

Relazione Finale Borsa di Studio Fondazione Diabete Ricerca & MSD 2015

Di Gaia Chiara Mannino

Estensione del progetto

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

Background

Il GLP-1 è sintetizzato e secreto dalle cellule L intestinali, come prodotto dello splicing alternativo del trascritto del proglucagone. L'azione insulino tropica degli ormoni incretinici è nota da oltre 25 anni, eppure nuovi effetti del GLP-1 continuano tuttora ad essere scoperti e documentati.

È noto che il GLP-1 inibisce la secrezione di glucagone e rallenta lo svuotamento gastrico, minimizzando l'escursione glicemica dopo l'assunzione di un pasto [1,2]. Sin dalla sua scoperta è stato ipotizzato che il GLP-1 abbia proprietà glucoregatorie che vanno oltre la sua capacità di modulare la secrezione di ormoni pancreatici e lo svuotamento gastrico [3]. Recentemente è stato dimostrato che in modelli murini di diabete è possibile raggiungere l'euglicemia in assenza di insulina, inibendo l'azione del recettore del glucagone, e sfruttando l'azione di supporto del GLP-1, che si rende maggiormente visibile in condizioni di assenza di questi due ormoni, e questa azione è stata osservata prevalentemente a livello epatico con la repressione della gluconeogenesi [4]. Nonostante ciò, altri studi hanno suggerito che gli effetti glucoregulatori del GLP-1 siano da attribuire esclusivamente al controllo esercitato sugli ormoni pancreatici [5,6]. Il recettore del GLP-1 (GLP1R) è diffusamente espresso nell'organismo umano ed esercita sia effetti diretti che indiretti [7]; di conseguenza, la teoria che il GLP-1 possa regolare direttamente la produzione e l'utilizzo del glucosio nei tessuti extrapancreatici resta in discussione.

L'Exenatide (EXE) è una versione sintetica dell'Exendin-4, un agonista stabile del GLP-1R con proprietà insulino tropiche, estratto dal veleno della lucertola *Heloderma suspectum*, attualmente utilizzato come ipoglicemizzante nel trattamento del diabete tipo 2 [8,9]. È importante sottolineare che l'EXE ha un potere di regolazione del glucosio maggiore rispetto al GLP-1 [10]. Alla base di tali differenze potrebbero trovarsi meccanismi d'azione diversi, infatti è stato dimostrato che il GLP-1 stimola il trasporto del glucosio nei miociti umani attraverso l'attivazione di un pathway che coinvolge PI3-K, AKT e p70s6k [11-13], ma EXE sembra condividere solo in parte queste caratteristiche [14-16].

Dati preliminari

Grazie al supporto ricevuto con la Borsa di Studio Fondazione Diabete Ricerca MSD 2014, nel corso dell'anno 2015 mi sono dedicata allo studio del GLP-1 e dei suoi analoghi, con particolare attenzione all'EXE, nei laboratori di ricerca del Professore Sesti, presso l'Università di Catanzaro, dove ho completato il mio percorso di Dottorato in Biotecnologie Mediche e continuo tutt'ora a condurre la mia attività di ricerca.

In breve, ho confermato la capacità di EXE di indurre il trasporto di 2DG (2-deoxy-D-glucose) nei miotubi L6 e ho esaminato lo stato di attivazione dei principali membri del pathway metabolico e mitogenico dell'insulina, per escludere un loro coinvolgimento nella trasduzione del segnale di EXE [17]. Ho individuato in AMPK il mediatore molecolare di tale meccanismo di segnalazione, sia in risposta al trattamento acuto (100nM per 20 min), sia cronico (100nM per 48h) con EXE.

Successivamente, grazie all'avvicendamento di tre composti chimici mirati all'inibizione di PI3-K (LY294002), all'attivazione costitutiva di AMPK (AICAR) o allo spegnimento del segnale di AMPK (Compound C), ho confermato che la captazione del 2DG indotta da EXE si avvale di un meccanismo di trasmissione indipendente da PI3-K e dipendente da AMPK. Esperimenti di silencing delle subunità catalitiche di AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ hanno confermato il ruolo fondamentale di AMPK nel trasporto del glucosio indotto da EXE.

