



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Implicació de la senyalització dependent de G_{α} en l'establiment de la massa cel·lular β

Berta Serra Navarro



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Medicina

Programa de Doctorat en Biomedicina

**IMPLICACIÓ DE LA SENYALITZACIÓ DEPENDENT
DE $G_{s\alpha}$ EN L'ESTABLIMENT DE LA MASSA
CEL·LULAR β**

Tesi emesa per

Berta Serra Navarro

Tesi dirgida per

Ramon Gomis de Barbarà
(Tutor)

Rosa Gasa Arnaldich

Maig 2018

Aquesta tesi s'ha realitzat al laboratori de Diabetis i Obesitat de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)



“Never stop fighting until you arrive at your destined place - that is, the unique you.
Have an aim in life, continuously acquire knowledge, work hard,
and have perseverance to realize the great life.”

A. P. J. Abdul Kalam

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
Diabetis Mellitus	3
La massa cel·lular β pancreàtica	6
El pàncrees	6
Pàncrees exocrí: acins i ductes	6
Pàncrees endocrí: illots de Langerhans	7
Control de l'homeòstasi de la glucosa	8
La cèl·lula β	10
Establiment de la massa cel·lular β funcional durant la vida de l'organisme	13
Vies intracel·lulars que regulen la proliferació de la cèl·lula β	18
El segon missatger intracel·lular : AMPc	22
La senyalització via GPCR-Gs	22
La via Igf1/Insulina	29
Components de la via Igf/Insulina	29
Conseqüències biològiques de la senyalització Igf1/Insulina	33
La via Igf1/Insulina en la regulació de la massa cel·lular β	34
Connexió entre l'AMPc i la via de Igf1/Insulina	38
OBJECTIUS	41
MATERIALS I MÈTODES	45
Animals	47
Extracció i obtenció de fluids i teixits	49
Tests metabòlics	50
Immunohistoquímica	51
Illots pancreàtics	55
Assaig de proliferació BrdU	56
Assaig de secreció d'insulina <i>in vitro</i>	56
Mesura dels nivells d'AMPc en illots isolats	58
Anàlisi de l'expressió gènica	59
Western blot	63
Anàlisis estadístics	68

RESULTATS	69
Model murí gen anul·lat per la subunitat Gsα específic de cèl·lula β	71
Generació i comprovació del model animal.....	71
Caracterització fenotípica del model murí β-Gsα KO	73
Caracterització del metabolisme de la glucosa en el model β -Gs α KO.....	73
Caracterització del compartiment β-pancreàtic en el model β-Gsα KO	75
Anàlisi de la funció insulino–secretora del model β -Gs α KO	75
Anàlisi morfològic del pàncrees endocrí en animals β -Gs α KO	76
Estudi de la proliferació i mort de les cèl·lules β en animals β -Gs α KO	78
Identificació de les alteracions moleculars en els illots postnatsals β-Gsα KO	81
Nivells d'AMPc	81
Expressió de components de la via Gs-cAMP en illots murins	82
Estudi de la via de senyalització de igf1/insulina en la cèl·lula β	89
Regulació de la proliferació en resposta a insulina	89
Caracterització de la via Igf1/Insulina en illots β -Gs α KO	90
Mediadors intracel·lulars de la via Igf1/Insulina en illots β -Gs α KO	94
Activació aguda de la via de l'insulina	96
Regulació de l'expressió gènica d'illots en resposta a insulina i AMPc	98
DISCUSSIÓ	101
RESUM	109
CONCLUSIONS	113
BIBLIOGRAFIA	117
ABREVIATURES	133

INTRODUCCIÓ

DIABETIS MELLITUS

La diabetis mellitus (DM) és una síndrome heterogènia que presenta com a principal característica uns nivells de glucosa en sang elevats o hiperglucèmia. Sota el terme diabetis s'inclouen un grup de patologies que es desencadenen com a conseqüència de defectes en la secreció d'insulina, en la resistència a la seva acció o bé per ambdues causes, donant com a resultat uns nivells de glucosa en sang anormalment elevats acompanyat de l'alteració del metabolisme dels hidrats de carboni, dels greixos i de les proteïnes. L'etiologia subjacent de les formes més freqüents, la diabetis tipus 2 (DM2) i la de tipus 1 (DM1) segueix sent poc coneguda. La primera referència històrica de la malaltia es troba en l'anomenat Papir d'Ebers, un dels tractats mèdics més antics que es coneixen. Aquest document, va ser redactat en l'antic Egipte l'any 1550 aC i s'hi descriu amb precisió un quadre clínic que avui en dia anomenem diabetis, terme utilitzat per primera vegada pels grecs el segle I dC i que fa referència a la contínua pèrdua d'orina (poliúria) que caracteritza aquesta patologia. Més endavant, en el segle XVI es va afegir al terme diabetis l'adjectiu mellitus, provinent de la paraula mel que assenyalava dolçor, deguda a l'alt contingut en glucosa en l'orina d'aquests pacients.

La DM2 és el tipus més freqüent i sol aparèixer en edats tardanes. És una malaltia multifactorial causada tan per factors poligènics com ambientals¹. Aquesta patologia es caracteritza principalment per l'aparició de resistència a la insulina en els teixits perifèrics i per l'alteració de la funcionalitat de la cèl·lula β . La resistència a la insulina es troba molt relacionada amb un augment de l'índex de massa corporal (IMC), encara que no tots els individus amb sobrepès o obesos presenten anormalitats metabòliques. Per tal de fer front a l'augment de la demanda d'insulina, la cèl·lula β porta a terme un procés de compensació en els pacients que tenen sobrepès o obesitat que han desenvolupat resistència a la insulina². Encara que el mecanisme pel qual la cèl·lula β porta a terme aquesta compensació no està ben elucidat, tan l'augment en la capacitat secretora de insulina com l'expansió de la massa cel·lular β contribueixen en aquest fenomen. La DM2 s'inicia quan aquesta compensació no és suficient per mantenir uns nivells de glucosa dintre del rang normal o bé quan les cèl·lules β es troben exposades durant un llarg període de temps a factors tòxics i estrès metabòlic portant a la disfunció d'aquestes cèl·lules i la seva mort.

Estudis GWAS (*genome-wide association studies*) han pogut identificar més de 70 variants fortament associades a la DM2 però amb efecte moderat ja que només poden explicar aproximadament el 20% del risc genètic de patir la malaltia. No obstant, la DM2 té un component genètic important, per aquets motiu hi ha moltes investigacions que es dediquen a estudiar variants genètiques rares o poc comuns amb efectes importants. Els factors ambientals més relacionats amb la DM2 són també aquells factors responsables de l'epidèmia mundial d'obesitat actual. El desequilibri energètic conseqüència de la ingesta excessiva d'àcids grassos saturats i sucres simples i la baixa despesa energètica associada a una activitat física reduïda i un estil de vida sedentari. Altres factors que no influeixen sobre l'IMC, els agents ambientals també s'han relacionat amb la DM2 com els contaminants i els disruptors endocrins, la falta de son, canvis en la composició del microbioma, la nutrició maternal i alteracions en el creixement fetal.

Per altra banda, la DM1 s'inicia per un atac autoimmune que destrueix les cèl·lules β resultant en un dèficit en els nivells d'insulina i una hiperglucèmia³. Semblant a la DM2, la DM1 és una malaltia multifactorial influenciada per factors genètics i ambientals⁴. La concordança de DM1 entre bessons monozigòtics es troba inversament correlacionada amb l'edat de diagnòstic, indicant que la causa genètica predomina en l'aparició primerenca de la DM1, mentre que els factors ambientals guanyen importància en l'aparició tardana de la malaltia. El fet que la incidència de DM1 hagi anat augmentant durant els últims deu anys i que la prevalença augmenti en immigrants en comparació amb la seva població d'origen, també indica un paper rellevant dels factors ambientals. Les infeccions virals són el

factor ambiental més ben estudiat i caracteritzat en l'etiologia de la DM1, no obstant, no representen la única causa de l'augment en la incidència de DM1. També s'ha estudiat la influència d'altres factors ambientals⁵ com les alteracions en la composició del microbioma que podria augmentar l'exposició a antígens microbians degut a l'alteració de la immunitat de la mucosa i també s'ha relacionat amb la DM1.

Existeixen altres tipus de diabetis:

- La diabetis monogènica que resulta de mutacions en un sol gen i que inclou la diabetis mellitus Neonatal (NDM) i la diabetis en la joventut (MODY).
- Diabetis autoimmune latent en adults (LADA). Una variant autoimmune que apareix a l'etapa adulta i que en un inici no requereix tractament amb insulina.
- Diabetis gestacional la qual es desenvolupa durant l'embaràs degut a l'augment en la demanda d'insulina que no es pot compensar. Normalment desapareix en el moment del naixement, tot i que el risc de patir D2M en la mare més endavant serà més elevat.

La diabetis és un problema mundial molt important tant per la seva prevalença i incidència com per les complicacions cròniques que desenvolupen els pacients. S'estima que 422 milions de persones adultes pateixen diabetis, el que significa un 8,5% de la població mundial majors de 18 anys. La prevalença de la patologia s'ha doblat en només 35 anys i estudis recents demostren que continuarà augmentant. La majoria dels casos estan associats a la DM2 com a conseqüència de l'obesitat i la manca d'activitat física, mentre que només un 5-10% es tracta de casos de D1M⁶. Aquesta malaltia suposa una despesa econòmica molt important per l'economia del sistema global de sanitat ja que és causa del 1,5 milions de morts/any sent el 45% dels pacients menors de 70 anys després d'haver desenvolupat complicacions secundàries com la ceguesa, problemes cardíacs i amputacions de les extremitats inferiors. Hi ha estudis que demostren que les despeses mèdiques orientades a prevenir i tractar la diabetis amb les seves complicacions superen els 800 bilions de US\$ anuals⁷.

Els esforços dedicats a reduir la incidència d'aquesta malaltia per tal de disminuir l'impacte que produeix en el camp de la salut i l'economia s'han convertit en els últims anys en un interès global. Actualment s'estan impulsant un gran nombre de mesures preventives, d'educació nutricional i estil de vida per tal d'evitar el creixement exponencial en el nombre de casos. En aquest context, els projectes de recerca dedicats al descobriment de noves vies de tractament i curació seran de gran rellevància per tal de reduir la incidència així com la morbiditat i mortalitat associades a aquesta patologia.

Estratègies terapèutiques pel tractament de la diabetis

S'han proposat diverses estratègies encaminades a restituir la massa cel·lular β en la diabetis resumides a continuació:

- Inducció de la regeneració endògena a través de la formació de noves cèl·lules β a partir de cèl·lules que no expressen insulina ja sigui per la conversió d'un tipus cel·lular diferenciat (transdiferenciació) o bé per la diferenciació de progenitors (neogènesi). La presència de progenitors facultatius en el pàncrees postnatal no està universalment acceptat, mentre que el concepte de plasticitat potencial dels diferents tipus cel·lulars del pàncrees és un concepte més reconegut en la comunitat científica. Tot i així, els principals dubtes que sorgeixen en aquest camp són: Quins són els principals tipus cel·lulars involucrats? Quins factors porten a terme el procés? Com es poden traslladar els coneixements als humans? Els principals tipus cel·lulars suggerits com a possible font cel·lular de noves cèl·lules β són les cèl·lules ductals, les cèl·lules centroacinaris (CACs), les cèl·lules acinaris, i les cèl·lules α les quals expressen glucagó i les

cèl·lules δ que expressen somatostatina. Publicacions recents que seqüencien l'RNA de cèl·lules individuals humanes d'illots mostren una elevada heterogeneïtat entre un sol tipus cel·lular, l'anomenada variabilitat intracel·lular. Aquest fet suggereix que només alguns dels fenotips cel·lulars presentaran la plasticitat potencial per esdevenir un tipus cel·lular determinat^{8,9}.

- Substitució de les cèl·lules β perdudes a través del transplantament d'illots provinents de donants cadavèrics o bé de cèl·lules β derivades de cèl·lules mare embrionàries o induïdes pluripotents humanes.
- Promoció de la supervivència de les cèl·lules β .
- Restitució de la massa cel·lular β endògena mitjançant la inducció de la replicació de les cèl·lules β romanents.

Aquesta darrera estratègia podria esdevenir la manera més directa i efectiva d'augmentar la massa cel·lular β , no obstant, en illots humans aquesta aproximació ha sigut complicada. Al llarg dels anys s'ha posat molt en dubte si les cèl·lules β humanes realment podien proliferar i no va ser fins el 2001 quan Tyrberg et al. va demostrar que illots humans adults incorporaven timidina marcada quan es trasplantaven en ratolins i aquesta incorporació es veia augmentada en resposta a un estat de hiperglucèmia¹⁰. Entre els principals objectius plantejats en aquest tema, hi ha la comprensió dels mecanismes que determinen la baixada en proliferació de la cèl·lula β relacionada amb l'edat i el disseny d'estratègies per potenciar la proliferació de la cèl·lula β en models de rosegadors i en humans (Taula 1).

En ratolins, la majoria d'estudis que han sigut efectius en l'increment de la proliferació es basen en estratègies de guany o pèrdua de funció de diverses molècules de cicle cel·lular. Per exemple, l'animal deficient pel regulador nuclear de la quinasa dependent de la ciclina D2 demostra que aquest component és necessari per la transició de les cèl·lules β a un estat replicatiu¹¹. Per altra banda, l'acumulació de p16Ink4a en les cèl·lules β també ha demostrat ser un indicador de senescència (cèl·lules arrestades en el cicle cel·lular) de les cèl·lules β ¹². Aquestes cèl·lules senescents secreten una gran quantitat de citoquines i quimoquines que poden alterar la proliferació de les cèl·lules veïnes¹³. No obstant, publicacions del laboratori de Dor Y. et al donen suport al concepte que el metabolisme de la glucosa és més rellevant que els components de cicle cel·lular en la regulació de la proliferació de la cèl·lula β ¹⁴. També s'ha demostrat que el metabolisme de la glucosa o flux glucolític és el principal regulador del creixement β , sent la glucoquinasa (Gck) la diana principal en la inducció de la proliferació de la cèl·lula β ¹⁴. No obstant, el trasllat d'aquests estudis a les cèl·lules humanes és complicat ja que existeixen un gran nombre de diferències, sobretot en les proteïnes de cicle cel·lular entre els illots d'humans i rosegadors.

Estratègies per induir la replicació de cèl·lula β			
Mecanisme	Rosegadors	Humans	Referències
KO ciclina A2	Efectiu	No aplicable	Georgia et al. (2010)
Augment Ezh2	Efectiu	No aplicable	Zhou et al. (2013)
Mort de cèl·lules senescents (teràpies senolítiques)	Per determinar	Per determinar	Palmer et al. (2015)
Flux glucolític i activador de GK	Efectiu	Comporta dany en el DNA, atura creixement i promou apoptosi	Salpeter et al. (2010,2011,2013); Porat et al. (2011) Tomovsky-Babeay et al. (2014)
Inhibidors de cinasa d'adenosina	Efectiu	No efectiu	Annes et al. (2016)
Silenciar inhibidors de cicle	Per determinar	Efectiu	Robitaille et al. (2016)
Harmina	Efectiu	Efectiu (també indueix proliferació cèl·lula α)	Wang et al. (2015,2016)
SerpinaB1	Efectiu	Efectiu	El Ouamari et al. (2016)

Taula 1. Taula mostrant les estratègies principals orientades a induir la replicació de la cèl·lula β pancreàtica. Taula modificada de Bonner-Weir et al¹⁵.

LA MASSA CEL·LULAR β PANCREÀTICA

El pàncrees

El pàncrees és un òrgan d'origen endodèrmic que es troba a la curvatura de l'estómac. Anatòmicament es divideix en tres regions principals: el cap, el qual es troba adjacent al duodè, el cos, que és la part central situada sota la curvatura de l'estómac, i finalment la cua, la part més pròxima a la melsa (Fig. 1). Les dues funcions principals d'aquest òrgan són:

- La producció i secreció exocrina d'enzims digestius que són alliberats al duodè a través del colèdoc per les cèl·lules acinars del pàncrees.
- La producció i secreció d'hormones endocrines que són alliberades a la circulació pels illots pancreàtics.

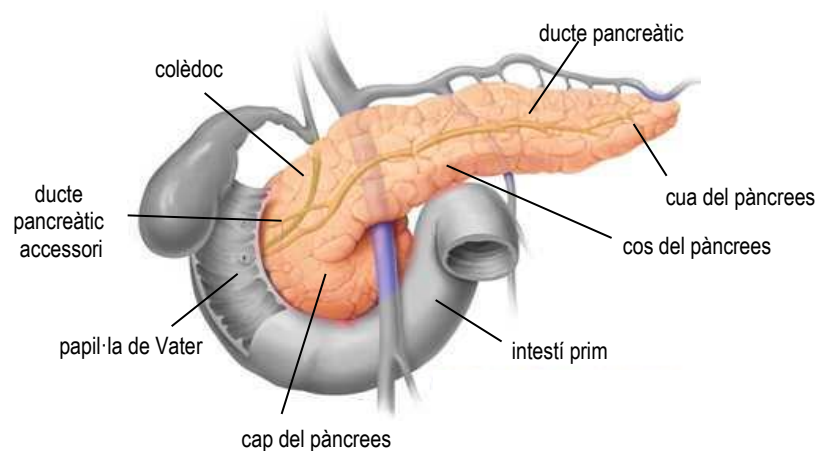


Figura 1. Representació esquemàtica de l'anatomia del pàncrees humà. Imatge modificada de *medicina y prevención*.

La formació del pàncrees s'inicia durant el desenvolupament embrionari. La morfogènesi pancreàtica es fa evident quan dos primordis, un dorsal i un ventral, es fan visibles a la zona de l'endoderm de l'intestí primitiu que donarà lloc al duodè. En el ratolí això es dona al voltant del dia embrionari 9.5. En humans, entre el primer i segon mes de gestació. Durant el desenvolupament es dona el creixement i la ramificació dels dos primordis pancreàtics els quals pateixen una reorientació i es fusionen formant un únic òrgan bipolar. El primordi pancreàtic ventral, amb íntima relació amb el colèdoc, formarà la part posterior del cap del pàncrees i el primordi dorsal donarà lloc a la cua i el cos de l'òrgan.

Pàncrees exocrí: acins i ductes

El pàncrees exocrí constitueix el 85% de tota la massa pancreàtica i està format per cèl·lules acinars i cèl·lules ductals (Fig. 2). Les cèl·lules acinars amb forma piramidal i el nucli en posició basal, es troben agrupades formant els acins. En el citoplasma d'aquestes cèl·lules, hi destaca la presència de grànuls secretors que contenen enzims digestius com proteases, amilases, lipases i nucleases, entre d'altres. La majoria dels proenzims són secretats en el duodè on esdevindran actius i participaran en el procés de digestió. La llum dels acins, on s'alliberen les secrecions de les cèl·lules exocrines, desemboca a uns conductes anomenats ductes pancreàtics, els quals aboquen el seu contingut al duodè a través del colèdoc. Les petites cèl·lules centroacinars que es troben en la unió acins-ducte tenen forma cuboïdal. Els ductes estan formats per cèl·lules epitelials columnars, tot i que en els ductes més grans també existeix

un petit nombre de cèl·lules calciformes semblants a les existents a l'intestí. La funció principal del sistema de ductes pancreàtics és secretar grans quantitats d'aigua amb un alt contingut de bicarbonat sòdic (NaHCO_3) per tal de neutralitzar l'acidesa de l'estómac¹⁶.

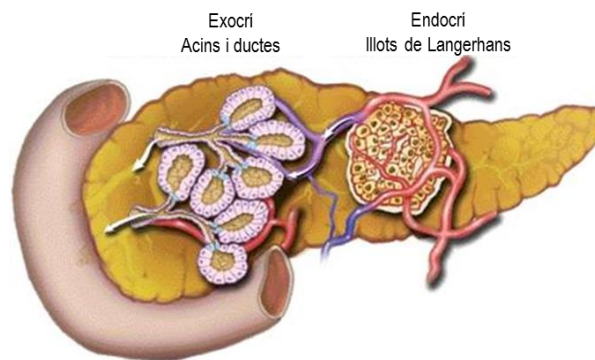


Figura 2. Il·lustració que mostra l'arquitectura dels dos compartiments principals del pàncrees: exocrí i endocrí. Imatge de *The exocrine pancreas* Pandol SH et al. 2010¹⁶.

