimentali. I dati riportati rappresentano media±DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L’analisi statistica è stata eseguita con la valutazione del test *t* di Student; **p*<0.001, ***p*<0.01 vs basale.

iii. esperimenti di Real Time PCR quantitativa con SYBR Green e di Western Blot, per valutare i livelli di espressione di mRNA e i livelli proteici di GLUT4 a diversi tempi di trattamento con EXE (acuto, 20 min, e cronico, 48 h).

- Per gli esperimenti di Real Time RT-PCR sono stati disegnati i seguenti primers specifici per il GLUT4 di ratto:

FORWARD STRAND: 5'- CCACAGAAAGTGATTGAACAGAGC -3'
 REVERSE STRAND: 5'- AATGATGCCAATGAGAAAGGAG -3'

Il gene per la beta-2 microglobulina (B2M) di ratto è stato utilizzato come normalizzatore. I primers utilizzati sono di seguito indicati:

FORWARD STRAND: 5'-ACTGAATTCACACCCACCGA-3'
 REVERSE STRAND: 5'-ATTACATGTCTCGGTCCCAGGT-3'

L'esposizione delle cellule a EXE non ha conseguito cambiamenti significativi dei livelli di trascrizione di GLUT4, né della quantità di proteina GLUT4 misurabile tramite Western Blot (figura 13).

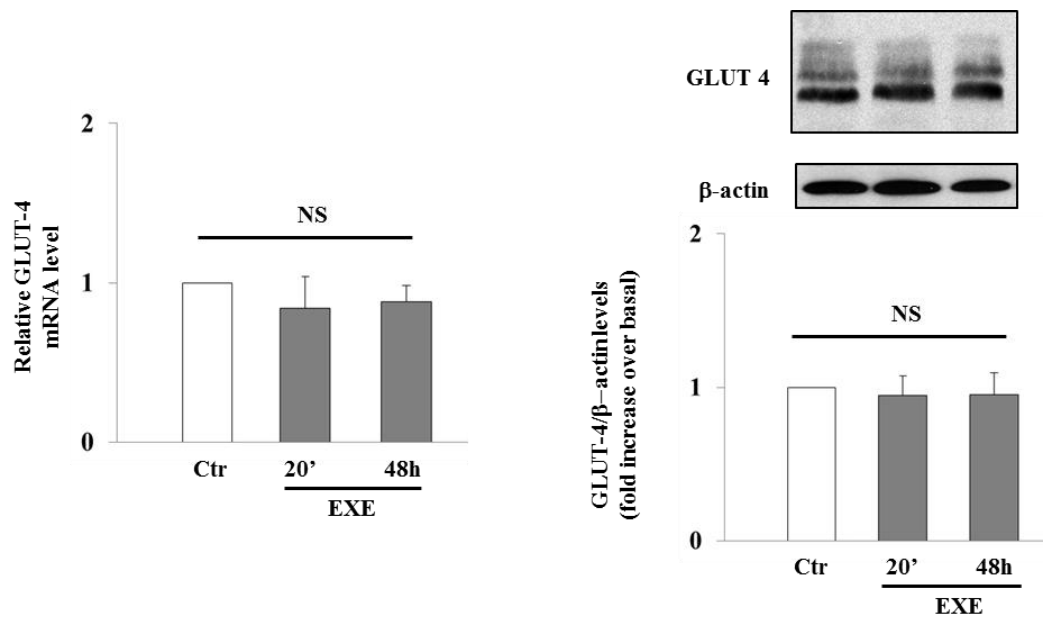


Figura 13. Livelli di espressione di GLUT4 (mRNA e proteine) in miotubi L6 trattati con EXE per 20 min o 48 h. Dopo lo stimolo le cellule sono state lisate per estrarre RNA e proteine. Le proteine sono state analizzate con anticorpi specifici per GLUT4. Per normalizzare i risultati, le membrane dei WB sono state sottoposte a “stripping” e re-incubate con anticorpo specifico anti-β-actina. I dati riportati rappresentano media±DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L’analisi statistica è stata eseguita con la valutazione del test *t* di Student; NS=nessuna differenza significativa.

Per concludere, il presente contributo, corroborato dai risultati, dimostra gli effetti benefici di EXE nella regolazione del metabolismo glucidico, con numerose applicazioni sull’uomo per il controllo dei meccanismi patofisiologici e delle complicanze del T2D.