Infine, poiché è stato dimostrato che gli effetti del GLP-1 sul trasporto del glucosio sono significativamente ridotti in condizioni di iperglicemia [12], ho utilizzato MGO (Methylglyoxal) per simulare tali condizioni e ho verificato che la captazione di 2DG indotta da EXE non subisce alterazioni in presenza di MGO.

Risultati

- Chiarire il coinvolgimento di TBC1D1 e TBC1D4 (AS160) come mediatore dell'induzione del trasporto del glucosio dopo stimolo con EXE nel muscolo scheletrico.

Sia TBC1D1 che TBC1D4/AS160 contribuiscono al traffico intracellulare e aumentano la traslocazione del GLUT4 sulla membrana citoplasmatica. Nel muscolo scheletrico e in altri tessuti è stato dimostrato che TBC1D4/AS160 media il trasporto del glucosio indotto dall'insulina [18-20]. Nel tessuto adiposo, invece, è stato riportato che TBC1D1 non risponde al trattamento con insulina, ma è sensibile all'azione di AMPK [21].

Dai nostri esperimenti, come riportato in figura 1, abbiamo potuto osservare che nei miotubi L6 TBC1D4 risponde allo stimolo dell'insulina aumentando la fosforilazione del sito Thr642, che è risultato, invece, inalterato dopo stimolo con EXE (Figura 1A). Viceversa, il trattamento con EXE ha aumentato di ~70% la fosforilazione di TBC1D1 (Figura 1B). Pertanto è plausibile ipotizzare che TBC1D1 sia il mediatore molecolare degli effetti di EXE/AMPK nei miotubi L6, e che i pathways dell'insulina e di AMPK convergono a livello del componente finale: il GLUT4.