Pàncrees endocrí: illots de Langerhans

El pàncrees endocrí té un paper fonamental en el metabolisme ja que secreta diferents hormones a la vena pancreàtica-duodenal la qual drena a la vena porta, i permet el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa. Les cèl·lules endocrines s'organitzen en agrupacions microscòpiques anomenades illots pancreàtics. Aquests van ser identificats per primera vegada per Paul Langerhans l'any 1869, raó per la qual 24 anys més tard van rebre el nom d'illots de Langerhans. Tot i així, el significat funcional d'aquestes agrupacions no es van reconèixer fins l'any 1889, quan von Mering i Minkowski van descobrir que l'extirpació del pàncrees provocava nivells elevats de glucosa en sang o hiperglucèmia. Els illots es distribueixen aleatòriament pel teixit exocrí, tot i que se n'observen en major densitat en la part de la cua del pàncrees. En mamífers adults, representen entre un 1-2% de la massa pancreàtica total. Més d'un 90% de les cèl·lules endocrines formen part dels illots, però sobretot en humans, també es detecta una petita proporció de cèl·lules individuals o que formen part de petites agrupacions situats entre el teixit exocrí o adjacents als ductes pancreàtics¹⁷. Les hormones produïdes en els illots pancreàtics regulen els nivells de glucosa en sang i són secretades directament al torrent sanguini pels diferents tipus cel·lulars.

Existeixen cinc tipus principals de cèl·lules endocrines: les cèl·lules β que secreten insulina i en menor grau amilina conformen la major part de l'illot, entre un 70 i un 80% del volum cel·lular. Les cèl·lules α , secreten glucagó, les cèl·lules δ , secreten somatostatina, les cèl·lules PP secreten el polipèptid pancreàtic i finalment, una cinquena població cel·lular endocrina anomenada cèl·lula èpsilon, que produeix ghrelina, una hormona principalment secretada en l'etapa embrionària^{18,19}. L'arquitectura i la distribució de les cèl·lules de l'illot són molt divergents entre les diferents espècies²⁰. En rosegadors hi ha un nucli de cèl·lules β rodejades d'un mantell discontinu dels altres tipus cel·lulars, especialment de cèl·lules α . Els illots de la majoria d'espècies de mamífers adopten aquest patró, tot i que en humans i altres primats, la distribució és més dispersa i desorganitzada amb les cèl·lules β i α disposades de manera irregular en l'illot (Fig. 3).

Implicació de la senyalització dependent de Gsa en l'establiment de la massa cel·lular β

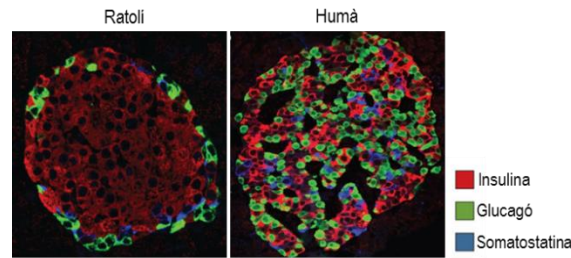


Figura 3. Imatges representatives d'immunofluorescència d'un illot de ratolí i un illot humà amb tinció d'insulina (vermell), glucagó (verd) i somatostatina (blau) per tal de diferenciar els tres tipus principals cel·lulars. Imatge modificada de *Nature Reviews Endocrinology*²¹.

Totes les cèl·lules endocrines de l'illot es formen a partir d'un progenitor endocrí, el qual s'especifica a partir d'un progenitor pancreàtic d'origen endodèrmic, que és a la vegada precursor de les cèl·lules acinars i ductals del pàncrees. El procés de diferenciació cel·lular és complex i hi intervenen tant senyals extracel·lulars, que poden ser inductives com permissives, i factors de transcripció específics de llinatge encarregats de promoure els perfils d'expressió gènica necessaris en les diferents etapes del programa de diferenciació (Fig. 4). Durant l'etapa postnatal primerenca (període de lactància en el ratolí) les cèl·lules β generades durant l'etapa embrionària maduren funcionalment, adquirint la capacitat de secretar insulina en resposta a glucosa.

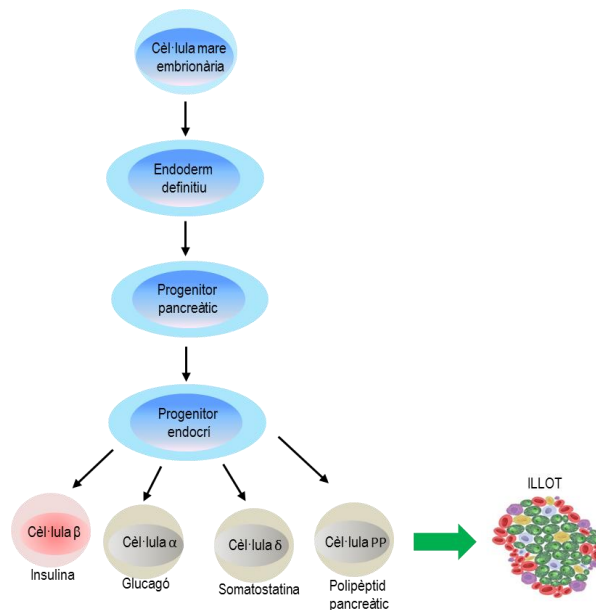


Figura 4. Representació esquemàtica de la formació dels cinc tipus de cèl·lules endocrines. A partir de la cèl·lula mare embrionària es genera l'endoderm definitiu el qual esdevindrà la major font de progenitors pancreàtics per donar lloc a progenitors endocrins que es diferenciaran en els diferents tipus cel·lulars presents a l'illot pancreàtic.

Control de l'homeòstasi de la glucosa

La regulació dels nivells de glucosa en sang, i en últim terme de l'equilibri energètic, es realitza mitjançant la secreció coordinada de les dues hormones gluco-reguladores principals: la insulina i el glucagó. La funció principal de la insulina i les hormones contra-reguladores a l'organisme és el manteniment de la normoglicèmia. La concentració de glucosa en la circulació sanguínia està controlada de forma molt més

fin a que la de qualsevol altre element energètic mantenint-se entre 4 i 7mM (70-120 mg/dl) en una persona sana. Qualsevol alteració en la funcionalitat de les cèl·lules β , del fetge, del múscul o del teixit adipós pot desencadenar trastorns en l'homeòstasi de la glucosa i portar a estats patològics de l'organisme.

La insulina és la hormona anabòlica principal a l'organisme. Durant el període postprandial es donen tres processos que de forma sinèrgica garanteixen el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa. En primer lloc, es dona l'estimulació de la producció i secreció d'insulina per les cèl·lules β pancreàtiques. En segon lloc, els principals teixits perifèrics com són el fetge, el múscul esquelètic i el teixit adipós, capten aquesta glucosa per l'increment dels nivells d'insulina en sang. I per últim, es redueix la producció hepàtica de glucosa com a resultat de la inhibició de la secreció de glucagó. En dejú, l'augment del glucagó i altres factors hormonals i nerviosos mantenen els nivells de glucosa incrementant la producció hepàtica de glucosa per estimulació de la gluconeogènesi i glicogenòlisi. La insulina també promou la síntesi de glicogen, té efectes sobre el metabolisme lipídic, la síntesi de proteïnes i la proliferació cel·lular. A nivell molecular, la insulina per tal de portar a terme la seva funció s'uneix al receptor present a la membrana de les cèl·lules dels teixits diana. Aquest receptor està constituït per dominis amb activitat tirosina quinasa i s'inicia una cascada de senyalització a través de la fosforilació dels seus principals substrats, Irs1 (substrat del receptor de la insulina 1) i Irs2 (substrat del receptor de la insulina 2) (explicació detallada en la secció *La via d'Igf/Insulina*). El transport de glucosa a l'interior de les cèl·lules es realitza per la translocació intracel·lular de les vesícules que contenen el transportador de glucosa Glut cap a la membrana cel·lular.

El glucagó és una hormona catabòlica formada per 29 aminoàcids i secretada per les cèl·lules α en estats d'hipoglucèmia. Aquesta hormona contraresta les accions de la insulina mantenint els nivells de glucosa en sang en períodes de dejú a través de l'estimulació de la producció hepàtica de glucosa (gluconeogènesi). El metabolisme lipídic dels adipòcits i hepatòcits també és regulat pel glucagó. Per altra banda, la somatostatina és alliberada per les cèl·lules δ del pàncrees després de la ingesta d'aliments i regula negativament la secreció d'insulina i glucagó, actuant com a modulador potent en la secreció d'hormones. La vida mitjana d'aquesta hormona és menys d'un minut, i les seves funcions en l'illot són principalment paracrines. A banda de les hormones secretades per les cèl·lules dels illots pancreàtics n'hi ha d'altres que també regulen l'homeòstasi de la glucosa. Les hormones incretines, el pèptid similar al glucagó (Glp1) i el polipèptid inhibidor gàstric (Gip), són alliberades per les cèl·lules intestinals i augmenten la resposta secretora d'insulina postprandial. A més, el Glp1 inhibeix la secreció de glucagó²². No obstant, tenen vides mitges molt curtes i per aquest motiu s'han desenvolupat fàrmacs que inhibeixen la seva ràpida degradació. Curiosament, el paradigma acceptat sobre les incretines derivades de l'intestí com a responsables de l'augment en la secreció d'insulina està actualment en controvèrsia ja que estudis recents han demostrat que Glp1 és produïda per les cèl·lules α de l'illot regulant aquest mecanisme²³⁻²⁵. Aquests estudis remarquen la importància de les accions paracrines del Glp1 provinent de les cèl·lules α en comparació a les accions endocrines de les incretines derivades de les cèl·lules intestinals i suggereix continuar investigant sobre les funcions i origen d'aquesta hormona.

Per altra banda, les catecolamines s'alliberen en situacions d'hiperglucèmia o estrès i actuen com a hormona (epinefrina) o com a neurotransmissors (norepinefrina). Exerceixen efectes similars als del glucagó en el fetge i són reguladores fonamentals de la lipòlisi en el teixit adipós i de la glicogenòlisi en el múscul i en altres teixits²⁶. També hi ha el cortisol, una hormona esteroide de la família dels glucocorticoides que és secretada en resposta a l'estrès i nivells baixos de glucosa. Augmenta els nivells de glucosa en sang a través d'un mecanisme anabòlic en el fetge i un efecte catabòlic en el múscul i el teixit adipós. En el mateix sentit, el cortisol bloqueja la captació de glucosa en la musculatura esquelètica i en el teixit adipós evitant la translocació del transportador Glut4 induïda per glucosa²⁷. Finalment, la

hormona peptídica del creixement (GH) és secretada per l'adenohipòfisi i promou el creixement i la proliferació de diferents tipus cel·lulars. També actua com a hormona contra-reguladora de la glucosa. GH augmenta molt els nivells de gluconeogènesi en el fetge i en el ronyó i també mostra efectes diabotegènics. Aquesta hormona induïx la resistència a la insulina a través de l'augment en la regulació de p85, un inhibidor de PI3K, resultant en una translocació a la membrana cel·lular del transportador Glut4²⁸.

La cèl·lula β

El gen de la insulina

El gen de la insulina humana codifica per un sol transcrit *INS* que es troba situat en la regió p15.5 del cromosoma 11 i està constituït per 3 exons i 2 introns. Mentre que en el cas dels rosegadors són dos gens que codifiquen per les insulines 1 i 2 (*Ins1* i *Ins2*) que en ratolins se situen en el cromosoma 1 i 7, respectivament²⁹. El promotor del gen de la insulina presenta llocs d'unió per diversos factors de transcripció els quals són imprescindibles per l'expressió del gen i que condicionen el grau de diferenciació de la cèl·lula β (Fig. 5).

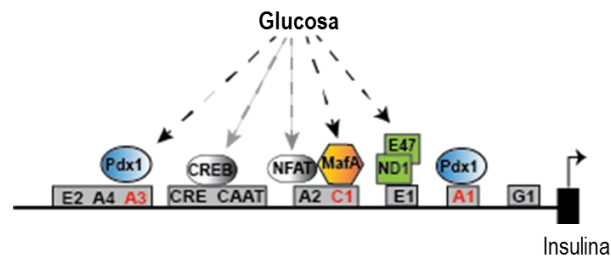


Figura 5. Representació esquemàtica del promotor proximal de la insulina representant els elements cis conservats i els factors d'unió. Els elements coneguts que responen a glucosa estan marcats en vermell. Pdx1 s'uneix a les caixes A, l'heterodímer NeuroD1/E47 (ND1) s'uneix a les caixes E i el MafA s'uneix a l'element C1 a 400bp de la zona d'inici de la transcripció (fletxa). A més d'aquestes proteïnes específiques de cèl·lula β , el promotor proximal conté motius conservats on s'hi uneixen factors ubíqus com Creb o NFAT. La glucosa controla la transcripció del gen de la *insulina* regulant aquests factors a diferents nivells incloent la seva expressió, la sub-localització cel·lular, la unió a l'ADN, les propietats transcripcionals i les interaccions amb cofactors.

El factor de transcripció homeodomini Pdx1 s'expressa majoritàriament per les cèl·lules β i és un transactivador clau no només del gen de la *insulina* sinó també d'altres gens de cèl·lula β com són *Slc2a2* o *Glut2*, *Gck* o *Iapp*³⁰. Pdx1 s'uneix a la seqüència TAAT de les caixes proximals A del promotor de la *insulina*. D'aquestes caixes, l'A3 es considera l'element sensible a glucosa tan en illots humans com en els de ratolí. Curiosament, la sobreexpressió de Pdx1 en cèl·lules productores de insulina deficientes pel factor de transcripció, fa recuperar la seva capacitat per regular els nivells de mRNA de la insulina en resposta a glucosa³¹. La fosforilació de Pdx1 s'ha associat en la modulació de diferents aspectes en la seva activitat incloent la unió a l'ADN, transactivacions i interaccions amb cofactors transcripcionals^{32,33}. Diferents vies de senyalització s'han implicat en la fosforilació de Pdx1 incloent p38/SAPK, la quinasa glicogen sintasa 3 (Gsk3), Erk1/2 o Hipk2.

Per altra banda, el factor bàsic hèlix-loop-helix (bHLH) NeuroD1/Beta2 s'expressa en les cèl·lules pancreàtiques i neuroendocrines i és un regulador molt rellevant del gen de la *insulina* o *ins*. NeuroD1/Beta2 forma heterodímers unint-se a les caixes E que contenen seqüències CANNTG en el promotor proximal de la *insulina*. El gen *Ins1* conté dues caixes E mentre que el *Ins2* i el *INS* humà només n'hi ha una (E1)³⁴. De la mateixa manera que en el cas de Pdx1, els efectes de la glucosa en la

translocació nuclear i en la capacitat transcripcional de NeuroD1 només han sigut demostrats en línies cel·lulars. Erk1/2 s'ha associat com a possible mediador dels efectes de la glucosa en l'activitat transactivadora de NeuroD1 i la formació dels dímers^{35,36}.

No va ser fins el 2002 que el factor de transcripció Mafa, membre de la família de les proteïnes de leucina zipper, es va identificar com el factor de transcripció que s'unia a l'element RIPE3b/C1 del promotor de la *Ins*^{37,38}. Des d'aleshores, s'han realitzat estudis encaminats a demostrar el paper essencial d'aquest factor en la regulació de l'expressió del gen de la *insulina* així com en la secreció de insulina estimulada per glucosa en les cèl·lules β ^{39,40}. S'ha demostrat que els nivells proteics i gènics de Mafa són regulats positivament per concentracions elevades de glucosa en cèl·lules cultivades⁴¹. El metabolisme de la glucosa i el calci s'han implicat en el control dels nivells d'expressió de Mafa en línies cel·lulars β ³³ tot i que *in vivo* encara no s'ha demostrat. L'expressió i activació de Mafa també és controlada per múltiples fosforilacions per diferents quinases incloent Gsk3, CaMK, p38 o Erk1/2^{41,42}. La fosforilació per Gsk3 és necessària per la degradació en els proteosomes de Mafa⁴³, la qual es suggereix que permet la inhibició ràpida de la transcripció de la insulina en condicions de baixa glucosa, no obstant, els estudis realitzats continuen sent *in vitro*. Per altra banda, també queda pendent d'elucidar si l'expressió de Mafa i la seva unió a l'ADN es dona prèviament a l'activació transcripcional del gen de la *insulina* en resposta a glucosa o bé posteriorment.

Els tres factors específics de cèl·lula β mencionats anteriorment, interactuen amb proteïnes addicionals incloent p300, NFAT, CCAAT/proteïna potenciadora d'unió beta (C/EBP-b), c-Jun i elements de resposta a l'AMPc Creb/CREM, els quals també tenen un impacte en la regulació de la transcripció negativa o positiva del gen de la *insulina*. Per tant, és concebible que l'activació efectiva del gen de la *insulina* depengui de interaccions cooperatives entre proteïnes específiques de cèl·lula β i les diferents proteïnes ubiques. Com a exemple, Mafa ha sigut identificat com a *partner* de les proteïnes NFATc en el promotor de la insulina^{44,45}. Per tant, la especificitat de l'expressió de Mafa podria aportar un mecanisme únic a través del qual la gran família de proteïnes NFATc podrien regular l'expressió de la insulina i d'altres gens rellevants de cèl·lula β , així com la seva regulació a través de diferents estímuls metabòlics.

Aleshores, la regulació transcripcional de la *insulina* no només es basa en la combinació d'aquests activadors a través de la unió ADN-proteïna i interaccions proteïna-proteïna, sinó que també depèn de les concentracions relatives nuclears que permeten una sinèrgia única en la regulació del gen de la insulina⁴⁶. A més de totes aquestes unions de factors de transcripció, la glucosa a més de regular la traducció de la preproinsulina també regula els nivells de mRNA d'insulina a nivell post-transcripcional influint en l'estabilitat del mRNA.

Biosíntesi de la insulina

La insulina madura és una proteïna composta per dues cadenes polipeptídiques (A i B) que en total sumen 51 aminoàcids. La insulina se sintetitza com a precursor: la preproinsulina, una forma que es genera en el reticle endoplasmàtic rugós i conté un pèptid senyal que s'escindeix en la regió cis de l'aparell de Golgi donant lloc a la proinsulina. La proinsulina és una molècula més estable que passa a la regió trans de l'aparell de Golgi, on es formaran els grànuls de secreció. És en aquests grànuls de secreció es produeix la maduració final de la proinsulina a insulina. En el grànul, la proinsulina és tallada per dues proconvertases 1/3 i 2 (Pcsk1 i Pcsk2) i la carboxipeptidasa (Cpe) donant lloc a la insulina madura de 6kDa i al pèptid C de 3 kDa. La insulina que es va produint precipita i forma cristalls amb àtoms de zinc presents en el grànul quedant situada en el centre mentre que el pèptid C, més soluble, restarà situat a la perifèria^{47,48}. El grànul de secreció madur, migrarà cap a la membrana plasmàtica guiat pels microtúbuls, un cop allà, es fusionarà amb aquesta en un procés pel qual participen les proteïnes

SNARE de la maquinària de fusió⁴⁹. Finalment els productes de la secreció seran alliberats a l'espai extracel·lular en resposta a estímuls altament regulats per dur a terme la seva acció biològica.

Secreció d'insulina

La secreció d'insulina induïda per diferents estímuls comprèn un seguit de reaccions intracel·lulars que porten a la secreció de la hormona quan les cèl·lules β detecten canvis nutricionals⁵⁰ (Fig. 6). La glucosa entra a l'interior de la cèl·lula β a través dels transportadors Glut situats a la membrana cel·lular permetent la compensació dels nivells de glucosa extra- i intracel·lulars. Existeix una divergència entre els diferents tipus de Glut expressats entre humans i rosegadors. El transportador Glut2 presenta una elevada capacitat transportadora i baixa afinitat i és el principal que s'expressa en les cèl·lules β de ratolí, mentre que en humans s'ha defectat l'expressió els transportadors GLUT1, GLUT2, i GLUT3 tot i que la contribució de cada un d'ells encara no és clara.