Bibliografia

1. Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR (1993) Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. *J Clin Invest* 92:1787–1794
2. Federici M, Hribal M, Perego L et al (2001) High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 50:1290-301
3. Guardado-Mendoza R, Davalli AM, Chavez AO et al (2009) Pancreatic islet amyloidosis, beta-cell apoptosis, and alpha-cell proliferation are determinants of islet remodeling in type-2 diabetic baboons. *Proc Natl Acad Sci* 106:13992-7
4. Folli F, Okada T, Perego C et al (2011) Altered insulin receptor signaling and β -cell cycle dynamics in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 6:e2805
5. Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC (2003) Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* 52:2304-14
6. Mojsov S, Weir GC, Habener JF (1987) Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 79:616-9
7. Schmidt WE, Siegel EG, Creutzfeldt W (1985) Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia* 28:704-7
8. Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahrén B, Efendic S (1992) Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus *N Engl J Med* 326:1316-22.
9. Cervera A, Wajcberg E, Sriwijitkamol A et al (2008) Mechanism of action of exenatide to reduce postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E846-52
10. Briaud I, Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, Rhodes CJ (2003) Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 52:974-83
11. Buse JB, Henry RR, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD (2004) Exenatide-113 Clinical Study Group. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:2628-35
12. DeFronzo RA, Ratner RE, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD (2005) Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes (2005) *Diabetes Care* 28:1092-100
13. Ahrén B (2004) GLP-1 and extra-islet effects. *Horm Metab Res* 36:842-5
14. Tesauro M, Schinzari F, Adamo A et al (2013) Effects of GLP-1 on forearm vasodilator function and glucose disposal during hyperinsulinemia in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 36:683-9
15. Nyström T, Gutniak MK, Zhang Q et al (2004) Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am J Physiol* 287:E1209-15

16. Ossum A, van Deurs U, Engstrøm T, Jensen JS, Treiman M (2009) The cardioprotective and inotropic components of the postconditioning effects of GLP-1 and GLP-1(9–36)a in an isolated rat heart. *Pharmacol Res* 60:411-7
17. Klonoff DC, Buse JB, Nielsen LL et al (2008) Exenatide effects on diabetes, obesity, cardiovascular risk factors and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes treated for at least 3 years. *Curr Med Res Opin* 24:275-86
18. Petrie JR (2013) The cardiovascular safety of incretin-based therapies: a review of the evidence. *Cardiovasc Diabetol* 12:130
19. Ayala JE, Bracy DP, James FD, Julien BM, Wasserman DH, Drucker DJ (2009) The glucagon-like peptide 1 receptor regulates endogenous glucose production and muscle glucose uptake independent of its incretin action. *Endocrinology* 150:1155-64
20. Green CJ, Henriksen TI, Pedersen BK, Solomon TP (2012) Glucagon like peptide-1-induced glucose metabolism in differentiated human muscle satellite cells is attenuated by hyperglycemia. *PLoS One* 7:e44284
21. Berlie H, Hurren KM, Pinelli NR (2012) Glucagon-like peptide-1 receptor agonists as add-on therapy to basal insulin in patients with type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Metab Syndr Obes* 5:165-74.
22. Egan JM, Clocquet AR, Elahi D (2002) The insulinotropic effect of acute exendin-4 administered to humans: comparison of nondiabetic state to type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1282-90.
23. Fehse F, Trautmann M, Holst JJ et al (2005) Exenatide augments first- and second-phase insulin secretion in response to intravenous glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5991-7
24. Drucker DJ (2001) Development of glucagon-like peptide-1-based pharmaceuticals as therapeutic agents for the treatment of diabetes. *Curr Pharm Des* 7:1399-412.
25. Sarkar G, Alattar M, Brown RJ, Quon MJ, Harlan DM, Rother KI (2014) Exenatide treatment for 6 months improves insulin sensitivity in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 37:666-70
26. Young AA, Gedulin BR, Bhavsar S et al (1999) Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes* 48:1026-34
27. Villanueva-Peñacarrillo ML, Puente J, Redondo A, Clemente F, Valverde I (2001) Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models. *Endocrine* 15:241-8
28. Idris I, Patiag D, Gray S, Donnelly R (2002) Exendin-4 increases insulin sensitivity via a PI-3-kinase-dependent mechanism: contrasting effects of GLP-1. *Biochem Pharmacol* 63:993-6
29. González N, Acitores A, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005) Effect of GLP-1 on glucose transport and its cell signalling in human myocytes. *Regul Pept* 126:203-11
30. Vyas AK, Yang KC, Woo D et al (2011) Exenatide improves glucose homeostasis and prolongs survival in a murine model of dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 6:e17178
31. Carling D (2004) The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29:18-24
32. Bergeron R, Ren JM, Cadman KS et al (2001) Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E1340-6

33. Dokas J1, Chadt A, Nolden T et al. (2013) Conventional knockout of Tbc1d1 in mice impairs insulin- and AICAR-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Endocrinology* 154(10):3502-14
34. Yamaguchi S, Katahira H, Ozawa S, et al (2005) Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(4):E643-9
35. Fiory F, Lombardi A, Miele C et al (2011) Methylglyoxal impairs insulin signalling and insulin action on glucose-induced insulin secretion in the pancreatic beta cell line INS-1E. *Diabetologia* 54(11):2941-52