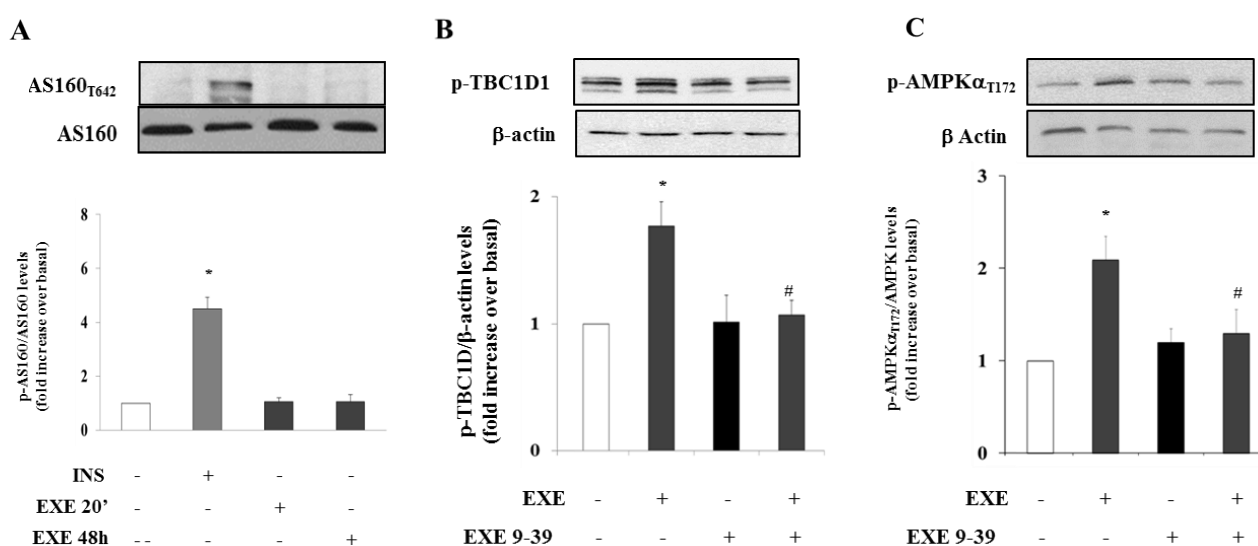


Figura 1. (A) I miotubi L6 sono stati stimolati con INS 100 nmol/l per 30 min o con EXE 100 nmol/l per 20 min o 48 ore. (B e C) I miotubi L6 sono stati stimolati per 20 min con EXE 100 nmol/l, EXE 9-39 100 nmol/l o entrambi. Le cellule sono state lisate e quantità uguali di proteina sono state incubate con anticorpi specifici per p-TBC1D4/AS160 T642 (A), p-TBC1D1 (B), e p-AMPK α T172 (C). Per normalizzare i livelli di fosforilazione i filtri sono stati sottoposti a "stripping" e incubati con anticorpi anti AS160 (A), e β -actina (B e C). I dati riportati rappresentano media $\pm$ DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L'analisi statistica è stata effettuata usando il test *t* di Student; (*P < 0.001 e **P < 0.01 vs. basale; # P < 0.02 vs. EXE).

- Completare la valutazione in vitro degli effetti di EXE sul trasporto del glucosio nel muscolo scheletrico utilizzando l'inibitore EXE9-39, con lo scopo di dimostrare che gli effetti osservati dipendono dall'attivazione del recettore GLP1R.

Exendin(9-39) o EXE9-39 è la forma troncata dell'Exendin-4, differisce da EXE per otto aminoacidi nella porzione N-terminale, che apparentemente servono a stabilizzare la struttura secondaria della molecola nativa [22]. EXE 9-39 agisce come antagonista specifico del recettore del GLP-1, e contrasta gli effetti di EXE legando stabilmente il recettore del GLP-1.

Come riportato in figura 1, la capacità di EXE di indurre l'attivazione di TBC1D1 è risultata abrogata dal pretrattamento dei miotubi L6 con la molecola EXE 9-39 (Figura 1B), così come la capacità di EXE di indurre la fosforilazione di AMPK (Figura 1C). I risultati ottenuti sono

sovrapponibili anche le cellule a EXE in cronico (48 h, figura 2). Parallelamente, ho testato la capacità di EXE di regolare la captazione del glucosio dopo stimolo acuto (20') e cronico (48h), in presenza di EXE 9-39 (Figura 2C). Similmente il trattamento con l'antagonista competitivo di GLP1R blocca l'effetto di EXE nella captazione del glucosio, dimostrando che tali effetti, mediati da AMPK, sono specificamente dovuti all'attivazione del recettore del GLP-1, e che il coinvolgimento di TBC1D1 nella mediazione del segnale di AMPK per la traslocazione di GLUT4 sul plasmalemma dipende esclusivamente dallo stimolo con EXE e dall'attivazione del GLP1R.