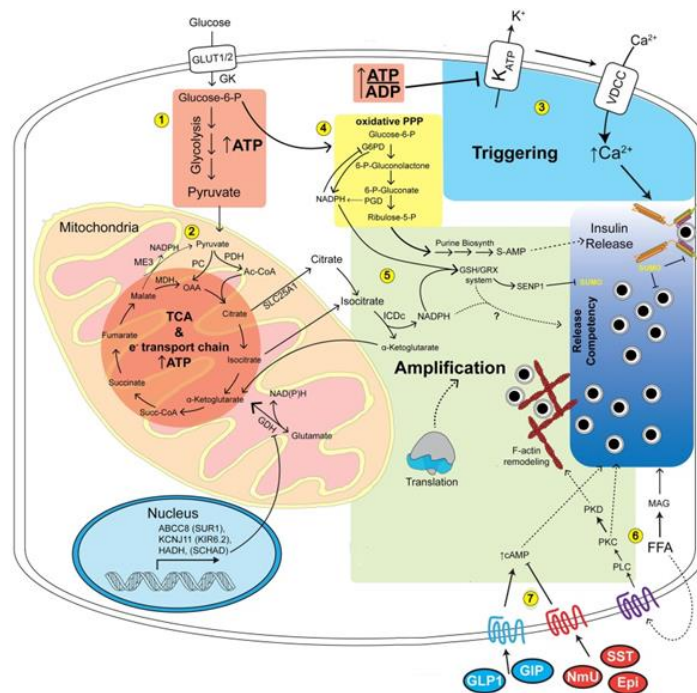


Figura 6. Esquema representatiu dels mecanismes de secreció de insulina induïda per glucosa en les cèl·lules β . 1) La glucosa entra a la cèl·lula β a través dels transportadors de glucosa i es fosforilada per la glucoquinasa (GK) esdevenint a glucosa-6-fosfat. Aproximadament el 90% de la glucosa-6-fosforilada entrarà a la glicòlisi donant lloc a piruvat i ATP. 2) El piruvat és transportat cap el mitocondri on és metabolitzat cap a l'àcid tricarboxílic (TCA) o bé convertit a acetil-CoA per l'enzim piruvat deshidrogenasa (PDH). 3) L'augment relatiu del *ratio* d'ATP a ADP porta al tancament dels canals K_{ATP} , promovent l'augment dels canals dependents de voltatge i per tant, l'entrada de calci, el principal mecanisme requerit per la secreció de insulina. Els metabòlits dependents de la glucosa addicionals derivats de la via de la pentosa fosfat (PPP) (4) i l'exportació d'intermediaris mitocondrials com l'isocitrat (5) porten a augments en els nivells de NADPH i glutatí reduït. Els àcids grassos lliures poden ser precursors del monoacilglicerol (MAG) el qual potencia la secreció dels grànuls que contenen insulina (6). La resposta de la cèl·lula β també pot ser modulada de manera positiva i negativa per receptors de superfície (7). Imatge adaptada de Kalwat et al⁵¹.

En el procés de secreció de insulina, en primer lloc la glucosa entra a la cèl·lula β a través del transportador de glucosa Glut2. Un cop a l'interior de la cèl·lula β , és fosforilada a glucosa 6-fosfat (G6P) per la glucoquinasa (GK). La fosforilació a G6P és el primer pas de la glucòlisi. Com a conseqüència de la metabolització de la glucosa i de la fosforilació oxidativa, augmenta la producció d'ATP intracel·lular. Això porta al tancament de canals K_{ATP} i la despolarització de la membrana cel·lular. A continuació, els canals dependents de voltatge de tipus L de Ca^{2+} responen a aquesta diferència en el potencial elèctric obrint-se

i permeten el flux de ions de Ca^{2+} a l'interior de les cèl·lules β . L'increment de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular promou la fusió de les vesícules que contenen insulina a la membrana plasmàtica i la seva exocitosi.

La via clàssica de senyalització $\text{ATP}/K_{\text{ATP}}/\text{Ca}^{2+}$ es complementa per l'activació d'altres vies auxiliars i també per factors metabòlics addicionals que amplifiquen la secreció de insulina. Diferents intermediaris i cofactors derivats del metabolisme de la glucosa, com també lípids i aminoàcids, participen en la secreció de insulina a diferents nivells. L'augment en la concentració de glucosa indueix un augment proporcional en la producció de NADPH en les cèl·lules β a través de la via de les pentoses fosfat, el cicle del piruvat, la isocitrat deshidrogenasa citosòlica i diferents enzims mitocondrials del cicle de Krebs. S'ha suggerit que el NADPH actua com a efector metabòlic amplificant la senyal induïda per glucosa en la secreció de insulina, segurament modulant l'estat redox de les cèl·lules β controlat per la glutaredoxina induïnt al tancament dels canals K_{ATP} , els quals contenen un lloc d'unió a NADPH.

Les vies lipídiques també participen de manera complementària en el manteniment d'una adequada secreció d'insulina. El receptor d'àcids grassos lliure GPR40 es troba altament expressat en la cèl·lula β i intervé en la regulació de la secreció d'insulina a través de la senyalització per la proteïna quinasa C (PKC). Els receptors GPR41, GPR43 i GPR119 també estan involucrats en el reconeixement d'àcids grassos. L'efecte secretor d'insulina restant dels àcids grassos lliures es deu al metabolisme lipídic incloent la producció de malonil-CoA, acetil-CoA, monoacilglicerol i diacilglicerol. Per altra banda, els aminoàcids també poden contribuir en l'amplificació de la secreció d'insulina estimulada per glucosa a través de la reposició de metabòlits intermediaris en el cicle de Krebs (reaccions anapleròtiques). És més, els receptors d'aminoàcids Tas1R1 i Tas1R3 presents a la superfície de les cèl·lules β , també podrien cooperar en la potenciació de la secreció de insulina estimulats per aminoàcids⁵².

Tal i com hem esmentat anteriorment, les incretines Glp1 i Gip també actuen en l'estimulació de la secreció d'insulina a través dels receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs) mentre que la somatostatina ho inhibeix. Recentment, s'ha descrit un nou grup d'hormones anomenades decretines (neuromedina U i galanina) que inhibeixen la secreció d'insulina, la mateixa funció de la leptina la qual és secretada principalment pel teixit adipós i pel cervell.

Establiment de la massa cel·lular β funcional durant la vida de l'organisme

Formació de la massa cel·lular β

Un pàncrees humà sa conté al voltant de 1-2 g de massa cel·lular β i en ratolins és de l'ordre de 1-2 mg. Durant l'estadi embrionari, les cèl·lules progenitores es diferencien cap a cèl·lula β a través d'un procés anomenat neogènesi. En les fases finals del desenvolupament embrionari, aquestes cèl·lules β formades comencen a proliferar a nivells elevats que es mantindran durant etapes inicials de l'etapa postnatal^{53,54}, en els primers anys de vida en l'home i 2-3 setmanes coincidint amb la lactància en el ratolí. Només el 2-3% de cèl·lules β humanes proliferen de manera simultània i els 5-10% cèl·lules β murines.. Aquests valors són molt baixos si ho comparem amb altres òrgans on hi ha poblacions cel·lulars en les quals 20-50% de les cèl·lules proliferen. Els nivells de proliferació de les cèl·lules β disminueixen progressivament durant la vida postnatal arribant a un 0-0.5% en l'etapa adulta (Fig. 7)^{55,56}. Els mecanismes responsables d'aquest declivi en la proliferació durant l'etapa adulta encara no estan del tot elucidats.

Implicació de la senyalització dependent de Gsa en l'establiment de la massa cel·lular β

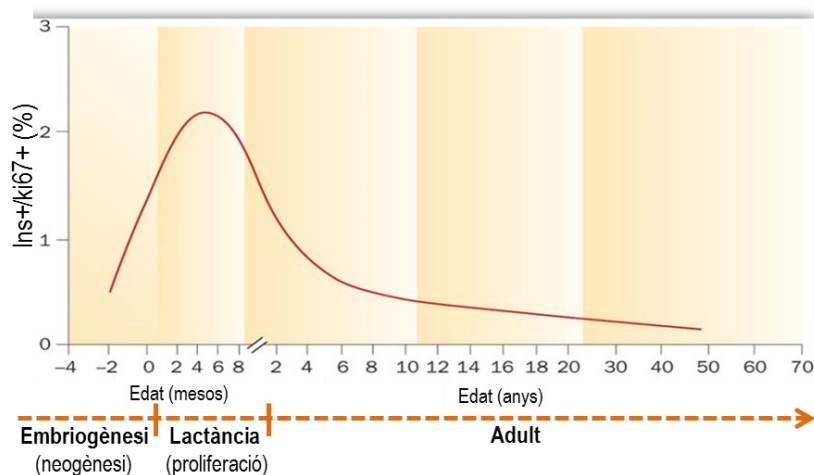


Figura 7. Esquema que mostra el dinamisme de l'expansió i creixement de la massa cel·lular β des del primer mes postnatal fins l'etapa adulta. El diagrama no està en escala. Imatge modificada de Bonner-Weir et al ⁵⁷.

Adquisició de la funció insulino-secretora

La funcionalitat de les cèl·lules β un cop formades, també s'adquireix a les primeres etapes de la vida postnatal, coincidint amb la baixada progressiva de la proliferació⁵⁸. Així doncs, les cèl·lules β recent formades presenten una funció secretora d'insulina immadura, és a dir, no regulada i uns nivells molt elevats en la proliferació⁵⁸. A mesura que avança el temps, la seva capacitat secretora es va potenciant, particularment en la secreció de insulina induïda per glucosa (GSIS), mentre que la seva capacitat de proliferació disminueix. La secreció d'insulina per les cèl·lules β immadures es caracteritza per una GSIS dèbil, exhibint respostes a nutrients més potents, com és el cas dels aminoàcids⁵⁷. Tampoc poden aturar de manera eficient la secreció d'insulina quan els nivells de glucosa són baixos, acció important en les cèl·lules β madures que proporciona prevenció a la hipoglucèmia⁵⁹. Hi ha estudis que demostren que l'exposició crònica a concentracions estimuladores de glucosa promou la maduració d'aquestes cèl·lules β ⁶⁰.

A l'edat p2 la majoria dels gens de cèl·lula β s'expressen en aproximadament el 10% en adults, però a p7 els gens *Pdx1* i *NeuroD1* s'expressen als mateixos nivells que a l'adult. Contràriament, l'expressió de *Mafa* es manté a nivells baixos fins l'etapa adulta. La sobreexpressió de *Pdx1* augmenta els nivells de *Mafa*, *NeuroD1*, *GK*, el contingut d'insulina i és requerit per la maduració completa de les cèl·lules β però no potencia la resposta a glucosa⁶¹. Per altra banda, la sobreexpressió de *Mafa* resulta en un augment de *NeuroD1*, *Nkx6.1*, *Gk* i *Glp1* sense modificar el contingut d'insulina però sí que potencia clarament la secreció d'insulina estimulada per glucosa⁶².

Plasticitat de la massa cel·lular β en l'organisme adult

Els coneixement de la capacitat d'adaptació del pàncrees endocrí ha canviat radicalment en els últims anys, de considerar-se un òrgan estàtic a definir-se actualment com un òrgan dinàmic i plàstic. La plasticitat endocrina es pot definir com la capacitat que té l'òrgan de regular la massa cel·lular β en funció de les necessitats d'insulina per tal de poder garantir un control òptim dels nivells de glucosa en sang. Aquesta plasticitat cel·lular implica l'expansió o bé la disminució de la massa β . Així doncs, el pàncrees endocrí es troba en constant remodelació mitjançant un procés dinàmic en el que participen tant la proliferació com la mort cel·lular o apoptosi. Diversos factors de tipus genètic, metabòlic i ambiental participen d'aquest procés de remodelació. El balanç entre els diferents mecanismes que controlen la

massa β permeten l'adaptació d'aquesta a les variacions de la demanda metabòlica de l'organisme. Aquesta expansió i involució de la massa cel·lular β poden venir determinades tan pel canvi en el número de cèl·lules (hiperplàsia) com per la modificació en la seva mida augmentant (hipertròfia) o disminuint (atròfia) el volum cel·lular⁶³ (Fig. 8).

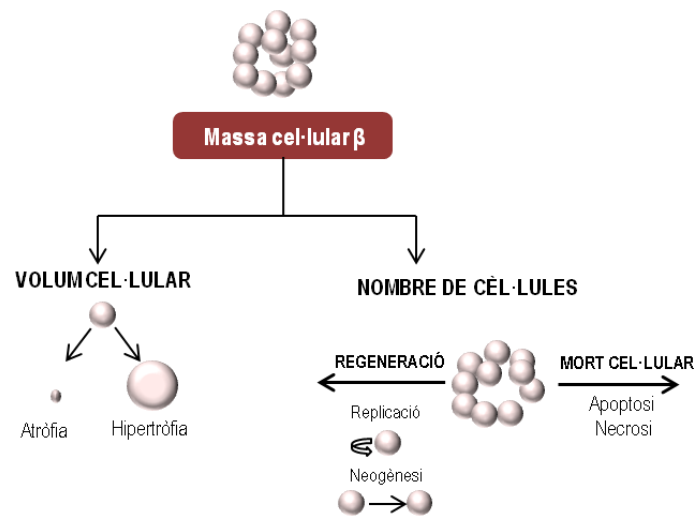


Figura 8. Esquema-resum dels diferents processos pels que la massa cel·lular β es pot veure alterada, ja sigui a través de l'augment del volum cel·lular (atròfia i hipertròfia) o bé a través del canvi en el nombre de cèl·lules que pot augmentar (replicació i neogènesi) o disminuir (apoptosi i necrosi).

La neogènesi en el pàncrees adult es dona a una freqüència molt baixa, tot i que podria augmentar en casos de pèrdua d'una part important de la massa β . En el pàncrees adult la naturalesa dels precursors no ha estat determinada de manera clara. Existeixen diversos estudis que suggereixen que es podrien trobar en els ductes pancreàtics i serien d'origen epitelial⁶⁴. El coneixement més detallat sobre els diferents mecanismes moleculars que indueixen la neogènesi de la cèl·lula β a partir dels diferents orígens de cèl·lules progenitores, permetria la estimulació farmacològica d'aquest procés per la regeneració i augment de la massa cel·lular β en pacients diabètics

Per altra banda, la replicació el principal mecanisme de proliferació de la cèl·lula β en l'etapa adulta i consisteix en la divisió d'una cèl·lula per obtenir dues noves cèl·lules. Històricament es pensava que les cèl·lules β pancreàtiques eren cèl·lules totalment diferenciades i que per tant, no tenien capacitat de proliferar. Aquesta idea va quedar obsoleta amb la publicació de diversos estudis que demostraven que aquest tipus cel·lular podia replicar en resposta a diferents estímuls tant fisiològics com experimentals, estímuls tals com una alimentació hipercalòrica, una pancreatectomia o hiperglucèmia^{65,66}. També s'ha demostrat que illots de ratolins adults exhibeixen un augment en la replicació quan es trasplanten en ratolins joves, indicant la presència de factors circulants que també regulen aquest procés⁶⁷.

Les cèl·lules β formen una població heterogènia que difereixen en la seva morfologia, en la resposta a la glucosa, en la secreció d'insulina, en la capacitat proliferativa i en l'estat de maduració. Hi ha estudis que postulen que en l'illot existeixen cèl·lules β replicatives i cèl·lules en estat senescent. Les primeres inclourien cèl·lules amb capacitat de dividir-se per mitosi en resposta a diferents factors de creixement, mentre que el segon grup estaria compost per cèl·lules funcionals sense capacitat de replicar^{68,69}. Un estudi recent ha identificat una subpoblació de cèl·lules connectades a les cèl·lules β que actuen com a marcapassos en la percepció de canvis en els nivells de glucosa i que transmeten la informació a aquelles cèl·lules β especialitzades en la funció secretora amb les que estan connectades⁷⁰. També s'ha

identificat una subpoblació cel·lular negativa pel gen *Flatop* amb una alta capacitat proliferativa⁷¹. En els últims temps s'ha descobert una població de cèl·lules β immadures situades a la perifèria de l'illot que es troben en un estadi entremig de transdiferenciació de cèl·lula α a cèl·lula β completament madures⁷². Actualment hi ha molts estudis enfocats a estudiar l'heterogeneïtat cel·lular dels illots pancreàtics per tal d'identificar noves subpoblacions de cèl·lules β que podrien servir com a dianes terapèutiques i servarien per millorar la massa cel·lular β així com la seva funcionalitat.

Sembla clar que les cèl·lules β humanes presenten un potencial replicatiu menor que les murines⁷³. Tanmateix, la majoria dels estudis en rosegadors s'han realitzat amb animals de 2-3 mesos de vida, una etapa en la que les cèl·lules β encara mantenen un nivell de proliferació elevat, mentre que en humans, els donants cadavèrics per transplantament solen tenir de 40-50 anys d'edat. La majoria d'intervencions, factors de creixement, agents mitogènics o petites molècules que han tingut bons resultats en la potenciació de la proliferació en animals, no han resultat tenir efectes massa positius en humans. Per tant, és necessari continuar investigant sobre els mecanismes que regulen la proliferació per entendre les diferències entre les cèl·lules β de rosegadors i humans^{21,74,75}.

L'augment de la massa cel·lular β produït per la neogènesi o la replicació pot ser contrarestat per la disminució del número de cèl·lules mitjançant la mort cel·lular. Aquest procés és indispensable pel manteniment i la regeneració de qualsevol teixit. La contribució relativa dels diferents mecanismes d'expansió i involució poden variar de manera considerable, inclús en un mateix individu, quan canvien les situacions fisiològiques. Clàssicament s'han descrit dos mecanismes ben diferenciats de mort cel·lular: l'apoptosi, actiu i programat que comporta despesa energètica, i la necrosi, un mecanisme passiu. Ambdós situacions poden donar-se simultàniament en el mateix teixit i serà la intensitat i la durada de l'estímul el que determinarà a la cèl·lula morir per apoptosi o per necrosi. La mort cel·lular per apoptosi és un procés ràpid, controlat genèticament, que requereix consum energètic i que implica síntesi *de novo* de diferents proteïnes. Aquest mecanisme, permet modelar el teixit pancreàtic durant l'organogènesi i la vida de l'individu, a part de jugar un paper fonamental durant l'expansió i posterior involució de la massa cel·lular β en la diabetis tipus 2. L'apoptosi es pot dividir en tres fases en funció dels canvis morfològics que experimenta la cèl·lula. En la primera fase es produeix la condensació i fragmentació de l'ADN, que s'acumula en la perifèria del nucli i provoca la reducció de la mida nuclear. La fragmentació de l'ADN és el paràmetre que es detecta amb l'assaig TUNEL, la tècnica que hem utilitzat en aquesta tesi per estudiar els nivells de mort cel·lular. En la segona fase del procés, que es pot solapar amb l'anterior, la membrana citoplasmàtica perd la seva estructura, es replega formant invaginacions (de l'anglès *blebbing*). Aquestes invaginacions s'acabaran tancant i donaran lloc a la formació de vesícules que contindran fragments cel·lulars anomenats cossos apoptòtics, els quals seran fagocitats per macròfags. En la tercera fase, es dona la degeneració de les estructures citoplasmàtiques i nuclears residuals. Existeix una gran varietat de factors que poden activar el procés d'apoptosi, com diferents productes químics (radicals lliures d'oxigen, fàrmacs, entre d'altres), factors que provoquen dany físic a la cèl·lula (raigs X, xoc tèrmic), atac d'altres cèl·lules (cèl·lules T), citocines (TNF- α), pèrdua de factors tròfics (hormones, IL-2, IL-3) o pèrdua de contacte amb la matriu extracel·lular.

Per altra banda, la necrosi és la mort accidental que provoca la destrucció no controlada de les cèl·lules degut a un dany sever i sobtat que pot afectar a un conjunt de cèl·lules o a una zona àmplia de teixit. La necrosi es caracteritza per canvis irreversibles tan en el nucli com en el citoplasma de la cèl·lula, aquests canvis incapaciten el manteniment de l'homeòstasi cel·lular. Els primers canvis es donen a nivell mitocondrial i posteriorment la membrana plasmàtica perd la capacitat per regular la pressió osmòtica, provocant una alteració en el balanç de sodi, calci i aigua. La ruptura de la membrana fa que el contingut intracel·lular sigui alliberat a l'espai extracel·lular provocant una resposta inflamatòria. Els factors que poden desencadenar la necrosi són diversos, entre els quals hi ha la hipòxia, isquèmia, diferents factors

que danyen la membrana cel·lular com determinades toxines, un trauma del teixit, tòxics químics, espècies reactives d'oxigen o inhibidors de les bombes iòniques.

Canvis adaptatius de la massa cel·lular β

L'organisme adult és capaç d'adaptar la massa cel·lular β en determinades situacions fisiològiques (embaràs) o patològiques (obesitat) en les quals es requereixen nivells d'insulina superiors a un normoestat. Un bon exemple de situació fisiològica adaptativa puntual és l'embaràs on la demanda d'insulina augmenta degut a l'increment en el pes corporal i la resistència d'insulina de la mare. En rates, el final de la seva gestació la massa cel·lular β augmenta fins a 2.5 vegades incrementant els nivells de proliferació^{65,76}. Durant els 10 dies següents al part, la massa cel·lular β pateix una reducció sostinguda fins a tornar als valors d'inici mitjançant mecanismes d'atròfia, increment en l'apoptosi i una disminució en la proliferació⁷⁷. La manca d'aquesta hiperplàsia compensatòria que es dona durant l'embaràs pot provocar l'aparició de diabetis gestacional. No obstant, la proliferació de la cèl·lula β en resposta a l'embaràs no sembla ser tant rellevant en humans com ho és en rosegadors, donat que el mecanisme predominant d'adaptació en aquest cas és la neogènesi⁷⁸. Un altre exemple, però en aquest cas en una situació patològica on que la massa cel·lular β experimenta un augment compensatori, és en l'obesitat on la resistència a insulina provoca una augment en la demanda d'insulina i per tant, l'activació de mecanismes de compensació és una resposta crucial per tal d'evitar la hiperglucèmia. Una prova d'aquest fet és que només un terç dels individus obesos desenvolupen DM2; la resta de casos poden evitar-la sempre que la cèl·lula β s'adapti a la nova situació de demanda de insulina podent mantenir una massa cel·lular β adequada. En canvi, la massa cel·lular β dels individus amb DM2 es troba reduïda un 50% respecte als sans amb el mateix pes⁷⁹.

La plasticitat de la massa cel·lular β s'ha estudiat en diversos models animals d'obesitat i resistència a la insulina induïdes tant per dieta com per modificacions genètiques. Els models de ratolí *ob/ob*, els quals presenten una mutació en el gen de la leptina, desenvolupen obesitat, hiperglucèmia i resistència a la insulina sense arribar a manifestar diabetis gràcies al fet que experimenten una gran expansió de la massa cel·lular β . En canvi, el model transgènic *db/db* deficient pel receptor de la leptina, tot i mostrar en un inici un increment en la massa cel·lular β , acaben desenvolupant diabetis a causa d'una pèrdua de massa per mecanismes d'apoptosi⁸⁰.

Els diferents mecanismes que porten a l'increment de la mida cel·lular o hipertròfia no són ben coneguts. Hi ha diversos estudis que demostren la implicació d'Akt/PKB (proteïna quinasa B) en aquests processos. La sobreexpressió d'Akt de forma constitutiva promou un augment en la mida de les cèl·lules β en rosegadors⁸¹ mitjançant l'activació i inactivació de les quinases Serina/Treonina mTOR i Gsk-3⁸²⁻⁸⁴. La quinasa S6K1, efectora de la via de senyalització PI3K, també s'ha relacionat amb el control de la mida de les cèl·lules β ⁸⁵. Pende i altres col·laboradors mostren que ratolins deficientes en la quinasa S6K1 desenvolupen intolerància a la glucosa i hipoinsulinèmia. No obstant, la resistència a la insulina no s'observa en múscul aïllat, aleshores la forta reducció en la secreció d'insulina estimulada per glucosa i en el contingut d'insulina que presenten aquests ratolins no és deguda a una fallada en la detecció o la secreció d'insulina sinó a una reducció de la massa β pancreàtiques que s'explica per una disminució selectiva en la mida de les cèl·lules β ⁸⁶.

Pèrdua de la massa β en la diabetis

En individus amb DM2 s'ha observat una reducció en la massa cel·lular β en quantificacions histològiques^{79,87}. Hi ha dues respostes possibles per aquest fet: el primer és que després de l'estadi inicial de l'adaptació cel·lular, es produeixi una reducció dramàtica en la massa cel·lular β a través de mecanismes que impliquen apoptosi i desdiferenciació, causat per la glucotoxicitat, lipotoxicitat i

acumulacions del polipèptid amiloide de l'illot (IaPP), inflamació, radicals d'oxigen i estrès de reticle endoplasmàtic (ER). La segona possibilitat seria que la DM2 afecta a individus que ja tenen una massa cel·lular β inicial baixa i/o una reducció en la capacitat d'adaptació i compensació de les cèl·lules β ⁸⁸. Aleshores, per entendre la patogènia de la malaltia és molt important tenir en compte que cada individu amb DM2 conté una determinada massa cel·lular β i presenta uns mecanismes de compensació i adaptació amb més o menys funcionalitat, com també diferent capacitat d'apoptosi o de desdiferenciació, ja que totes aquestes característiques que fan únic a cada pacient depenen tan de l'ambient com de la seva genètica.

Fins fa uns pocs anys, la pèrdua de la cèl·lula β només s'havia descrit com a mort programada o apoptosi. No obstant, recentment s'han realitzat investigacions que suggereixen que la pèrdua d'identitat de la cèl·lula β i desdiferenciació són els principals mecanismes responsables de la majoria de casos on es produeix una reducció en la massa cel·lular β tan en models animals de DM2 com en humans^{89,90}. Altres autors defensen que les cèl·lules endocrines hormona-negatives d'illots de pacients amb DM2 no formen part de la pèrdua en massa cel·lular β ⁹¹. Cal tenir present que la descompensació metabòlica present en les etapes avançades de la malaltia ja sigui per mecanismes d'apoptosi, desdiferenciació o disfunció de la cèl·lula β , es produeix per una combinatòria de diferents factors que agreugen la situació i provoquen una alteració en la cèl·lula β que acaba amb la seva mort.

Vies intracel·lulars que regulen la proliferació de la cèl·lula β

Durant les últimes dècades s'han realitzat moltes investigacions enfocades a elucidar els mecanismes i factors involucrats en la regulació de la proliferació de la cèl·lula β . S'han identificat un gran nombre de senyals extracel·lulars, cascades de senyalització i molècules efectores del cicle cel·lular^{74,75,92-94}. Les senyalitzacions extracel·lulars i les vies intracel·lulars que condueixen a la divisió de les cèl·lules β depenen d'un grup de proteïnes que permeten la progressió del cicle cel·lular i en concret, de l'entrada de les cèl·lules a la fase de mitosi. S'ha demostrat que la transició del punt de control G2/M és indispensable en la regulació de la proliferació de la cèl·lula β ⁹⁵. Per tal que s'iniciï la fase S, la cèl·lula ha d'activar un conjunt de gens necessaris per la replicació de l'ADN i inhibir d'altres que bloquegen aquesta acció durant la fase G1. Durant la transició G1/S participen set factors de transcripció E2F que actuen com a activadors o repressors de l'expressió gènica regulant aquests canvis (Fig. 9). La família de proteïnes E2F amb activitat transcripcional activa (E2F 1-3), és inhibida per la proteïna del retinoblastoma (pRb), p107 i p130. Aquesta unió desapareix quan les proteïnes E2F són fosforilades per les quinases dependents de ciclins (Cdk): Cdk1, Cdk2, Cdk4 i Cdk6, permetent d'aquesta manera l'activació de l'activitat transcripcional de E2F i per tant, l'inici de la fase S del cicle cel·lular. Cal tenir present que existeixen diferències clares en l'expressió de les quinases Cdk entre rosegadors i humans.

Les quinases Cdk4 i Cdk6 en humans i la Cdk4 en rosegadors⁹⁶, són molècules claus en el control del punt de control G1/S del cicle cel·lular. També existeix la família de les ciclins D (ciclina D1, D2 i D3) on en rosegadors la ciclina D2 és indispensable per la cèl·lula β , mentre que en humans aquesta és poc expressada ja que la funció principal recau sobre les ciclins D1 i D3⁹⁷.

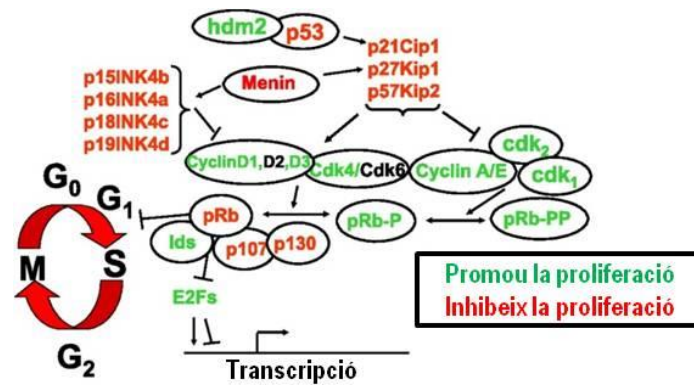


Figura 9. Representació esquemàtica de les molècules que regulen la progressió del punt de control G1/S. Les proteïnes expressades diferencialment entre humans i rosegadors es senyalen en color negre. Imatge modificada de Kulkarni RN et al.⁹².

Tan les Cdk com les ciclines són regulades per dues famílies d'inhibidors de cicle, la família INK4 que inclou p15^{ink4b}, p16^{ink4a}, p18^{ink4c} i p19^{ink4d} i per la família de Cip/Kip/Waf que comprèn p21^{kip1}, p27^{kip1} i p57^{kip2}. Totes aquestes proteïnes es troben tan en rosegadors com en humans i reprimeixen de manera eficient la capacitat de les cèl·lules β a proliferar. Per una banda, les proteïnes Ink4 inhibeixen l'activitat de Cdk4 i Cdk6 bloquejant la progressió del cicle cel·lular. Hi ha estudis que demostren que p16 s'acumula en les cèl·lules β a mesura que augmenta l'edat, sent responsable d'una part de la reducció en la capacitat de proliferació de les cèl·lules en organismes adults¹². També s'ha estudiat que la inducció de p15^{ink4b} porta a una hipoplàsia del pàncrees endocrí en un model animal de sobreexpressió de Tgf β ¹⁹⁸. Per altra banda, les proteïnes Cip/Kip/Waf inhibeixen la progressió del cicle cel·lular a través de la seva unió amb les Cdk i d'aquesta manera bloquegen la seva activitat quinasa. p21^{kip1} i p27^{kip1} també contribueixen en la formació del complex Cdk-ciclina i la seva localització nuclear. Per altra banda, la disminució dels nivells de p57^{kip2} en illots humans adults *in vitro* sembla tenir un efecte positiu en la inducció de la proliferació de la cèl·lula β ⁹⁹. La maquinària que regula el cicle cel·lular és controlada per una xarxa de components molt complexa que inclou factors extrínsecs (nutrients, factors de creixement, hormones i altres) i els seus receptors, com també cascades de senyalització que inclouen els factors intrínsecs de la cèl·lula β induint la seva entrada al cicle cel·lular.

La senyalització per Akt és una de les principals vies responsables de la regulació del creixement de la cèl·lula β . Aquesta quinasa és activada a través d'una cascada que involucra les proteïnes PI3K i PDK1, les quals són majoritàriament activades per receptors amb activitat tirosina quinasa. En la cèl·lula β , els receptors de la insulina i l'Igf1 són els que s'han relacionat més amb l'activació d'Akt i el seu paper en la regulació de la proliferació de la cèl·lula β ha sigut àmpliament estudiada. El funcionament d'aquesta via de senyalització s'explicarà en detall en la secció *La via de Igf/Insulina*.

La senyalització intervinguda pels receptors d'incretines acoblats a proteïnes G, també activa Akt promovent la inhibició de caspases i del factor de transcripció FoxO1 (*forkhead box protein O1*) el qual és inactiu quan es fosforila i es localitza al citoplasma portant disminuint els nivells d'apoptosi en la cèl·lula β . Els efectes de Glp1 com a inductor de la proliferació de la cèl·lula β s'han descrit àmpliament en diferents estudis¹⁰⁰⁻¹⁰². La regulació de la proliferació i la massa cel·lular β a través de Gs-GPCR s'explicarà en més detall en la secció *El segon missatger intracel·lular: AMPc*.

Implicació de la senyalització dependent de Gsc en l'establiment de la massa cel·lular β

Per altra banda, la glucosa *per se* actua com a potent estimulador de la replicació de la cèl·lula β tan en rosegadors com en humans ¹⁰³. S'ha demostrat l'existència d'un gran nombre de mecanismes involucrats en la regulació de la inducció de proliferació de la cèl·lula β per la glucosa (Fig. 10). En primer lloc, quan la glucosa entra dins la cèl·lula es metabolitza a través de la glucòlisi produint ATP (adenosina trifosfat) i activant la maquinària de secreció d'insulina. L'AMPK (proteïna quinasa activada per AMP) és la principal quinasa sensible a energia que intervé en l'adaptació en situacions de nivells baixos de nutrients a través de la inhibició de l'activitat de mTOR (diana sensible a rapamicina en mamífers), inhibint la proliferació de la cèl·lula β . La producció d'ATP induïda per glucosa, inhibeix AMPK, i per tant s'indueix la proliferació a través de l'activació de mTOR per mecanismes que encara no estant del tot elucidats. Per altra banda, nivells elevats d'ATP promouen el tancament dels canals de potassi dependents d'ATP (K_{ATP}) situats a la membrana de la cèl·lula β i permetent l'entrada de calci a l'interior de la cèl·lula. L'increment en el calci intracel·lular, induït per la secreció d'insulina estimulat per la glucosa, promou la fosforilació i activació de diferents quinases com PKA (proteïna quinasa A), Erk1/2 o CaMK (proteïna quinasa dependent de calci/calmodulina) les quals fosforilaran al factor de transcripció Creb (*cAMP response element binding*) a la Ser133 activant la transcripció de gens específics que promouran la proliferació de la cèl·lula β . En el cas de la senyalització per CaMK, el calci serà detectat per la proteïna calmodulina, que activarà la calcineurina, una fosfatasa amb múltiples dianes que regulen el control de diverses vies de proliferació. Una de les seves principals dianes en la cèl·lula β són els factors de transcripció NFAT (factor nuclear de les cèl·lules T activades), potents inductors de gens rellevants de cicle cel·lular^{44,104}. La glucosa també pot activar directament el factor de transcripció ChREBP (proteïna d'unió a elements de resposta a carbohidrats) induint l'estimulació de la proliferació de la cèl·lula β a través de l'activació de la transcripció de gens com *Cdks* (1, 2, 4 i 6) i *Ccnd3*, *Ccna* i *Ccne*¹⁰⁵.

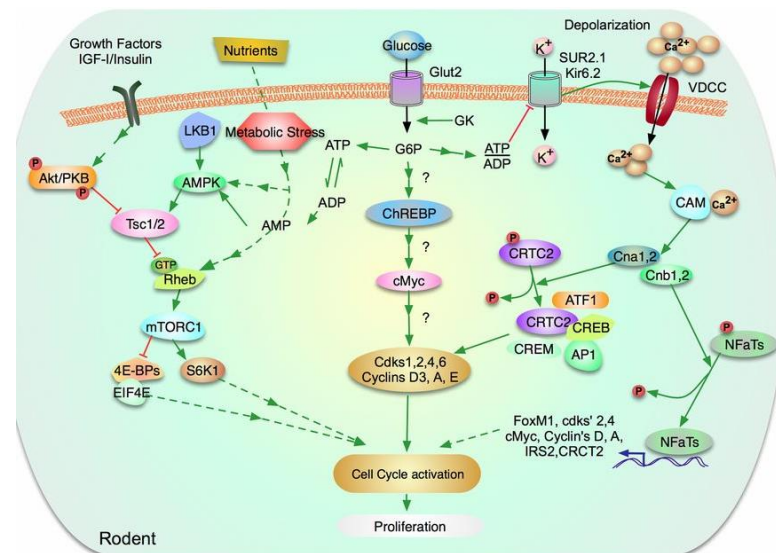


Figura 10. Esquema representatiu dels mecanismes induïts per glucosa de la proliferació de la cèl·lula β a través de mTOR, de ChREBP i de NFATs en rosegadors. La glucosa entra a l'interior de la cèl·lula a través del transportador Glut2 (rosegadors) o GLUT1 (humans), generant ATP el qual bloqueja AMPK i activa la senyalització per mTORC per promoure la proliferació. Per altra banda, el metabolisme de la glucosa activa a ChREBP, promovent l'activació de c-Myc i ciclines. L'entrada de calci a l'interior de la cèl·lula promou l'activació de la calmodulina i la calcineurina, resultant en l'activació de la proliferació a través dels factors de transcripció NFATs. Imatge de Bernal-Mizrachi et al⁷⁴.

Per altra banda, l'hormona del creixement (GH), la prolactina (PRL) i el lactogen placentari (PL), són una família d'hormones que també juguen un paper important en l'augment de la massa β i es mantenen en nivells elevats quan apareix una elevada demanda d'insulina⁶⁵. Tan la PRL com el PL augmenten durant l'embaràs i indueixen la proliferació a través del receptor de prolactina, mentre que la GH ha demostrat tenir capacitat per estimular la replicació de les cèl·lules β en illots fetals, neonatals i en adults. La via de senyalització de Wnt, la qual té una funció molt important durant l'estadi embrionari del desenvolupament del pàncrees, també ha demostrat tenir un paper de regulador positiu en la proliferació de la cèl·lula β ¹⁰⁶. Contràriament, la via de senyalització intervinguda per TGF β s'ha descrit com a negativa en la replicació de la cèl·lula β ja que la inhibició de la seva funció promou l'entrada al cicle cel·lular. Tot i així, sota algunes condicions podria tenir un paper de supervivència i regulació de la proliferació de la cèl·lula β ¹⁰⁷

La intensa recerca dels últims anys dedicada a elucidar i determinar els mecanismes que regulen la proliferació de la cèl·lula β , ha permès generar una llarga llista de factors mitogènics que podrien ser dianes terapèutiques pel tractament de la malaltia. No obstant, la major part del coneixement s'ha generat en rosegadors i la translació en humans continua sent confusa i complexa. Per aquest motiu és imprescindible continuar investigant i descobrint els determinants moleculars que porten a terme aquest procés.

EL SEGON MISSATGER INTRACEL·LULAR: AMPc

El nucleòtid cíclic AMPc (adenosina monofosfat cíclica) és un dels primers missatgers intracel·lulars identificats que regula un gran nombre de funcions cel·lulars. La seva biosíntesi la porten a terme els enzims adenilil ciclases (AdC) a partir d'ATP mentre que la degradació a AMP la realitzen les fosfodiesterases (PDE). La majoria d'AdC s'uneixen a la membrana plasmàtica on són activats per receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs)¹⁰⁸, mentre que les fosfodiesterases senyalitzen a través de proteïnes andami o *scaffold* i es troben sota una regulació més complexa¹⁰⁹. Els canvis en els nivells del segon missatger poden ser controlats per diversos receptors però en la majoria de casos venen regulats pels GPCRs.

Els GPCRs també coneguts com a receptors transmembrana de set dominis, comprenen una gran família de receptors que detecten molècules des de la part extracel·lular i activen vies de transducció de senyal, induint a respostes intracel·lulars que promouen la fosforilació i activació de factors de transcripció. Entre els lligands que s'hi uneixen es troben hormones i neurotransmissors i els missatgers secundaris inclouen l'AMPc, el fosfatidilinositol (PIP2) i el calci (Ca_{2+}). Les proteïnes G estan compostades per tres subunitats principals: α , β i γ . La unió del lligand al receptor promou un canvi conformacional de la proteïna G trimèrica que s'activarà mitjançant l'intercanvi de GDP enllaçat per un GTP. La subunitat α es dissocia de les $\beta\gamma$ i depenent del tipus de subunitat α que formi part del receptor (Gs, Gi, Go, Gq, Gt, Golf) s'activarà una via de senyalització o altra (Taula. 2). En el cas de la senyalització via cAMP, si la subunitat α és activadora (Gs) s'activarà l'enzim AdC augmentant els nivells d'AMPc. Si la subunitat α és inhibidora (Gi) s'inhibirà l'AdC i disminuiran els nivells d'AMPc.

Subunitat α reguladora	Efectors / Vies de senyalització
α_s	$\uparrow\uparrow$ AMPc
α_i	$\downarrow\downarrow$ AMPc
α_o	\downarrow Calci
α_q	\uparrow Fosfolipasa C (IP3)
A13	\uparrow Intercanvi Na^+/H^+
α_t	\uparrow cGMP-fosfodiesterasa (visió)
α_{olf}	\uparrow AMPc (olfacte)

Taula 2. Tipus de subunitats α reguladores dels receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs) juntament amb els seus efectes corresponents i vies de senyalització intracel·lulars que activen.