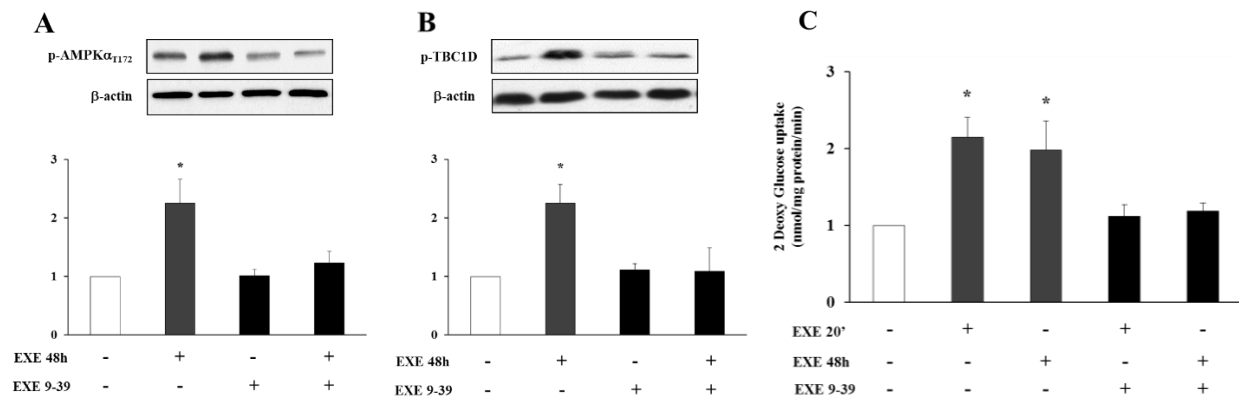


Figura 2. I miotubi L6 sono stati stimolati per 48 ore con EXE 100 nmol/l, per 20 min con EXE 9-39 100 nmol/l, o entrambi. Le cellule sono state lisate e quantità uguali di proteina sono state incubate con anticorpi specifici per p-AMPKα T172 (A), e p-TBC1D1 (B). Per normalizzare i livelli di fosforilazione i filtri sono stati sottoposti a "stripping" e incubati con anticorpi anti β-actina. La captazione del 2DG (C) è stata valutata nelle stesse condizioni sperimentali e dopo stimolo acuto con EXE per 20 min. I dati riportati rappresentano media±DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L'analisi statistica è stata effettuata usando il test *t* di Student; (**P* < 0.001 vs. basale).

• Alla luce degli ultimi risultati sul coinvolgimento di TBC1D1 nel trasporto del glucosio indotto da EXE, abbiamo deciso di valutare gli effetti di quest'ultimo sulla traslocazione del trasportatore di glucosio GLUT4.

La nostra ipotesi era che EXE inducesse un aumento della traslocazione delle riserve di trasportatore del glucosio GLUT4 sulla membrana plasmatica (mediato da TBC1D1), senza alterare i livelli di espressione basali del trasportatore stesso.

In un set di esperimenti precedenti (Relazione borsa di studio FO.DI.RI & MSD 2014, Figura 13) l'esposizione delle cellule L6 a EXE non ha conseguito cambiamenti significativi dei livelli di trascrizione di GLUT4, né dei livelli proteici totali del GLUT4 (Risultati riproposti in figura 3 A e B).

Come riportato in figura 3C i risultati del Western Blot sulle frazioni di membrana dei lisati cellulari hanno mostrato un incremento dell'espressione di GLUT4 sulla membrana citoplasmatica a seguito del trattamento con EXE, sia in acuto che in cronico. Come controllo di caricamento delle proteine di membrana abbiamo selezionato la subunità β del recettore insulinico, la cui espressione nei miotubi L6 non era risultata modulata dal trattamento con EXE in un set di esperimenti precedenti (Relazione borsa di studio FO.DI.RI & MSD 2014, Figura 4, dati non riportati nella presente relazione).