La senyalització via GPCR-Gs

El paper de les incretines ha sigut objecte d'estudi durant els últims 20 anys ja que són els principals lligands coneguts que actuen a través de GPCR-Gs en la cèl·lula β . Els nombrosos efectes descrits de Glp1 tant en la cèl·lula β com en teixits extra pancreàtics com el cervell, el múscul, el teixit adipós o el cor, han fet que alguns derivats d'aquesta molècula i anàlegs estructurals, com l'exendina-4 (ex4), es trobin en estadis avançats d'investigació clínica amb resultats molt prometedors pel que fa al control de l'homeòstasi de la glucosa i el pes corporal dels pacients. El coneixement dels diferents mecanismes que controlen la secreció i l'acció de Glp1 en la regulació de la proliferació i l'apoptosi^{110,111}, permeten la seva aplicació en la reversió del desenvolupament natural de la DM2.

Vies intracel·lulars regulades per GPCR-Gs

L'augment en els nivells d'AMPc per l'activació de Gs pot seguir dues vies de senyalització diferents. Per una banda, pot actuar a través de la senyalització dependent de PKA i per l'altra banda a través de les proteïnes Epac 1/2 o Rapgef 3/4 (*Exchange factor directly activated by cAMP 1/2*).

PKA és una serina/treonina quinasa formada per dues subunitats reguladores (R) codificades per quatre transcrits (R1 α , R1 β , R1 α i R1 β) i dues subunitats catalítiques (C) codificades per tres transcrits (C α , C β i C γ)¹¹². Prkar1a és el subtipus regulador més abundant en la cèl·lula β ¹¹³. La unió del segon missatger a les subunitats reguladores de PKA promou l'alliberació de les subunitats catalítiques, les quals entren a l'interior del nucli i fosforilen als seus corresponents substrats, sent un dels principals el factor de transcripció Creb el qual s'uneix a determinades seqüències de l'ADN anomenades Cre activant la transcripció de gens específics a la cèl·lula β (Fig. 11).

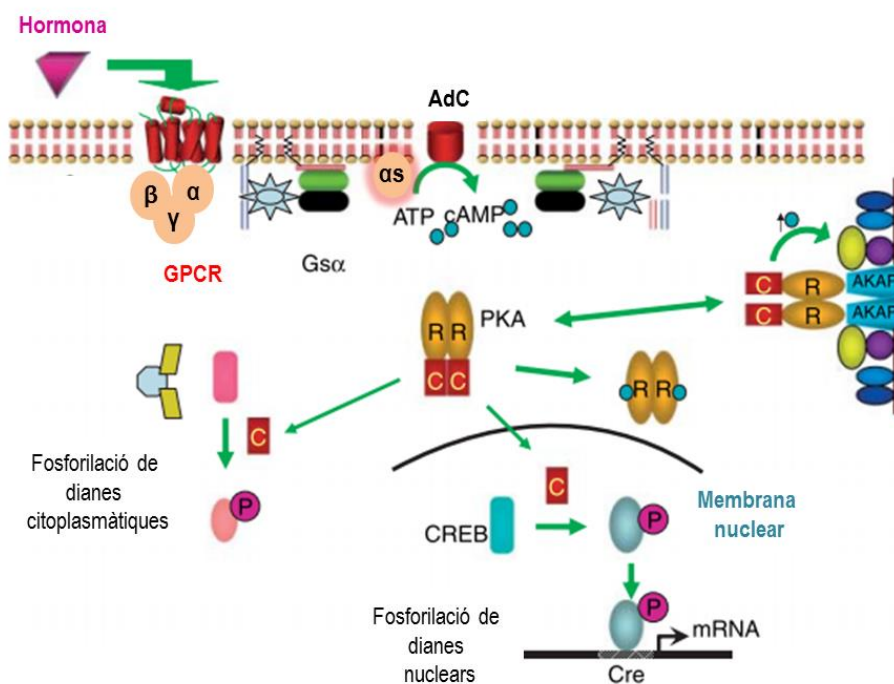


Figura 11. Esquema general de la senyalització principal de PKA. En aquest model, la senyalització s'inicia quan la hormona s'uneix al GPCR, activant Gs α la qual activarà AdC augmentant els nivells de AMPc (rodones blaves). L'AMPc s'uneix a l'heterotetràmer de PKA, alliberant-se els dímers de les subunitats PKAR i els dímers PKAC (quadrats vermells). Les subunitats catalítiques fosforil·laran dianes citoplasmàtiques i nuclears (p.e. Creb) portant a efectes *downstream* de la senyalització intracel·lular. A la part dreta de l'esquema es forma el complexa PKA-AKAP que fosforil·larà substrats en resposta a nivells molt elevats de del segon missatger. Imatge modificada de Lawrence et al¹¹⁴.

Tal i com es pot observar a la Figura 12, l'activació de PKA induïda per l'augment dels nivells d'AMPc resulta en (1) l'increment de l'expressió de *Pdx1* i la seva translocació al nucli, juntament amb altres gens específics de cèl·lula β , (2) l'activació de la β -catenina i el factor de transcripció Tcf2 (*T-cell factor-like 2*) de la via de senyalització Wnt que promourà la transcripció de gens de cicle cel·lular la *Ccnd1*, (3) l'activació del factor de transcripció NFAT a través de la senyalització dependent de calci/calceïneurina que promou la transcripció de gens reguladors de cèl·lula β i (4) la translocació de PKA al nucli promovent la fosforilació de diferents substrats com és Creb. L'activació de Creb en el residu serina 133 a la cèl·lula β en resposta a diversos estímuls com la glucosa, GIp1, GIp o el pèptid d'activació de l'adenilat ciclasa pituitària (PACAP) promou l'activació de la transcripció dels seus gens diana. Els mecanismes moleculars

Implicació de la senyalització dependent de Gsq en l'establiment de la massa cel·lular β

pels quals Creb activa la transcripció de gens a la cèl·lula β varia segons la naturalesa de l'estímul. Aquests mecanismes involucren a diferents proteïnes quinases com PKA, Erk1/2 o la β-arrestina 1, permetent a Creb que reguli de manera específica l'expressió de gens crucials d'identitat i proliferació de la cèl·lula β com són la insulina, *Irs2*¹¹⁵, *Pdx1*, *Mafa*¹¹⁶, *Ccna2*¹¹⁷, *Ccnd1*¹¹⁸, *Bcl-2* (gen antiapoptòtic)¹¹⁹ i *Igf1r*¹²⁰. Així doncs, l'activació de Creb en la cèl·lula β augmenta la sensibilitat a glucosa, la secreció d'insulina, la supervivència, la proliferació i l'activació del cicle cel·lular¹²¹.

Per altra banda, les proteïnes Epac contenen un domini d'unió a l'AMPc altament conservat en l'evolució que actua com a interruptor molecular el qual detecta canvis en els nivells del segon missatger regulant diferents funcions biològiques. Epac 1/2 (5) activa la cascada de senyalització: Rap1 → B-Raf → Mek que resultarà en la fosforilació d'Erk1/2 i induirà l'activació de Creb. Per altra banda, Epac 1/2 també té efectes antiapoptòtics i promou la secreció de insulina estimulada per glucosa (GSIS) a través de l'activació de Rap1 controlant l'exocitosi dependent dels nivells de calci, no obstant el mecanisme específic encara queda pendent d'elucidar¹²⁰.

També existeixen un grup de proteïnes armadura anomenades AKAP (*A-kinase anchoring proteins*) que s'uneixen a les fosfodiesterases i a PKA, formant complexos que sincronitzen les respostes de l'AMPc¹²². A més, el propi AMPc també regula algunes fosfodiesterases (PDE4) permetent una regulació més estricta en la durada i intensitat de la seva pròpia senyalització¹²³ (Fig. 11).

Finalment, l'activació de la β-arrestina 1 a través de Glp1r promou l'activació de Erk1/2 però de manera més tardana. Aquesta activitat permet mantenir durant més temps a Erk1/2 en el citoplasma i afavoreix la fosforilació de substrats no nuclears de la quinasa com és el cas de p90Rsk permetent la inactivació de la proteïna proapoptòtica Bad¹²⁴ (Fig. 12). Les β-arrestines també poden actuar com a proteïnes armadura en la transducció de senyal a través del reclutament de diferents proteïnes de senyalització formant complexos que uneixen els GPCRs a diferents senyalitzacions com és el cas de la cascada Erk1/2^{125,126}.

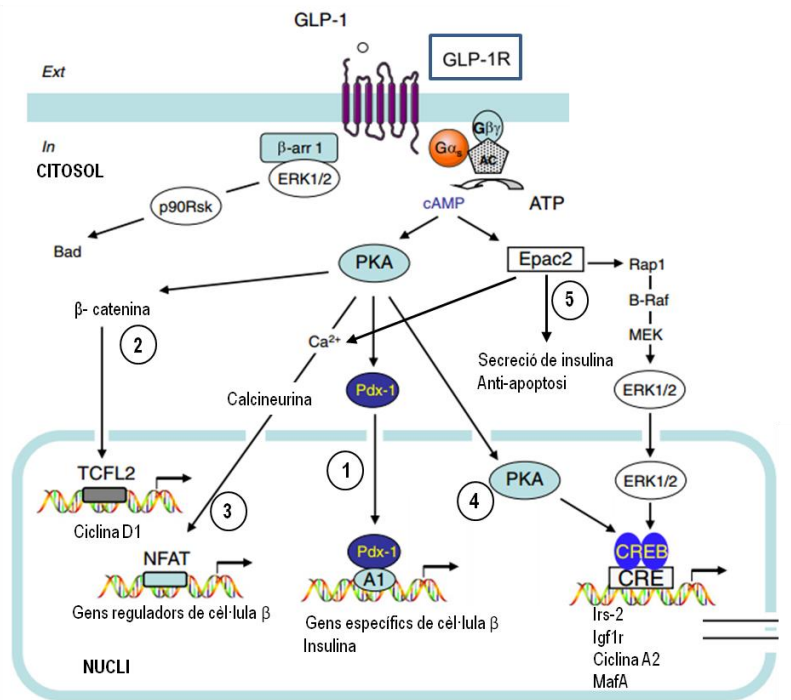


Figura 12. Efectes de Glp1r sobre la proliferació, supervivència i funcionalitat de la cèl·lula β. L'augment en els nivells del segon missatger AMPc pot seguir una via PKA-dependent o bé independent activant les proteïnes Epac2 induint la proliferació de la cèl·lula β. Imatge modificada de Dalle S. et al¹²⁰.

Ambdues vies de senyalització: PKA i Epac 1/2 alteren l'activitat iònica resultant en el tancament dels canals K_{ATP} modificant-se el potencial de la membrana i sensibilitzant les cèl·lules β als canvis dels nivells de glucosa. L'augment en els nivells de calci intracel·lulars incrementa el nombre de vesícules secretores d'insulina de l'interior de les cèl·lules que estan a punt per ser alliberades¹²⁷. L'activació de la via intervinguda per Epac 1/2 facilita de manera ràpida l'exocitosi de insulina dependent de calci, mentre que en el cas de Glp1 aquesta secreció és més lenta i sostinguda¹²⁸. Depenent de l'abundància relativa de PKA i Epac 1/2, així com de la seva distribució i localització, i l'ambient cel·lular en el que es trobin poden actuar de manera independent, sinèrgica, o oposada en la regulació d'una funció cel·lular específica com l'estimulació de la fosforilació d'Akt per insulina, la regulació de la proliferació o la desdiferenciació cel·lular¹²⁹.

GPCR-Gs i la regulació de l'homeòstasi de la glucosa

Dècades enrere ja es va demostrar que l'AMPc era una molècula de senyalització amb funcions importants en la regulació de la secreció d'insulina i glucagó de les cèl·lules β i α del pàncrees, respectivament. Actualment, l'activació de PKA es considera un amplificador de la secreció d'insulina potenciant l'alliberació de les vesícules RRP (*readily releasable pool*) després de la seva estimulació per glucosa. L'activitat de PKA augmenta el nombre de grànuls de secreció sensibles a nivells elevats de calci, alguns d'ells localitzats fora de les RRP, assegurant d'aquesta manera que també es produeixi exocitosi en zones fora de la membrana plasmàtica de la cèl·lula que es troben actives i permeten una gran quantitat de secreció de grànuls d'insulina¹³⁰. A banda de l'estimulació de la GSIS, les proteïnes Epac 2 també intervien en l'acidificació dels grànuls secretors de la cèl·lula β per tal que esdevinguin competents per una exocitosi ràpida en resposta a un augment en l'influx de calci. Aquesta funció és específica per els pools d'alliberació immediata (IRP) dels grànuls de secreció que s'alliberen a la primera fase de la GSIS¹³¹.

L'efecte amplificador de Glp1 en l'alliberació d'insulina és estrictament dependent de glucosa, tenint un efecte en concentracions plasmàtiques de glucosa d'aproximadament de 80mg/dl. Agonistes de Glp1r s'utilitzen actualment pel tractament de la DM2. No obstant els efectes clínics d'aquesta incretina són limitats ja que pateix una ràpida inactivació i degradació per l'enzim DPP-4 (dipeptidil peptidasa-4). Per aquest motiu, s'han desenvolupat fàrmacs que mimetitzen els efectes glucoreguladors de Glp1 com el liraglutide i l'ex4 i d'altres que són inhibidors de DPP-4 com la sitagliptina i la vildagliptina, que s'administren conjuntament. Tots aquests agonistes del receptor de Glp1 milloren la secreció d'insulina en la cèl·lula β amb un paper rellevant en la primera i segona fase de resposta a la secreció.

GPCR-Gs i la regulació de la massa cel·lular β

A més a més dels seus efectes sobre la secreció d'insulina diversos treballs han demostrat efectes de Glp1 sobre proliferació, supervivència i neogènesi de cèl·lules β , suggerint que aquesta incretina també podria participar en la regulació de la massa cel·lular β .

En rates Wistar, la disminució en la funció de cèl·lula β i la seva conseqüent alteració en la tolerància a la glucosa lligat a l'edat, podia ser revertida per l'administració de Glp1. En aquest model animal, el Glp1 induïa l'expressió de *Pdx-1*, el qual es troba molt disminuït en rates adultes. Així doncs, la millora en la tolerància a la glucosa després de l'administració de l'incretina s'atribueix directament a l'augment en la massa cel·lular β la qual compensa la decaïda en el nombre i funcionalitat de cèl·lules β que apareix de manera fisiològica¹³². L'AMPc s'ha descrit com a activador o inhibidor de la proliferació segons la seva diana cel·lular com EGF (factor de creixement epidèrmic) o Src, així com el tipus cel·lular en el que actui atribuït a la seva connexió amb la via de senyalització Ras/Raf/Mek/Erk. Per exemple, en fibroblasts el segon missatger antagonitza les senyals proliferatives induïdes per factors de creixement i altres

activadors de la via de senyalització d'Erk1/2¹³³ en canvi, en la línia cel·lular de fibroblasts CCL39 l'AMPc no inhibeix Erk, sinó que retarda la seva activació¹³⁴. També s'han descrit efectes de l'AMPc sobre altres tipus cel·lulars com neurones¹³⁵, melanòcits¹³⁶ i les cèl·lules de la tiroides¹³⁷ regulant processos de proliferació i desdiferenciació a través de l'activació d'Erk.

L'exendina-4 també han demostrat augmentar els nivells de replicació, neogènesi i massa cel·lular β, millorant també la tolerància a la glucosa en un model animal de diabetis de pancreatectomia parcial¹³⁸. Altres investigacions mostren evidències indirectes sobre els efectes de Glp1 sobre la regulació de la massa cel·lular β a partir de l'estudi en un model d'estreptozotocina on es produeix l'expressió compensatòria de gens pancreàtics després de la destrucció d'un gran nombre de cèl·lules β¹³⁹. Apareix un augment en la producció de Glp1 per part de les cèl·lules α romanents, suggerint que aquesta hormona juga un paper molt rellevant en la recuperació de la funcionalitat i la massa cel·lular β després d'haver rebut una forta agressió. Estudis recents continuen apuntant en el mateix sentit demostrant que l'administració intraperitoneal de l'agonista de Glp1, liraglutide en el model animal doble *knock-in* RipcreERT2/R26R-YFP, en el que es poden marcar les cèl·lules β de manera específica i permanent després de l'injecció intraperitoneal amb tamoxifen, evita la pèrdua de la massa cel·lular β augmentant els nivells de proliferació però no de neogènesi, disminuint la taxa de mort cel·lular. A més, aquesta millora en la massa i la funció de la cèl·lula β, així com la hiperglucèmia, es manté un cop finalitzat el tractament¹⁴⁰. Tot i aquests estudis calen més estudis enfocats a demostrar el paper positiu de la senyalització per incretines en la regulació de la massa cel·lular β.

Models animals de la via GPCR-Gs-AMPc

La generació de diversos models genètics de ratolí deficientes en components de la via de senyalització GPCR-Gs-AMPc ha permès estudiar i demostrar la rellevància d'aquesta via en la regulació de la proliferació i funcionalitat de la cèl·lula β.

- Ratolins deficientes en els receptors Glp1r i Gipr

Ratolins deficientes per Glp1 en cèl·lula β desenvolupen intolerància a la glucosa administrada per via intraperitoneal i defectes en la secreció d'insulina en resposta a Glp1 sense mostrar alteracions en la tolerància a la glucosa oral. Per altra banda, la deficiència de Glp1 indueix a una pèrdua en la resposta d'exendina-4¹⁰⁰. En rosegadors els Glp1r són necessaris per respondre a la hiperglucèmia i al Glp1 exogen, no obstant, durant la ingesta d'aliments hi ha altres factors que actuen per tal de compensar la reducció en l'acció de Glp1. Per altra banda, els animals transgènics deficientes en cèl·lula β de Gipr exhibeixen nivells menors de secreció d'insulina postprandial i una disminució en l'expansió de la massa de teixit adipós sense canvis en la sensibilitat de la insulina en comparació amb el grup control. A més, les cèl·lules β d'aquest model animal desenvolupen més sensibilitat a patir apoptosi i presenten nivells gènics menors de *Tcf7*, un gen important en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa¹⁴¹. El model animal doble transgènic per Glp1r i Gipr en cèl·lula β (β-DIR KO) no presenta una resposta de glucèmia millorada després de l'administració exògena de Gip o d'exendina-4, no obstant aquests animals no presenten alteracions en la sensibilitat a la insulina. La resposta a forskolina i GSIS *in vitro* en illots isolats d'aquests es manté funcional¹⁴².

Curiosament, cap dels tres models animals explicats exhibeix alteracions en la proliferació de la cèl·lula β així com tampoc en l'expansió de la massa cel·lular β. Aquestes dades posen de manifest l'existència i la connexió d'altres vies de senyalització que puguin actuar de manera sinèrgica amb la via de les incretines i que són essencials en l'establiment de la massa cel·lular β durant l'etapa postnatal temprana.

- Ratolins deficients en Gs α

L'any 2007 Weinstein L. et al caracteritzen el model animal deficient per la subunitat Gs α en la cèl·lula β (β GsKO)¹⁴³. Aquests animals desenvolupen una severa hiperglucèmia, juntament amb una intolerància a la glucosa i hipoinsulinèmia, lligat a una reducció en el contingut de insulina i una secreció de insulina induïda per glucosa alterada¹⁴³. La hipoinsulinèmia així com nivells reduïts de Igf1 circulant podrien ser responsables de la disminució del creixement postnatal evident a les 2-3 setmanes d'edat tan en mascles com en femelles. Els illots d'aquests animals són més petits i la massa cel·lular β es troba significativament disminuïda, dades que es relacionen directament amb una reducció en la taxa de proliferació, que apareix des del naixement (p1) i un augment en els nivells d'apoptosi. No obstant, no es veu afectada l'expressió gènica del factor de transcripció *Pdx1*, així com tampoc la de *Irs2*, suggerint que aquests dos gens no estan involucrats en aquest fenotip¹⁴³.

Tres anys més tard, el mateix grup va generar el model animal deficient per la subunitat Gs α de tot el pàncrees, utilitzant el promotor *Pdx1*^{Cre} (PGsKO)¹⁴⁴. Els ratolins PGsKO també desenvolupen una clara intolerància a la glucosa des d'una edat molt temprana, confirmant la rellevància de la senyalització Gs α en la funcionalitat de la cèl·lula β . Ambdós models animals, específic de cèl·lula β i de pàncrees presenten una disminució significativa en els nivells d'expressió de *Irs2*.

- Ratolins deficients en Gi α

Berger M. et al. estudien el paper de la subunitat Gi dels GPCRs en la regulació de la massa cel·lular β . La sobreexpressió de la subunitat inhibidora en cèl·lula β disminueix els nivells de proliferació, altera la massa cel·lular β i l'homeòstasi de la glucosa en l'etapa adulta. Contràriament, la seva inhibició indueix la proliferació perinatal de les cèl·lules β , augmenta la massa cel·lular i millora la homeòstasi de la glucosa. Anàlisis transcriptòmic identifiquen l'expressió de múltiples Gi-GPCRs que s'expressen durant el desenvolupament i l'etapa adulta, com és el cas de *Adra2a*, un regulador clau en la replicació de la cèl·lula β . Aquests resultats demostren que Gi limita la proliferació de les cèl·lules β , especialment en el període perinatal, un moment crític per l'establiment de la massa cel·lular β ¹⁴⁵.

- Ratolins deficients en PKA i Epac 2

Els animals deficients per *Prkar1a* en el pàncrees (*Pdx1-Cre prkar1a*^{fl/fl}) no exhibeixen alteracions en els nivells de proliferació de la cèl·lula β així com tampoc en la massa β . És més, aquests ratolins presenten una millora en la tolerància a la glucosa i GSIS¹¹³. Per altra banda, ratolins *knock-out* per *Epac 2* en cèl·lula β alimentats *ad libitum* amb dieta estàndard no exhibeixen una alteració en la GSIS però sí en l'acció de l'agonista de *Glp1r*, l'ex-4 en la potenciació de la primera fase de la GSIS, tan *in vitro* com *in vivo*. No obstant, quan aquests animals són alimentats amb una dieta alta en greixos i esdevenen resistents a la insulina, l'absència d'*Epac 2* altera la GSIS¹⁴⁶. Aleshores sembla que en la DM2, les proteïnes *Epac 2* participen en la restauració de la GSIS a través dels agonistes de *Glp1r*.

- Ratolí deficient β -arrestina 1

El model animal deficient per la proteïna β -arrestina 1 causa una reducció en l'activació d'Erk1/2 i Creb i també en l'expressió de *Irs2*, així com una disminució dels nivells d'AMPc i com a conseqüència una alteració en la secreció d'insulina. No obstant, la β -arrestina 1 no altera l'expressió del propi *Glp1r* com tampoc la seva interlinealització/dessensibilització¹⁴⁷. Recentment s'ha identificat la β -arrestina 2 com a reguladora essencial en la funció β pancreàtica tan en condicions fisiològiques i patofisiològiques. La inactivació d'aquesta proteïna en cèl·lula β de ratolins adults altera la secreció d'insulina i produeix

intolerància a la glucosa. Contràriament, la seva sobreexpressió en cèl·lula β millora molts defectes metabòlics observats en ratolins alimentats amb una dieta alta en grasses¹⁴⁸.

- Ratolí transgènic dominant negatiu A-CREB

Jhala et al. generen un model animal transgènic específic de cèl·lula β que expressa el dominant negatiu Creb (A-Creb) que bloqueja els tres components de la família (Creb1, Atf1 i Crem) (Rip A-Creb)¹¹⁵. Aquests animals desenvolupen diabetis com a conseqüència d'un augment en els nivells d'apoptosi, en gran part per l'increment en els nivells d'expressió de l'inhibidor de cicle cel·lular *Cdkn1a* (p21), com també una alteració en l'expressió gènica de *Irs2* i la *Ccna2* amb un impacte negatiu sobre massa cel·lular β ¹¹⁵. Curiosament, els efectes de la deficiència de Creb tenen un impacte més negatiu en la regulació de la glucosa en animals joves que en animals adults¹⁴⁹.

LA VIA IGF/INSULINA

Els factors semblants a la insulina o Igf (*insulin growth factor*) i la pròpia insulina constitueixen una xarxa complexa que controla molts aspectes del metabolisme, el creixement i la supervivència en una àmplia gamma de teixits en mamífers¹⁵⁰. La senyalització Igf/Insulina també contribueix a la regulació de l'homeòstasi tissular, l'angiogènesi, l'adhesió, la migració cel·lular¹⁵¹ i té diversos efectes en el cervell¹⁵² mentre que la seva desregulació es relaciona amb la neoplàsia i altres alteracions¹⁵³. És per això, que l'estudi d'aquesta via de senyalització inclou d'una banda, el potencial terapèutic i d'altra el seu paper patogènic.

Components de la via Igf/Insulina

El sistema Igf/Insulina està format per la insulina i els factors de creixement Igf1 i Igf2, els seus respectius receptors de superfície: el receptor de la insulina (Insr), Igf1r, Igf2r, a més dels receptors híbrids formats per hemireceptors de Igf1r i Insr. També existeix un conjunt de sis proteïnes anomenades Igfbp (proteïnes d'unió als Igf) que s'uneixen als Igfs estabilitzant la seva senyalització. Els Igfs se sintetitzen principalment en el fetge però també es produeixen de manera local en un gran nombre de teixits, on poden actuar de forma autocrina i paracrina¹⁵¹, mentre que la insulina se sintetitza principalment per les cèl·lules β del pàncrees. A diferència de la insulina que circula a concentracions de l'ordre picomolar (pM), els Igfs ho fan a concentracions de l'ordre de nanomolar (nM).

El receptor de la insulina i de l'Igf1 són homòlegs i contenen múltiples dominis tirosina quinasa que uneixen la insulina i Igf1 amb diferents graus d'afinitat. De fet, el receptor de la insulina també participa en l'activació de senyals promogudes pels Igfs, així com els receptors híbrids que transmeten senyals citoplasmàtiques. Per altra banda, el receptor de Igf2 no està relacionat estructuralment ni amb el receptor Igf1 ni amb el receptor de la insulina. Tan Igf1r com Insr estan formats per dues cadenes α les quals uneixen el lligand, i dues cadenes β amb activitat tirosina quinasa. L'autofosforilació en els residus tirosina de Insr i Igf1r en resposta a la unió del lligand es produeix com una reacció intramolecular en trans on les tirosina quinases de la subunitat β fosforilen els residus de l'altra subunitat β . L'activitat tirosina quinasa de les subunitats β tant de l'Igf1r com de Insr són essencials per la seva senyalització ja que mutacions en el domini catalític resulten en l'aparició de resistència a la insulina. Malgrat la seva homologia estructural, la transducció del senyal a través dels receptors de insulina i de Igf1 resulta en respostes fisiològiques diferents encara que en ocasions existeixi un solapament en les vies que senyalitzen.

Les principals vies de senyalització mitjançant les quals Insr i Igf1r regulen el metabolisme i l'expressió de gens rellevants en cèl·lula β té com a protagonista la quinasa serina Akt. L'activació de Insr/Igf1r promou el reclutament dels substrats específics del receptor. Els més coneguts pertanyen a la família dels substrats del receptor de la insulina (Irs1-6), els quals actuen com a proteïnes armadura per tal d'organitzar i intervenir en els complexos de senyalització. Els Irs són fosforilats per l'activació dels receptors en dominis tirosina donant lloc a punts d'unió per altres molècules intracel·lulars que tenen homologia amb SH2 (*Src-homology 2*). Els Irs amb més impacte sobre la cèl·lula β i en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa són Irs1 i Irs2. El model animal deficient per Irs1 sistèmic exhibeix un defecte en el creixement i una alteració en l'acció de la insulina, especialment en múscle, no obstant, presenten una tolerància a la glucosa normal. Per altra banda, el model transgènic deficient per Irs2 sistèmic presenta un defecte en el creixement d'alguns teixits com les neurones i els illots pancreàtics, i també un defecte en la senyalització de la insulina en el fetge. Les isoformes Irs3 i Irs4 tenen un patró d'expressió tissular més restrictiu. En rosegadors Irs3 es troba molt expressat en adipòcits, fetge i pulmons, mentre que Irs4 es troba principalment en el múscul esquelètic, fetge, cor, cervell i ronyó. A part de les proteïnes Irs, els receptors de la insulina i Igf1r també poden fosforilar altres substrats com: les proteïnes Shc

(Ras/Erk), GAB, SHB2 i Cbl, entra d'altres¹⁵⁴. La via principal que uneix les proteïnes Irs amb les accions metabòliques de la insulina i Igf1 és la quinasa-PI3 (PI3K) i la senyalització d'Akt. Les PI3K són heterodímers formats per subunitats reguladores i catalítiques. El reclutament i l'activació de PI3K dependrà de la unió dels dos dominis SH2 en les subunitats reguladores tirosina quinasa de les proteïnes Irs¹⁵⁴. Un cop s'activa PI3K reclutarà Akt a la membrana plasmàtica per activar-la i continuar amb la via de senyalització. Per la completa activació d'Akt es requereixen dos llocs de fosforilació: T308 i S473. Existeixen tres isoformes diferents (Akt1, Akt2 i Akt3) totes elles expressades en cèl·lula β . L'activitat d'Akt és regulada per mecanismes dependents i independents de PI3K i requereix un gran nombre de senyalitzacions que inclouen translocacions de membrana i fosforilacions (Fig. 13). Akt fosforila diferents substrats que controlen diferents processos biològics incloent el transport de glucosa per insulina, la síntesi proteica i de glicogen, la proliferació, el creixement cel·lular⁸¹, la diferenciació i la supervivència cel·lular. En rosegadors l'activació d'aquesta quinasa és dependent de Irs2 i presenta una gran quantitat de proteïnes substrat, entre les quals s'inclouen la Gsk3 (quinasa glicogen sintasa 3 β) i el factor de transcripció FoxO1, ambdós quedant inhibits per la seva fosforilació. Per contra, Akt té altres dianes que en ser fosforilades s'activen, com mTOR, que al seu torn activa altres proteïnes implicades en aquest procés activant la síntesi proteica i també pot activar directament en serina/treonina a determinats factors de transcripció els quals contribueixen a promoure l'entrada al cicle cel·lular.

Per altra banda, la unió del lligand al receptor també provoca l'activació de la via de les proteïnes MAPK (quinases activades per mitògens). Aquesta activació s'aconsegueix per la interacció amb proteïnes adaptadores i quinases que acaben fosforilant a Erk1/2. L'activació de la ruta Ras/Raf i de la PI3K és un requisit essencial per la mitogènesi de la majoria de cèl·lules de mamífers. L'especificitat estimul-resposta és atribuïble en gran part al patró d'expressió dels receptors, però existeixen altres mecanismes desconeguts. Tot i així, cada vegada es veu més clar que l'associació preferencial amb substrats que senyalitzen de forma directa tenen un paper important en la determinació de l'efecte biològic de la unió del lligand a Insr o a Igf1r.

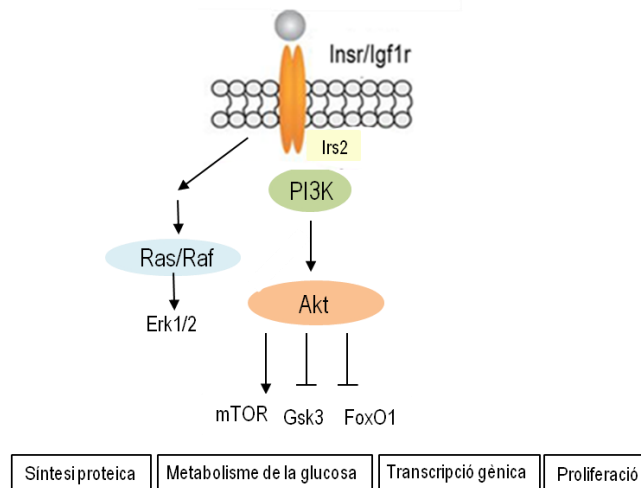


Figura 13. Representació esquemàtica de la via principal de senyalització de Insr/Igf1r. La unió del lligand promou l'activació de la quinasa PI3K la qual fosforilarà i activarà a Akt. Akt fosforilarà i inhibirà l'activitat de Gsk3 promovent i activant el metabolisme de la glucosa i FoxO1 permetent la proliferació de la cèl·lula β , mentre que promou l'activació de mTOR activant la síntesi proteica. Imatge adaptada de Kim et al¹⁵⁵.

El receptor de la insulina

El receptor de la insulina humana està codificat per un gen de 22 exons que comprèn 120 kb localitzat en el cromosoma 19 i en el cromosoma 8 de ratolins. Existeixen dues isoformes que difereixen en la inclusió (Insr-B) o exclusió (Insr-A) de l'exó 11, resultat del processament alternatiu de l'mRNA complet. Les seqüències involucrades en la regulació del processament del receptor d'insulina no es coneixen en detall. Tot i així hi ha alguns factors de splicing o processament que regulen el balanç entre les dues isoformes. Per una banda, Srsf1 i Srsf3, prèviament coneguts com a SRp20 i SF2/ASF respectivament, s'uneixen a les zones exòniques potenciadores de processament (*exonic splicing enhancers*), Mbn1 s'uneix a les zones intròniques de processament potenciadores (*intronic splicing enhancers*) i RBM4 s'uneix a zones riques en CG de l'exó 11 promovent un augment en els nivells de la isoforma Insr-B. Per altra banda, CUG-BP1 (CELF1/Elav1) promou l'exclusió de l'exó 11 unint-se a exons i introns silenciadors (Fig. 14). El balanç relatiu entre els diferents factors de splicing en els diferents tipus cel·lulars determinaran el grau d'inclusió de l'exó, i per tant els nivells d'expressió de cada variant¹⁵⁶. Recentment s'ha demostrat que la insulina regula de manera positiva la isoforma B en cèl·lules MIN6, en illots humans i també en rosegadors a través de l'augment en els nivells d'expressió gènica de Srsf1 dependent de l'activació de la via de senyalització Ras/Raf/Mek/Erk. També, les tècniques de purificació *RNA-affinity* i espectrometria de masses, han permès descobrir altres factors reguladors que promouen la inclusió de l'exó 11 (hnRNP F) i també la seva exclusió (hnRNP A1)¹⁵⁷. Així doncs, l'expressió relativa de les isoformes consta d'una xarxa de components molt complexa que depèn del tipus cel·lular, de l'estat de desenvolupament, l'edat i diferents estats de malaltia¹⁵⁸.

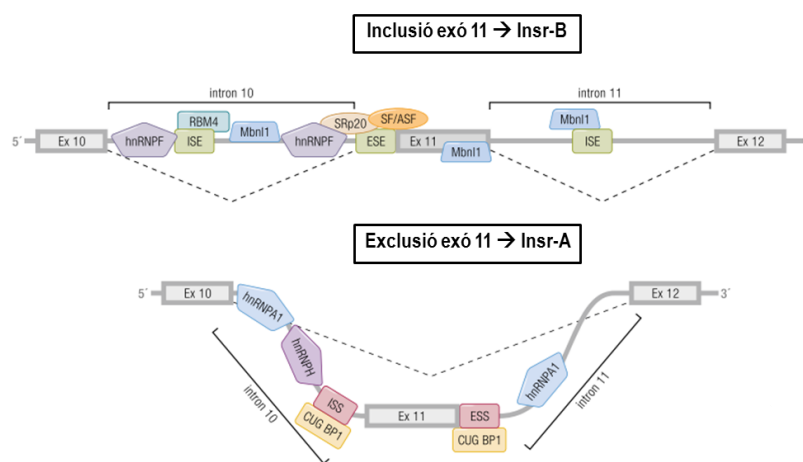


Figura 14. Esquema de la regulació del processament alternatiu del receptor de la insulina. Es mostren les seqüències Insr que codifiquen pels exons 10, 11 i 12 i pels introns 10 i 11. (A) Alguns factors de splicing regulen la inclusió de l'exó 11: SRp20 i SF2/ASF (s'uneixen a ESE=Exonic Splicing Enhancer), RBM4 (s'uneix a zones riques en GC), i Mbn1 (s'uneix a ISE= Intronic Splicing Enhancer), promovent l'expressió diferencial de Insr-B. (B) Factors que regulen Insr-A: Cugbp1 i hnRNP (s'uneixen a ESS= Exonic Splicing Silencer i ISS= Intronic Splicing Silencer) promovent l'exclusió de l'exó 11. Imatge modificada de Belfiore et al¹⁵⁹.

Insr-A i Insr-B exhibeixen diferències en perfils d'expressió, en l'afinitat pels lligands, en la capacitat d'activació de la via i en l'impacte sobre diferents funcions cel·lulars. Insr-A és rellevant durant l'embriogènesi i el desenvolupament fetal on potencia els efectes de Igf2, tot i així aquesta isoforma també s'expressa en teixits adults de manera ubiqüa, però especialment en tipus cel·lulars que no són dianes dels efectes metabòlics de la insulina on exerceix majoritàriament la regulació de creixement i

supervivència¹⁶⁰. Insr-A presenta una internalització i temps de reciclatge més ràpid, així com una menor capacitat de l'activitat tirosina quinasa. Igf1 també s'uneix amb gran afinitat a Insr-A però no tant elevada com és el cas de Igf2. Per altra banda, Insr-B s'expressa majoritàriament en l'etapa adulta en teixits ben diferenciats incloent les cèl·lules β del pàncrees, el fetge, el múscul, el teixit adipós, el ronyó, sent tots ells teixits diana del metabolisme de la insulina. No obstant, la majoria d'estudis del receptor de la insulina no han tingut en compte les diferents característiques funcionals de cada variant podent tenir efectes semblants depenent del context cel·lular i de desenvolupament en el que es trobin¹⁶¹. La insulina s'uneix amb alta afinitat a Insr-A i Insr-B però només s'uneix a Igf1r a nivells suprafisiològics ja que presenta una afinitat de 100 a 1000 vegades inferior que Igf1. L'Igf1 s'uneix amb alta afinitat a Igf1r i amb una afinitat unes 100 vegades inferior a la insulina a Insr. Igf2 s'uneix a Igf1r amb menor afinitat que Igf1, no obstant aquets lligand s'uneix amb molta afinitat a Insr-A només lleugerament inferior a la insulina¹⁶¹ (Fig. 15).

Les funcions específiques de cada isoforma del Insr a la cèl·lula β no estan ben establertes. La generació de línies cel·lulars β immortalitzades sense Insr procedents d'animals transgènics *Insr^{fl}* (*InsrLoxP*)¹⁶² ha permès discernir els efectes biològics associats a cada isoforma del receptor mitjançant la sobreexpressió específica de Insr-A o Insr-B en aquest model cel·lular¹⁶³. Els resultats demostren que les cèl·lules β que sobreexpressen Insr-A són més sensibles als efectes mitogènics induïts per Igf1 en comparació amb aquelles que sobreexpressen Insr-B¹⁶³. No obstant, Igf1 té una baixa afinitat per aquest receptor ja que principalment funciona a través d'un mecanisme Insr-A/Irs-1/2/Akt/mTORC1/p70S6K. Mentre que Igf1 senyalitza a través d'Akt i p70S6K en les cèl·lules β -Insr-A, les cèl·lules que sobreexpressen Insr-B segueixen la senyalització Erk1/2 en resposta a l'estimulació amb el lligand. En cèl·lules β de ratolí, Insr-A s'associa amb un augment en Glut1 i Glut2 afavorint la disponibilitat de glucosa i la seva senyalització per promoure la proliferació de la cèl·lula β ¹⁶³. Per altra banda, s'ha demostrat que la insulina activa la transcripció del seu propi gen *Ins* a través de la senyalització per Insr-A, mentre que promou la transcripció del gen *Gck* a través de la via que funciona per Insr-B en les cèl·lules β ¹⁶⁴. L'expressió aberrant de Insr-A afavoreix la resistència a teràpies anti-tumorals per diferents mecanismes que encara no es coneixen¹⁶⁰. El desequilibri del balanç entre Insr-A/Insr-B s'ha relacionat amb el desenvolupament de resistència a la insulina en pacients amb distrofia miotònica i també en pacients que presenten resistència a la insulina amb DM2¹⁶⁵. Tot i la rellevància de la biologia i el coneixement dels mecanismes d'aquest receptor en la cèl·lula β , el que determina l'abundància relativa de les diferents variants i el paper que juguen en la supervivència de la cèl·lula β tampoc es coneixen.

En humans, les concentracions d'insulina i proinsulina es troben altament correlacionades amb el pes al naixement, l'alçada i la circumferència del cap¹⁶⁶. La proinsulina generalment és considerada inactiva per la seva baixa activitat metabòlica i per la seva baixa afinitat pel receptor de la insulina i l'Igf1r quan ha sigut estudiada en hepatòcits i adipòcits. No obstant, la prohormona exerceix de reguladora durant el desenvolupament embrionari en rosegadors però els receptors a través dels quals porta a terme els seus efectes biològics són poc coneguts fins el moment. Malaguarnera et al. mostren com la proinsulina s'uneix i activa el receptor Insr-A amb una afinitat més elevada que no pas per Insr-B, induïnt d'aquesta manera l'estimulació de la proliferació i migració de la cèl·lula β tot i tenir uns efectes metabòlics baixos¹⁶⁷. No obstant, hi ha molts pocs treballs que caracteritzin els efectes específics de la proinsulina en la cèl·lula β així com en els receptors sobre els que actua.