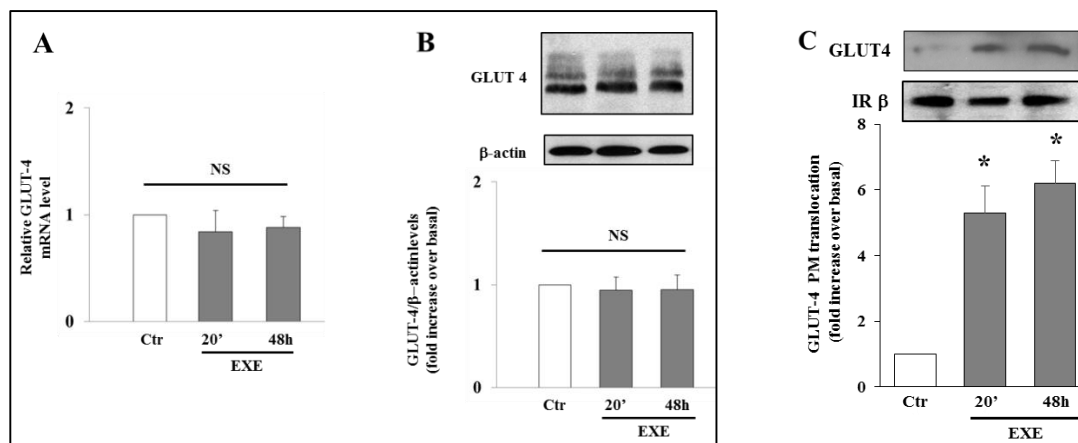


Figura 3. Livelli di espressione di GLUT4 (mRNA e proteine) in miotubi L6 trattati con EXE 100 nmol/l per 20 min o 48 h. Dopo lo stimolo le cellule sono state lisate per estrarre RNA e proteine. Le proteine sono state analizzate con anticorpi specifici per GLUT4. Per normalizzare i risultati, le membrane dei WB sono state sottoposte a “stripping” e re-incubate con anticorpo specifico anti-β-actina o anti-subunità β del recettore insulinico (IR β). 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; NS=nessuna differenza statisticamente significativa).

- *Confermare gli effetti di EXE in animali (ratti) in presenza di condizioni conclamate di diabete, obesità e malattie cardiovascolari.*

Nei miotubi L6 ho potuto verificare che, nonostante gli effetti del GLP-1 sul trasporto del glucosio siano ridotti in condizioni di iperglicemia [12], la captazione di 2DG indotta da EXE non subisce alterazioni in presenza di MGO, il quale riduce la sensibilità insulinica [23].

Affinché questi risultati possano essere considerati traslabili nella clinica, sono necessari ulteriori studi sull’azione delle incretine in animali con condizioni conclamate di diabete, obesità e malattie cardiovascolari.

Per questo progetto ho utilizzato ratti maschi Wistar adulti alimentati con una dieta ad alto contenuto lipidico per indurre obesità e insulino-resistenza (n=6; gruppo OB) e ratti maschi Wistar adulti resi diabetici tramite iniezione intraperitoneale di streptozotocina (STZ) 60mg/kg [24] in buffer citrato freddo (0.5 M, pH 4.5). L’insorgenza del diabete è stata confermata misurando i valori di glicemia 48h dopo l’iniezione di STZ (n=6; gruppo DM). Come controllo sono stati selezionati ratti maschi Wistar adulti (≥ 300 g) trattati solo con l’inoculazione del vettore (n=6; gruppo CTRL).

I ratti allevati presso le strutture di stabulazione dell’Università di Catanzaro, sono alloggiati 3 o 4 per gabbia, in condizioni ambientali strettamente controllate (umidità 60 ± 5%; temperatura 22 ± 2°C; illuminazione a ciclo invertito buio/luce 12/12 h) e possono accedere liberamente a cibo e acqua fino al momento dell’esperimento. Tutte le procedure sono condotte in conformità con le leggi e le pratiche nazionali e internazionali (Direttiva UE 2010/63, linee guida ARRIVE e la dichiarazione di Basilea, incluso il concetto 3R).

Gli animali nei gruppi CTRL, OB e DM, abbinati per età e sesso, sono stati randomizzati per il trattamento con EXE (1 µg/kg/die sottocute) per quattro settimane, per ottenere quindi sei sottogruppi: ratti DM (trattati con EXE o solo vettore), ratti OB (trattati con EXE o solo vettore) e ratti CTRL (trattati con EXE o solo vettore).

Ogni due settimane il peso e la glicemia a digiuno dei ratti sono stati registrati, al termine delle quattro settimane di trattamento con EXE gli animali sono stati sacrificati. Da ciascun esemplare sono stati raccolti campioni di sangue e siero, tessuto muscolare scheletrico, fegato, tessuto adiposo e aorta, immediatamente conservati a -80°C per essere analizzati in seguito secondo le metodologie più appropriate.