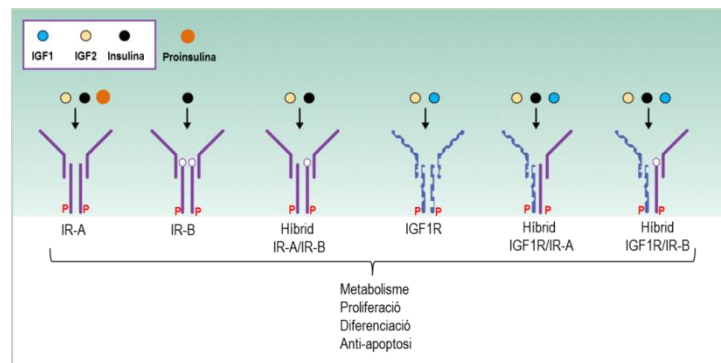


Figura 15. Representació esquemàtica dels diferents tipus de receptors simples i híbrids de la via de la Insulina/IGF i les diferents afinitats pels lligands (Igf1, Igf2, Insulina i Proinsulina). Imatge modificada de Pollak M. et al¹⁶⁸.

Conseqüències biològiques de la senyalització Igf1/Insulina

Els efectes de la insulina *in vivo* són predominantment metabòlics i engloben la utilització de proteïnes, lípids i carbohidrats per part del múscul, el fetge i el teixit adipós. Per altra banda, els Igfs actuen principalment com a factors mitogènics i antiapoptòtics, promovent la diferenciació i la proliferació de diferents tipus cel·lulars.

Les accions propoliferatives conegudes dels Igfs són en gran part el resultat dels seus efectes sobre la progressió del cicle cel·lular a través de canvis en els nivells de transcripció, la traducció i les modificacions post-traduccional d'efectors de cicle, incloent ciclines i les quinases dependents de ciclines així com dels seus inhibidors¹⁶⁹. Els Igfs poden influir en diversos punts de la progressió del cicle cel·lular però el seu paper principal se situa en la transició G1-S a través de la senyalització Pi3K/Akt i Erk1/2¹⁷⁰. Aquests efectes són crucials pel desenvolupament natural del fetus durant el període postnatal i en la pubertat pel desenvolupament dels ossos, la pell i els músculs i en pràcticament tots els òrgans de l'organisme, mentre que en l'etapa adulta aquests components juguen un paper molt important en la regeneració i la remodelació tissular. No obstant, els seus potents efectes mitogènics també es converteixen en objectiu per teràpies contra el càncer. Nombrosos estudis han demostrat que la inhibició de la senyalització d'Igf1 bloqueja la proliferació de cèl·lules tumorals *in vitro* i el creixement de tumor *in vivo*¹⁷¹. Les senyals de supervivència enviades a través de Igf1r protegeixen les cèl·lules dels estímuls apoptòtics, sent les vies PI3K/Akt i Ras/MAPK les principals implicades en aquesta senyalització.

Es coneix que la pròpia insulina regula de manera positiva la proliferació de la cèl·lula β de manera autocrina a través del seu receptor però no es coneixen els mecanismes tan en detall com en el cas dels Igfs, així com tampoc quins són els reguladors negatius d'aquesta via. No obstant, en els últims temps hi ha hagut interès en estudiar l'antagonisme/agonisme del receptor 1 de canabinoide (CB1R) en l'acció de la insulina en teixits sensibles a la hormona. L'expressió d'aquests receptors i la seva funció en els illots pancreàtics no està ben establerta. Kim W. et al demostra la detecció de nivells endògens de cannabinoides en la cèl·lula β , així com l'expressió del seu receptor CB1R, el qual s'activa amb la unió del lligand. El bloqueig genètic i farmacològic de CB1R produeix un augment en la senyalització del receptor de insulina a través de Irs2/Akt promovent un augment en la proliferació i en la massa cel·lular β . L'antagonisme de CB1R en ratolins *db/db* disminueix els nivells de glucosa en sang i també augmenta la proliferació i massa cel·lular amb la inducció de la senyalització a través de Insr. És més, l'activació de CB1R inhibeix l'activació de la via per insulina, inhibint l'autofosforilació del receptor en la cèl·lula β a través de la via $G\alpha$ -dependent¹⁵⁵. Un altre regulador negatiu conegut de la via de la insulina és PTP1B (tirosina fosfatasa 1B). Illots isolats de ratolins deficientes per PTP1B mostren un increment en la

proliferació i apoptosi involucrant proteïnes com STAT3, Akt, Erk1/2 i p53, així com un augment en la GSIS. És més, aquests animals tenen una àrea fraccional de cèl·lula β major en comparació amb el grup control¹⁷².

La via Igf1/Insulina en la regulació de la massa cel·lular β

La via de la Igf1/Insulina és una de les senyalitzacions més conegudes implicades en la regulació de la plasticitat de la massa cel·lular β . Dècades enrere s'havia demostrat el paper de la insulina en el creixement de la cèl·lula β ¹⁷³, mentre que a Igf1 se l'hi atribuïa tenir un paper més rellevant en la regulació de la diferenciació cel·lular^{174,175}.

En els últims anys ha estat difícil discernir el paper individual de la insulina *versus* la pròpia glucosa. Nivells elevats de glucosa en sang que porten a un augment en els nivells d'insulina, podrien ser els principals inductors de l'expansió de la massa cel·lular β en resposta a la hiperglucèmia. Hi ha varis estudis que demostren que la pròpia glucosa, en comptes de la insulina, és crítica per l'estimulació del creixement de l'illot. Els primers estudis amb animals transgènics generats per estudiar aquesta via de senyalització eren deficients pels gens *Ins1*^{-/-} i *Ins2*^{-/-}. Aquests ratolins exhibien un retard fetal en el creixement i una mortalitat neonatal associada a una cetoacidosi diabètica¹⁷⁶. Però sorprenentment, l'àrea dels illots dels nonats es trobava augmentada, un patró també present en animals adults deficients per un dels dos gens *Ins1*^{-/-} o *Ins2*^{-/-177}. Encara que aquests resultats no puguin excloure la clara contribució de la via Igf1 a través de *Insr*, es demostra que la insulina per ella mateixa no és indispensable per l'expansió de la massa cel·lular β en l'etapa del desenvolupament embrionari. No obstant, la importància relativa de la glucosa *versus* la insulina és un tema que queda en debat ja que el seu paper en la regulació de l'expansió de la massa cel·lular β no es pot tractar de manera independent. La glucosa i la via de Igf1/Insulina actuen de manera conjunta ja sigui per portar a terme una resposta fisiològica o bé per potenciar-la i donar lloc a un estímul sinèrgic en el creixement cel·lular β en una situació de demanda de insulina. Totes aquestes evidències científiques posen en manifest que els factors de creixement, la insulina, les incretines i la pròpia glucosa convergeixen en l'activació de la via de senyalització PI3K/Irs2/Akt per tal de regular la massa cel·lular β .

El model transgènic deficient per *Insr* específic de cèl·lula β (β IRKO) exhibeix una intolerància progressiva a la glucosa, que ve acompanyada de defectes en la primera fase de secreció de insulina¹⁷³. Seguidament es va demostrar que tan els animals β IRKO hiperglucèmics com els que no ho són, presenten una reducció significativa en la massa cel·lular β i en el nombre d'illots, confirmant la rellevància d'aquesta senyalització inclús en absència de nivells elevats de glucosa en sang. A més, la deficiència de *Insr* porta a una reducció contingut d'insulina¹⁷⁸. Per altra banda, el model animal sistèmic deficient per Igf1r (β IGF1RKO) exhibeix una reducció en l'àrea de l'illot pancreàtic en l'etapa final del desenvolupament embrionari i a P0.5 ja que presenta una letalitat postnatal molt temprana amb un dèficit de creixement molt evident¹⁷⁹. En canvi, l'ablació de Igf1r en cèl·lula β (β IGF1RKO) no té efecte sobre la massa cel·lular β , així com tampoc en el contingut de insulina dels illots, suggerint un paper dominant de la insulina en la senyalització Igf1/Insulina en l'estimulació de l'expansió postnatal de la cèl·lula β i descartant una funció crítica de Igf1 en aquest procés¹⁷⁵. En línia amb aquests resultats, la sobreexpressió transgènica de la proteïna recombinant humana Igf1 en ratolins tampoc demostra tenir cap efecte sobre la massa cel·lular β ¹⁸⁰. No obstant, el model de ratolí gen anul·lat doble per *Insr* i Igf1r (β IRKO/ β IGF1RKO) en cèl·lula β desenvolupa una diabetis més temprana que en els models animals anteriors, juntament amb un augment en els nivells de mort cel·lular i una reducció de la massa cel·lular β evident des de p14, una etapa en la que els ratolins β IRKO encara tenen una massa normal. Aquest resultat suggereix un funció diferencial de la senyalització Igf1r depenent del seu context en la regulació

de la massa β o bé, un paper addicional en la toxicitat de glucosa imposada pel defecte en la senyalització Igf1r¹⁸¹.

La disrupció genètica d'altres components de la via de senyalització de Igf1/Insulina situats sota els receptors també s'ha estudiat que altera la massa cel·lular β . Per exemple, la deficiència global de Irs2, però no de Irs1, resulta en una alteració en l'expansió β neonatal, abans de l'aparició de la resistència perifèrica a la insulina, així com un defecte en l'adaptació de la cèl·lula β en resposta a la pèrdua de sensibilitat a la insulina i un augment en els nivells d'apoptosi¹⁸². Pel que fa a Akt, la reducció del 80% en la seva activitat produeix un defecte clar en la secreció de insulina¹⁸³. També s'ha avaluat el seu paper en diferents models animals deficients per les isoformes de la quinasa¹⁸³. Els animals deficients per Akt 1^{-/-} exhibeixen una hipotrofia placentària, retard en el creixement i una reducció en el pes corporal, mentre que els Akt 2^{-/-} desenvolupen intolerància a la glucosa i resistència a la insulina i finalment, els animals deficients per Akt 3^{-/-} exhibeixen una reducció en la mida del cervell. Aquests resultats suggereixen que Akt 2 és la isoforma més rellevant en la modulació de la sensibilitat a insulina i el metabolisme de la glucosa. No obstant, l'impacte específic en la massa i funcionalitat de cada isoforma d'Akt en la cèl·lula β queda pendent d'elucidar. Contràriament, la sobreexpressió constitutiva d'Akt en ratolins transgènics resulta en un augmenta en la proliferació i massa cel·lular β , juntament amb un augment en els nivells de neogènesi i en la mida cel·lular β ^{81,184}. Aquests efectes semblen ser dependents de cdk4 promovent la inducció de l'expressió de *Ccnd1*, *Ccnd2* i l'inhibidor de cicle *Cdkn1a*¹⁸⁵.

A nivell fisiològic, la inactivació de la quinasa Akt ve donada per la fosfatasa PTEN (homòleg de la tensina i la fosfatasa). La deleció de la fosfatasa en cèl·lula β millora la tolerància a la glucosa i augmenta la proliferació de la cèl·lula β i promovent l'activació de la senyalització d'Akt, TSC/mTOR i S6K. No obstant, aquests estudis s'han realitzat utilitzant *Ins2^{Cre}*, aleshores també s'observen efectes secundaris a teixits perifèrics degut a la ubiqüitat del promotor¹⁸⁶. Per altra banda, l'ablació específica en cèl·lula β de PDK1, la serina/treonina quinasa que fosforila i activa a Akt resulta en l'aparició de diabetis associada a una disminució en la densitat i mida dels illots¹⁸⁷. L'ús de la quinasa Akt com a ús terapèutic presenta el risc d'induir transformació oncogènica per la seva gran capacitat de promoure la proliferació cel·lular. La millora en el coneixement d'aquestes senyalitzacions permetrà desenvolupar nous fàrmacs que es puguin utilitzar per expandir la massa cel·lular β *in vitro* i *in vivo*, com a teràpia alternativa de la diabetis. Tots aquests estudis en models animals confirmen la rellevància de la senyalització de la insulina i, no tant de Igf1, en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa i la proliferació de la cèl·lula β .

Tal i com hem mencionat anteriorment, FoxO1, Gsk3 β i TSC2/mTOR són dianes principals d'Akt que participen en els processos de síntesi proteica, el metabolisme de la glucosa i la proliferació de la cèl·lula β (Fig.16).

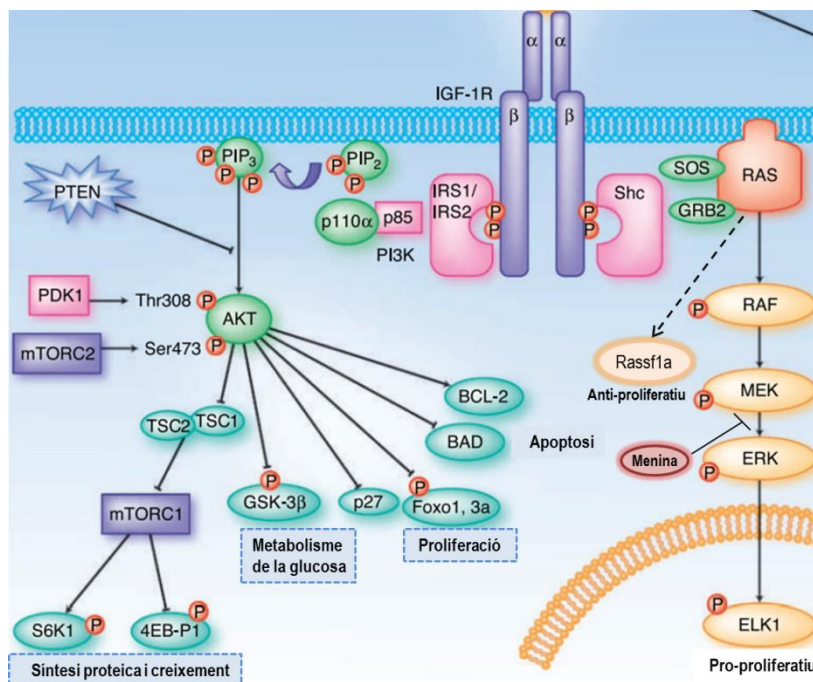


Figura 16. Les vies de senyalització PI3K/Akt i Ras/Raf/Mek/Erk. Existeix una connexió important entre aquestes dues vies de senyalització on diferents receptors tirosina quinasa (RTK) poden intervenir. L'activació del receptor per unió del lligand insulina o IGF1 promou l'autofosforilació de les cadenes β permetent la unió en els llocs d'adaptació de Irs1, Irs2 i Shc. La unió de Irs1 i Irs2 resulta en l'activació de PI3K que catalitza la transformació de PIP2 a PIP3. Aquesta reacció recluta Akt a la membrana plasmàtica la qual serà fosforilada i activada per acció de PDK1 i mTORC2. L'activació d'Akt induïx la regulació d'un gran nombre de senyalitzacions, incloent l'activació del complexa mTORC1 promovent un augment en la síntesi proteica i creixement cel·lular, la inhibició de Gsk3 β , i l'augment de la proliferació i supervivència per activació o inhibició de d'efectors claus com és FoxO1, p27, BAD i Bcl-2. Per altra banda, la unió de Shc al receptor promou l'estimulació de la via Ras/MAPK, la qual també promou la proliferació de la cèl·lula β . L'activació de Ras també pot activar-se directament pels receptors PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) i altres RTKs activant dues cascades principals: la pro-proliferativa Raf/Mek/Erk o la anti-proliferativa Rasf1a. La Menina determina els efectes de la proliferació inhibint la via pro-proliferativa de la senyalització. Imatge adaptada de Zha et al ¹⁸⁸.

La sobreexpressió de FoxO1 de manera constitutiva en cèl·lula β mostra el seu paper en la proliferació i efectes de supervivència¹⁸⁹. Per altra banda, la sobreexpressió de Gsk3 β en cèl·lula β induïx intolerància a la glucosa i una reducció en la proliferació i massa cel·lular β associada a una disminució en els nivells d'expressió de *Ccnd1* i del factor de transcripció *Pdx1*. No obstant, els mecanismes implicats en la modulació de la massa cel·lular per Gsk3 β no estan del tot elucidats¹⁹⁰. Els nutrients i els factors de creixement regulen l'activitat de mTOR a través dels complexos Tsc1 i 2 (*tuberous sclerosis complex 1 i 2*), així com de proteïnes G petites Ras (Rheb). En mamífers TOR es troba en dos complexos diferents: mTORC1 (mTOR i Raptor) i mTORC2 (mTOR i Rictor), sent el primer sensible a rapamicina. La senyalització d'Akt sobre mTORC1 regula el creixement cel·lular (mida cel·lular), la proliferació (nombre de cèl·lules) i el metabolisme de la glucosa modulant directament la funció de 4E-BP1/2 i S6K1/2, i indirectament atenuant la senyalització d'Akt a través d'un loop de retroalimentació negativa de mTORC1/S6K1¹⁹¹. La principal funció 4E-BP1/2 és actuar com a repressor de la traducció proteica mentre

que S6K1/2, que promou l'activació de la proteïna ribosomal S6 de la subunitat 40S, regula principalment el creixement cel·lular en mida i nombre.

Ratolins deficients per S6K exhibeixen una reducció en la massa cel·lular β , hipoinsulinèmia i intolerància a la glucosa¹⁹². mTORC1 regula la progressió del cicle cel·lular en la cèl·lula β a través de la regulació dels nivells de *Ccnd2* i *Ccnd3*, així com de l'activitat del complexa Cdk4/ciclina D. La deficiència de Rictor en cèl·lula β té com a conseqüència una lleugera hiperglucèmia i l'aparició d'intolerància a la glucosa causada per una reducció en la massa cel·lular β , la proliferació, el contingut de insulina i la secreció de insulina estimulada per glucosa. A més a més, aquests illots gen anul·lat presenten uns nivells d'activació menors d'Akt i un augment en els nivells proteics de FoxO1¹⁹³. La importància d'aquesta via en la regulació de la proliferació de la cèl·lula β també s'ha demostrat en ratolins que tenen inhibit mTORC1 per rapamicina i que exhibeixen un bloqueig en la inducció de la proliferació induïda per la fosforilació d'Akt. Aquest efecte antiproliferatiu s'associa principalment a una alteració en la síntesi i estabilitat de la ciclina D2¹⁹⁴. Estudis recents demostren el paper de mTORC2 en la regulació de la funció i massa cel·lular β . mTORC2, un component clau en la senyalització del receptor del factor de creixement, es troba disminuït sota condicions diabetogèniques en les cèl·lules β , així com en illots de pacients amb DM2. La inactivació específica en cèl·lula β mTORC2 resulta en l'aparició de intolerància a la glucosa i diabetis relacionat directament amb una reducció en la massa cel·lular β , la proliferació i amb una GSIS alterada. Aquest resultat demostra la participació d'aquest complexe en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa, particularment pel manteniment d'una resposta compensatòria adequada de la cèl·lula β en presència de nutrients i d'una demanda metabòlica¹⁹⁵.

La inducció de l'activació de dianes inhibides per Akt en la senyalització per insulina com són FoxO1 i Gsk3 β i la deleció d'aquelles que són activades, com és S6K, tenen un impacte negatiu sobre l'expansió de la massa cel·lular β . Tots aquests estudis demostren clarament que la via de senyalització Irs2/Pi3K/Akt juga un paper crític en la regulació de la massa i funcionalitat de la cèl·lula β , tenint com a protagonistes de la senyalització FoxO1, GSK3 β i Tsc2/mTOR. Tot i així, els mecanismes moleculars específics responsables de les alteracions en la proliferació i apoptosi intervinguts per diferents dianes de la part inferior de la via de senyalització encara no han sigut completament caracteritzats.

Finalment, la via de senyalització de les MAPKs també té un paper central en la regulació de la proliferació de la cèl·lula β a través de l'activació seqüencial de les proteïnes Ras/Raf/Mek/Erk. La cascada de senyalització també és iniciada per l'activació de receptors amb activitat tirosina quinasa com la insulina i l'Igf1. No obstant, hi ha un gran nombre de mitògens que indueixen la seva activació en la cèl·lula β , com són els lligands PDGF, proteïnes de la família EGF, i la prolactina. A la part inferior de la via, quan Erk esdevé fosforilat pot promoure l'activació d'altres quinases o bé translocar cap el nucli per tal de promoure la transcripció de factors proproliferatius com són c-Jun, c-Myc i c-Fos. No obstant, un estudi amb un model de ratolí deficient per la senyalització K-Ras exhibeix un augment en la massa cel·lular β ¹⁹⁶ mostrant un paper antiproliferatiu de la senyalització MAPK intervingut per la senyalització Rassf1a. El balanç entre efectes pro- o anti-proliferatius derivats de l'activació de Ras venen determinats per l'activitat de la menina¹⁹⁶, una proteïna que bloqueja la senyalització pro-proliferativa d'Erk afavorint la via inhibidora de Rassf1a.