Gli estratti proteici ottenuti dal muscolo gastrocnemio prelevato dai 6 gruppi di ratti sono stati utilizzati per confrontare gli effetti del trattamento con EXE sull'espressione e sullo stato di attivazione delle principali molecole coinvolte nel trasporto del glucosio in presenza di obesità e diabete mellito. In particolare abbiamo rilevato che EXE è in grado di indurre l'aumento dell'attivazione di AMPK e TBC1D1 nei gruppi OB e DM, in maniera paragonabile al gruppo di controllo (Figura 4 A e B). La fosforilazione di AKT non è risultata modulata dal trattamento con EXE nel gruppo di controllo, mentre, inaspettatamente, il gruppo DM e ancor più il gruppo OB hanno mostrato un aumento significativo in risposta a EXE (Figura 4 C). Questo risultato inatteso potrebbe dipendere da numerosi fattori, tra cui la durata prolungata del trattamento con EXE (4 settimane) e potrebbe non dipendere specificamente da EXE, ma piuttosto dal miglioramento sistemico della sensibilità insulinica negli animali trattati con EXE; in ogni caso, saranno necessari ulteriori studi per chiarire questo punto.

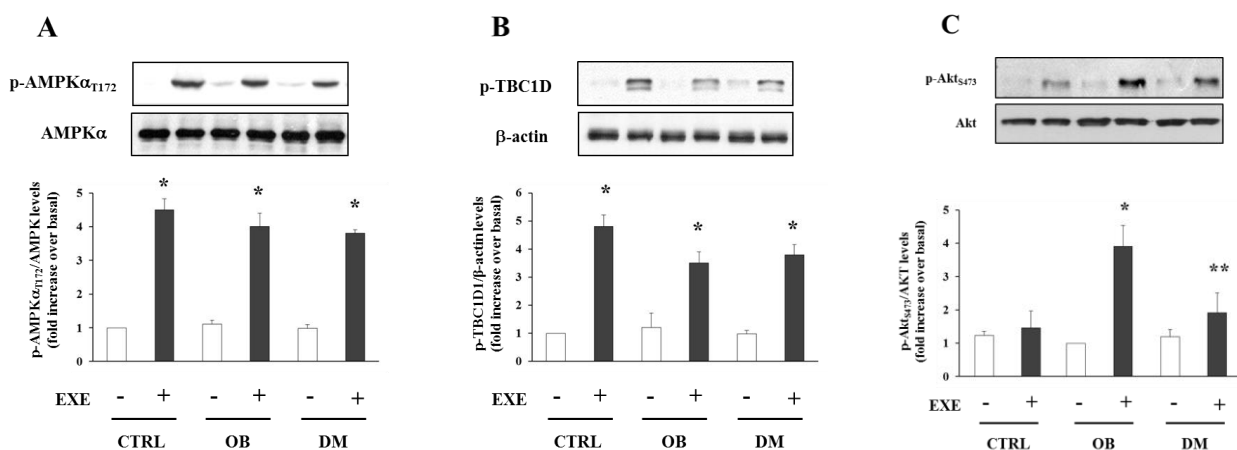


Figura 4. Le biopsie di gastrocnemio dei ratti appartenenti al gruppo di controllo (CTRL), obesi (OB), o resi diabetici con streptozotocina (DB) sono state lisate e quantità uguali di proteina sono state incubate con anticorpi specifici per p-AMPKα T172 (A), p-TBC1D1 (B) e p-Akt S473 (C). Per normalizzare i livelli di fosforilazione i filtri sono stati sottoposti a “stripping” e incubati con anticorpi anti AMPKα, β-actina e Akt rispettivamente. I dati riportati rappresentano media±DS di tre esperimenti indipendenti (n=3). L’analisi statistica è stata effettuata usando il test t di Student; (*P < 0.001 e **P < 0.01 vs. basale).

• *Valutare se gli effetti di EXE su AMPK e GLUT4 sono specifici per EXE o comune a tutta la classe di farmaci incretino-mimetici.*

Recentemente è stato dimostrato che un altro agonista del recettore del GLP-1 (liraglutide – LIRA) aumenta i livelli di cAMP in una linea cellulare di miotubi murini che sovraesprimono il trasportatore GLUT4 (C2C12-GLUT4myc), inducendo rapidamente (30’) la fosforilazione di AMPK e del suo substrato principale ACC, mantenendo tale attivazione fino a 12h. Similmente agli effetti che abbiamo osservato trattando con EXE i miotubi L6, la fosforilazione di AKT e i livelli di trascrizione di GLUT4 sono risultati invariati dopo trattamento con LIRA [22]. Nel contesto dello stesso studio, non è stato possibile distinguere il contributo di TBC1D4/AS160 e TBC1D1 sulla

traslocazione del GLUT4 indotta da LIRA, nonostante gli Autori abbiano dimostrato che entrambe le molecole sono target di AMPK e vengono da esso fosforilate dopo stimolo con LIRA [22].

Abbiamo deciso quindi di approfondire e confrontare in parallelo i meccanismi di trasduzione del segnale di EXE e LIRA nei miotubi L6, con l'intento di rafforzare il significato biologico dei risultati ottenuti con EXE.

Grazie ai risultati ottenuti, riportati in figura 5, possiamo affermare che LIRA non modula la fosforilazione di AKT, sia in acuto che in cronico (20', 48h, figura 5A), e che invece induce la fosforilazione di AMPK α sul sito Thr172 in maniera dose/tempo dipendente (figura 5B), anche in un modello sperimentale differente dalla linea cellulare C2C12-GLUT4myc. Abbiamo altresì osservato un aumento della fosforilazione di TBC1D1 in risposta al trattamento con LIRA (Figura 5 C) e della captazione del 2DG (Figura 5 D), sia in acuto che in cronico, con effetti paragonabili a quelli di EXE e simili all'insulina.

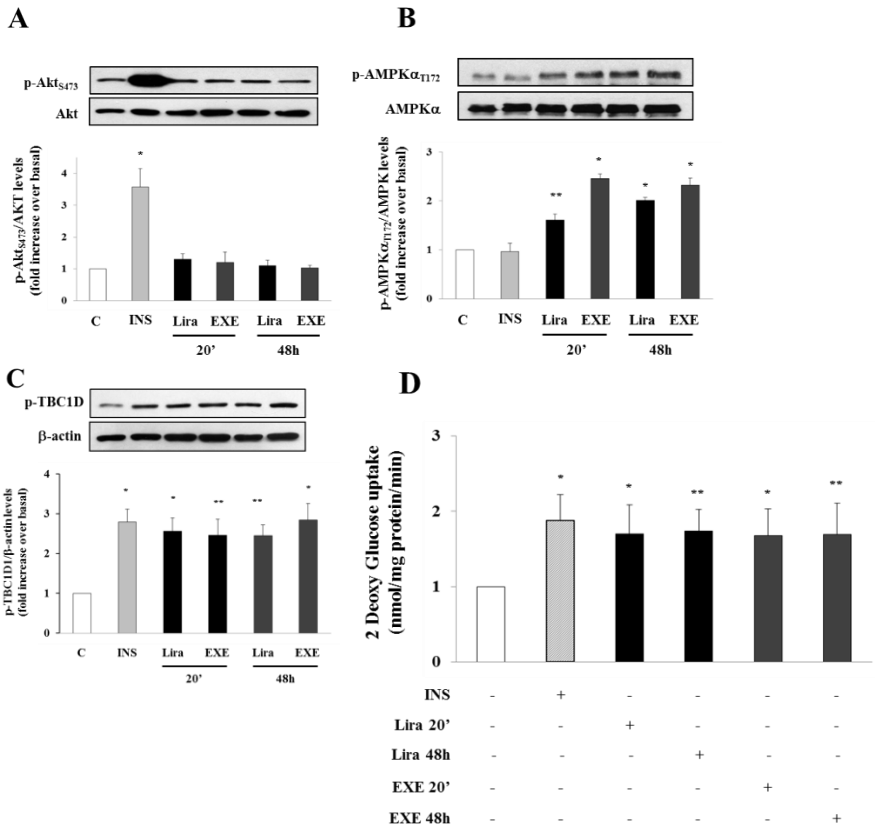


Figura 5. Livelli di espressione di GLUT4 (mRNA e proteine) in miotubi L6 trattati per 20 min con insulina, oppure con 100 nmol/l EXE 100 nmol/l, o con LIRA 100 nmol/l, per 20 min o 48 h. Dopo lo stimolo le cellule sono state lisate per estrarre le proteine, che sono state analizzate con anticorpi specifici per p-Akt S473 (A), p-AMPK α T172 (B), p-TBC1D1 (C). Per normalizzare i risultati, le membrane dei WB sono state sottoposte a “stripping” e re-incubate con anticorpo specifico anti-Akt, AMPK α , o β -actina, rispettivamente. La captazione del 2DG (D) è stata valutata nelle stesse condizioni sperimentali. 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 e ***P* < 0.01 vs. basale).

Bibliografia

1. Komatsu R, Matsuyama T, Namba M, et al. (1989) Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide I-(7–36)-amide. *Diabetes* 38:902-905
2. Dupre J, Behme MT, Hramiak IM, et al. (1995) Glucagon-like peptide I reduces postprandial glycemic excursions in IDDM. *Diabetes* 44:626-630
3. Meneilly GS, McIntosh CH, Pederson RA, et al. (2001) Effect of glucagon-like peptide 1 on non-insulin-mediated glucose uptake in the elderly patient with diabetes. *Diabetes Care* 24:1951-1956
4. Jun LS, Millican RL, Hawkins ED, et al. (2015) Absence of Glucagon and Insulin Action Reveals a Role for the GLP-1 Receptor in Endogenous Glucose Production. *Diabetes* 64:819-827
5. Toft-Nielson M, Madsbad S, Holst JJ (1996) The effect of glucagon-like peptide I (GLP-I) on glucose elimination in healthy subjects depends on the pancreatic glucoregulatory hormones. *Diabetes* 45:552-556
6. Vella A, Shah P, Reed AS, Adkins AS, Basu R, Rizza RA (2002) Lack of effect of exendin-4 and glucagon-like peptide-1-(7,36)-amide on insulin action in non-diabetic humans. *Diabetologia* 45:1410-1415
7. Campbell JE, Drucker DJ (2013) Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab* 17:819-837
8. 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* 87:1282-1290
9. 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* 90:5991-5997
10. 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* 48:1026-1034
11. 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* 150:1155-1164
12. 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
13. Luque MA, González N, Márquez L, et al. (2002) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose metabolism in human myocytes. *J Endocrinol* 173:465-473
14. 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* 15:241-248
15. 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* 63:993-996
16. 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*

17. 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:E643-649
18. Kramer HF, Witczak CA, Taylor EB, Fujii N, Hirshman MF, Goodyear LJ (2006) AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem* 281:31478-31485
19. Kramer HF, Witczak CA, Fujii N, et al. (2006) Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes* 55:2067-2076
20. Treebak JT, Taylor EB, Witczak CA, et al. (2010) Identification of a novel phosphorylation site on TBC1D4 regulated by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C377-C385
21. Chavez JA, Roach WG, Keller SR, Lane WS, Lienhard GE (2008) Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated Protein Kinase activation. *J Biol Chem* 283:9187-9195
22. West GM, Willard FS, Sloop KW, Showalter AD, Pascal BD, Griffin PR (2014) Glucagon-like peptide-1 receptor ligand interactions: structural cross talk between ligands and the extracellular domain. *PLoS One* 9:e105683
23. 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* 54:2941-52
24. Adeghate E (1999) Effect of subcutaneous pancreatic tissue transplants on streptozotocin-induced diabetes in rats. I. Morphological studies on normal, diabetic and transplanted pancreatic tissues. *Tissue Cell* 31:66-72\