CONNEXIÓ ENTRE L'AMPc I LA VIA IGF1/INSULINA

Les vies de transducció de senyal que participen en els diferents processos de funcionalitat cel·lular i que donen lloc a respostes intracel·lulars són molt complexes. En la majoria de casos existeix una intercomunicació entre diferents vies que comparteixen efectors i mediadors cel·lulars per tal d'establir les connexions a diferents nivells de la senyalització. Aquest fet dona lloc a xarxes de senyalització altament complexes en les que, en ocasions, és complicat aïllar i poder elucidar els mecanismes i components característics d'una via en particular.

Anàlisis comparatius de transcriptòmica demostren que l'expressió gènica de *Igf1r* es troba fortament reduïda en els illots isolats d'animals amb delecció específica dels receptors de Gp1 i de Gip a la cèl·lula β ¹¹⁰ suggerint l'existència d'una connexió entre les vies de incretines-GPCR-Gs i Igf1/Insulina. En aquesta mateixa línia, Cornu et al. mostren que Gp1 disminueix els nivells d'apoptosi de la cèl·lula β a través de l'activació de la senyalització Igf1r/Akt de manera dependent a un augment en els nivells de la secreció de Igf2 per la cèl·lula β ¹¹⁰. Un any més tard, el mateix grup estudia en més profunditat com Gp1 induïx la transcripció de *Igf1r* a través del loop autocrí Igf2/Igf1r millorant la tolerància a la glucosa i augmentant la proliferació de la cèl·lula β . En aquest treball s'observa que l'augment moderat en els nivells d'AMPc induïts per Gp1 incrementen l'expressió gènica de *Igf1r* a través d'un mecanisme dependent de PKA, mentre que un augment més agut en els nivells del segon missatger incubant amb IBMX (3-isobutil-1-metilxantina), un inhibidor competitiu no específic de PDE, promou un increment en la transcripció i també en la traducció de *Igf1r*. Per tant, conclouen que la regulació del nombre i funcionalitat de la cèl·lula β en resposta a Gp1 és dependent de la via AMPc/PKA i ve mediada per l'activitat del loop autocrí Igf2/Igf1r¹⁹⁷. Per altra banda, la sobreexpressió de Gp1r humana en ratolins deficientes pel receptor tan en cèl·lula β com en el ductes pancreàtics, recupera l'homeòstasi de la glucosa i l'estimulació per AMPc promovent la fosforilació d'Akt en illots aïllats¹⁹⁸. És més, en presència de glucosa, l'exendina-4 estimula la replicació de les cèl·lules β a través de l'activació del loop autocrí o paracrí d'Igf1r que induïx S6K1 per l'activació dependent d'Akt i el complexa mTORC1⁸⁵.

Un altre punt d'interacció entre les vies Gs-cAMP i Igf1/Insulina és a nivell del factor de transcripció Creb. A banda de la glucosa i els lligands dels GPCRs, la via de senyalització Igf1/Insulina també ha demostrat activar a Creb en la cèl·lula β (Fig. 17).

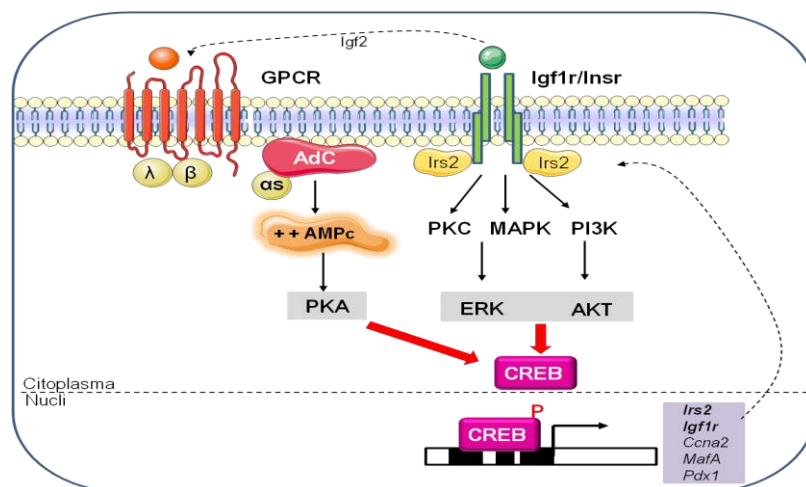


Figura 17. Esquema general sobre la regulació del factor de transcripció Creb en la cèl·lula β a través de la via GPCR-AMPc/PKA i la via d'Igf1/Insulina, així com la seva intercomunicació.

En el 2002, Liu et al. va demostrar que IGF1 fosforila i augmenta l'activació transcripcional de Creb a través de la cascada d'activació Erk1/2 en la línia cel·lular β INS-1 de manera ràpida i transitòria ¹⁹⁹. No obstant, són necessaris estudis que identifiquin el paper de la senyalització Erk1/2/Creb promoguda per IGF1 en la cèl·lula β , així com determinar si l'activitat transcripcional i l'especificitat de Creb també són controlats per proteïnes associades que podrien estar regulades per IGF1. Tal i com hem comentat anteriorment, la glucosa i Glp1 convergeixen en l'activació de Creb portant a un augment en els nivells de transcripció de *Irs2* i *Igf1r*. Això, a la vegada, activa la via de IGF1r afavorint la fosforilació d'Akt/PKB en resposta a IGF1 a la cèl·lula β ¹¹⁵. A més, l'augment en els nivells del segon missatger AMPc per activació de GPCR-Gs promou la secreció d'insulina la qual s'unirà al seu receptor Insr quan surti a l'espai extracel·lular activant la via de senyalització IGF1/insulina ²⁰⁰.

En conjunt, aquests estudis demostren l'existència d'una estreta connexió entre la via de l'AMPc i la via de IGF1r a la cèl·lula β .

OBJECTIUS

Aquesta tesi té com a objectiu general investigar el paper de la via de transducció de senyal regulada per Gs/AMPC en l'establiment de la massa cel·lular β pancreàtica. Amb aquesta finalitat, hem caracteritzat el model murí deficient per la subunitat α de la proteïna Gs α específic de cèl·lula β (β -Gs α KO).

Els objectius específics són:

- Caracteritzar fenotípicament els animals β -Gs α KO.
- Identificar les alteracions moleculars dels illots β -Gs α KO implicades en el fenotip descrit en el primer objectiu.
- Establir la contribució de la connexió de les vies Gs/AMPC i Igf1/Insulina en el fenotip dels ratolins β -Gs α KO descrit en objectius anteriors.

Els resultats derivats d'aquesta tesi permetran aprofundir sobre els mecanismes moleculars que participen en l'expansió i plasticitat de la massa cel·lular β els quals serviran per identificar noves dianes terapèutiques pel tractament i la cura de la diabetis.

MATERIALS I MÈTODES

ANIMALS

Tots els animals utilitzats en aquesta tesi s'han mantingut a l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona (UB). Els protocols s'han realitzat seguint les normes de manipulació d'animals d'experimentació prèviament autoritzats pel comitè ètic d'experimentació animal de la Universitat de Barcelona. Els ratolins emprats han sigut mascles i femelles si es tractaven d'edats menors a les quatre setmanes de vida (p28) o bé només mascles si es tractava d'animals adults. Els animals s'han mantingut en habitacions amb cicles de 12/12 h claror/fosc en un ambient de temperatura i humitat controlats sota condicions específiques lliures de patògens. Els ratolins han sigut alimentats *ad libitum* amb una dieta de pinso estàndard (tipus AO4, Panlab, Barcelona, Espanya). L'accés a l'aiguda de beguda ha sigut lliure durant tot el procés experimental.

- *Gnas^{ff}*

Lee S. Weinstein et al. (Metabolic Diseases Branch and Mouse Metabolism Core Laboratory, NIDDK, NIH, Bethesda, Maryland, USA) va generar l'animal transgènic portador de l'alel condicional floxejat del gen *Gnas* (*Gnastm1Lsw*). Els llocs loxp es troben flanquejant l'exó 1 d'aquest gen. El mètode emprat per l'elaboració d'aquest model animal es basa en la tècnica d'enginyeria cromosòmica de l'any 2001 anomenada "Recombineering"²⁰¹. Mitjançant aquest mètode s'introdueixen els llocs loxP i les marques de selecció positiva i negativa dins d'un plàsmid d'alta còpia per recombinació homòloga que conté prèviament clonada la seqüència que es vol silenciar. Llavors, la zona del plàsmid que conté el material d'interès s'escindeix i es transforma al locus gènic corresponent de les cèl·lules mare. Aquelles cèl·lules que hagin introduït la regió d'interès, podran ser seleccionades i es tirarà endavant amb el naixement de ratolins portadors de l'alel condicional en qüestió.

- *Ins2Cre*

Aquests animals expressen la recombinasa Cre amb una senyal de poliadenilació de l'hormona del creixement humana sota el control del promotor de la insulina de rata 2 (*Ins2/Rip*)²⁰² el qual és actiu en les cèl·lules β i en les neurones de l'hipotàlem. S'estima la presència de 9 còpies del transgèn en el cromosoma 7 donant lloc a la duplicació de 17400 parells de bases (pb). Aquest model animal transgènic ha rebut diferents noms a la literatura científica: *Ins2Cre*, *Ins-Cre*, *RIP2-cre*, *RIP2^{Cre}*, *Rip-cre*, *RIPCre*, *[RIP]-Cre*, *RIP Cre*, *TgN(ins2-Cre)25Mgn*.

- *Ins1^{Cre}*

El model animal *Ins1^{tm1.1(cre)Thor}* generat per Ferrer J. et al. és un model *knockin* que expressa la recombinasa Cre al codó d'inici del locus *Ins1* seguit del *cassette* de resistència a neomicina flanquejat per FRT, que substitueix la seqüència codificant de la insulina. La recombinació intervinguda per Flp elimina el *cassette* flanquejat per FRT. L'avantatge principal d'aquest model transgènic respecte el *Ins2^{Cre}*, és l'especificitat del promotor *Ins1* a la cèl·lula β evitant possibles efectes secundaris de la delecció dels gens d'interès en altres teixits.

- *Rosa26^{YFP/YFP}*

Els animals transgènics *Gt(ROSA)26Sor^{tm1Hjf}* contenen la proteïna fluorescent YFP (proteïna groga fluorescent) situada en el locus *Rosa26*. Aquesta YFP ve precedida per un codó d'aturada flanquejat per seqüències LoxP les quals seran escindides quan s'expressi la recombinasa Cre permetent l'emissió de la fluorescència de YFP.

Implicació de la senyalització dependent de Gsα en l'establiment de la massa cel·lular β

- C57BL/6J

Els ratolins C57BL/6J adults s'han comprat de Charles River (Wilmington, MA, USA) d'edats compreses entre 8-10 setmanes.

Obtenció del models animals

En aquesta tesi per tal d'obtenir ratolins deficients per la subunitat Gs en cèl·lula β, hem creuat ratolins mascles *Ins1^{Cre/+} Gnas^{f/+}* amb femelles *Gnas^{ff}*, obtenint tres tipus de genotips diferents tal i com es mostren a la taula següent:

<i>Ins1^{Cre +/-} Gnas^{f/+}</i>	Heterozigot (Hzt)
<i>Ins1^{Cre +/-} Gnas^{ff}</i>	β-Gsα KO
<i>Gnas^{ff}</i>	Control
<i>Gnas^{f/+}</i>	Control

Per la realització dels experiments hem seleccionat els animals control i β-Gsα KO.

Per altra banda, per l'obtenció dels animals control i deficients per Gs en cèl·lula β que expressin la proteïna fluorescent YFP, hem realitzat dos creuaments independents per generar cada un dels genotips. Per obtenir els animals control hem creuat mascles *Ins1^{Cre/+} Gnas^{f/+}* amb femelles *Rosa26^{YFP/YFP}* seleccionant de les generacions obtingudes els ratolins *Ins1^{Cre/+}; Rosa26^{YFP/+}* com a controls d'aquests experiments. Per obtenir els animals deficients per Gsα hem creuat mascles *Ins1^{Cre/+} Gnas^{f/+}* amb femelles *Gnas^{ff}; Rosa26^{YFP/YFP}*, seleccionant els animals *Ins1^{Cre/+} Gnas^{ff}; Rosa26^{YFP/+}*, els quals anomenarem a partir d'ara β-GsαKO YFP.

Genotipatge

En primer lloc per tal de procedir a l'extracció del DNA genòmic i realitzar l'amplificació per PCR convencional, es pren un tros de cua i es digereix submergint-la en 600 μl de NaOH a 100°C al bloc tèrmic durant 10 minuts seguit de l'adició de 100μl del tampó TRIS 1M pH=8. Per l'amplificació per PCR s'agafa el sobrenedant el qual conté el DNA.

Per tal de testar el genotip dels animals es realitzen dues amplificacions diferents. Per una banda la recombinasa (*Ins1^{Cre}*) i per altra banda la dels al·lels floxejats del gen *Gnas*. Hem utilitzat 2 parells d'encebadors diferents i la barreja DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific):

Cre F 5'-TGCCACGACCAAGTGACAGC-3'

Cre R 5'-CCAGGTTACGGATATAGTTC-3'

Gnas F 5'-CTGCCTCGGCAACAGTAAGA-3'

Gnas R 5'-AGACCTGCTTGCTTCTGC-3'

El protocol que hem seguit per tal de genotipar els animals és el següent:

Protocol	
Afegir en un tub de 0.2 ml:	
• DreamTaq Master Mix (Thermo Scientific)	10 µl
• Encebador F Gnas	0,2 µl
• Encebador R Gnas	0,2 µl
• Encebador F Cre	0,2 µl
• Encebador R Cre	0,2 µl
• H ₂ O	8,2 µl
• DNA	1 µl
Mesclar i centrifugar breument	
Introduir en el termociclador les següents condicions:	
• 95°C 3 min	
• 35 cicles: 95°C 30s + 60°C 30s + 72°C 1min	
• 72°C 10min	
• 4°C ∞	

Després de la PCR amb els encebadors corresponents, separem les bandes emprant un gel d'agarosa del 3% ja que volem separar bandes d'una mida inferiro a 200 parells de bases. Els gels d'agarosa permetent separar les amplificacions realitzades per PCR segons la seva mida, o els productes d'una digestió.

Protocol (gel d'agarosa) – gel mitjà de 150 ml al 3%	
Barrejar:	
○ Agarosa (Sigma).....	4.5g
○ Solució TAE (Tris, acètic i EDTA) 1X	150ml
Dissoldre l'agarosa en el microones	
Afegir 15µl de Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics)	
Traspasar la preparació en un suport de polimerització i deixar-ho solidificar amb una pinta per formar els pous	
Una vegada solidificat, retirar la pinta i col·locar el suport amb el gel en una cubeta amb tampó TAE 1x	
Carregar un marcador de pes molecular 100bp i les mostres	
Sotmetem el gel a una potència d'uns 120V, fins que el front avanci suficientment per poder distingir les bandes i observar-les amb un transil·luminador de llum ultraviolada.	

EXTRACCIÓ I OBTENCIÓ DE FLUIDS I TEIXITS

Determinació de la glicèmia, obtenció de plasma

Abans del sacrifici dels animals en la seva edat corresponent (p0, p7, p14, p28 i adult) hem mesurat la glicèmia amb un glucòmetre (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japan) d'una gota de sang provinent de la vena de la cua en animals dejunats (IpGTT, OGTT, GSIS) o alimentats (mesures de glucosa en sang en totes les edats estudiades). Les mostres de sang es recullen en Microvettes que contenen EDTA (Starstedt, Nümbrecht, Germany) i es centrifuguen durant 15 min a 3600rpm a 4°C. Es recull el sobrenedant on hi haurà el plasma i es passa en un nou tub per congelar-ho a -80°C fins al moment de la utilització de la mostra per realitzar l'ELISA de mesura dels nivells d'insulina.

Obtenció del pàncrees

Tan per l'extracció de pàncrees sencer com per l'aïllament d'illots pancreàtics, els animals han sigut sacrificats per dislocació cervical. Els pàncrees sencers s'han extret, pesat, rentat amb una solució de PBS 1x (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) i fixats en formalina o PFA al 4% per ser inclosos posteriorment en parafina. Per l'obtenció dels illots, després d'injectar la solució de col·lagenasa pel colèdoc, s'extreu el pàncrees i es conserva en la mateixa solució de col·lagenasa que es manté en gel fins el següent pas de l'isolament d'illots.

TESTS METABÒLICS

Els tests metabòlics s'han realitzat en animals control i β -Gsa KO de 4 a 6 setmanes d'edat després d'un dejuni de 6 hores.

Glicèmia i insulinèmia

La glucèmia s'ha mesurat a la vena de la cua amb el glucòmetre (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japan) en ratolins alimentats (insulinèmies i glucèmies aleatòries) o bé dejunats durant 6 hores (tests metabòlics). Les mostres de sang de ratolins alimentats (insulinèmies aleatòries) o bé dejunats durant 6 hores (insulinèmies dels tests metabòlics) s'han recollit en tubs Microvettes que contenen EDTA (Starstedt, Nümbrecht, Alemanya) per tal de mesurar la insulina. Els tubs microvettes amb les mostres de sang corresponents s'han centrifugat (3500 rpm a 4°C durant 20 minuts) i seguidament s'ha recollit el sobrenedant plasmàtic cap a un tub nou. Els plasmes s'han congelat a -20°C fins el dia de la mesura d'insulina utilitzant el kit Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit (Crystal Chem, Elk Grove Village, IL, USA). S'ha seguit el següent protocol:

Protocol
1. Afegir en cada pou 95 μ l de diluent de la mostra
2. Pipetejar en cada pou 5 μ l de cada calibrador per realitzar la corba estàndard (per duplicat) i 5 μ l de cada mostra
3. Incubar la placa durant 2 hores a 4°C
4. Fer cinc rentats a la placa amb la solució de rentat del kit
5. Pipetejar 100 μ l de l'enzim conjugat a cada pou
6. Incubar la placa durant 30 minuts a temperatura ambient i agitació suau
7. Pipetejar 100 μ l de solució del substrat de l'enzim a cada pou
8. Incubar la placa durant 40 minuts a temperatura ambient, agitació i en la foscor
9. Passat el temps d'incubació, parar la reacció enzimàtica afegint a cada pou 100 μ l de solució de parada
10. Llegir la placa en un espectrofotòmetre per colorimetria (Synergy HT, BioTek) a una absorbància de 450nm i 630nm. Calcular la concentració d'insulina a través de la corba estàndard.

Test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (IpGTT)

Amb aquest test es valora principalment la capacitat del pàncrees a l'hora de secretar insulina després d'una estimulació amb glucosa, alhora que també la participació dels teixits perifèrics en la captació de glucosa en sang fins arribar als valors de normoglicèmia.

Després de les 6 hores de dejuni, hem injectat a nivell intraperitoneal D-glucosa (sèrum glucosat hipertònic al 40%, Frenesius Kabi, Barcelona, Espanya) a 2g/kg de pes de l'animal. Posteriorment, es fa

un petit tall a la cua de l'animal per tal d'extreure una gota de sang i mesurar la glucèmia amb el glucòmetre (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japan) en cada punt: 0-15-30-60-120 minuts després de la injecció de glucosa. De forma paral·lela a cada temps es recull el plasma dels animals per capillaritat en un microvette-EDTA. Es centrifuguen les mostres a 3500 rpm durant 15 minuts a 4°C per separar els eritròcits, leucòcits i plaquetes. S'agafa el plasma i es guarda en un nou tub a -80°C fins a la seva utilització. Amb el plasma que hem obtingut, mesurarem les insulinèmies utilitzant la tècnica ELISA.

Test de secreció d'insulina estimulada per glucosa (GSIS)

Amb aquest test es valora principalment la capacitat del pàncrees a l'hora de secretar insulina després d'una estimulació amb glucosa però d'una manera més aguda que en el cas anterior, ja que la dosi de D-glucosa és de 3g/kg i es mesura la glucèmia amb el glucòmetre (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japan) a 0- 2-5-20 minuts després de l'injecció intraperitoneal de glucosa. Les mostres de plasma s'utilitzaran per mesurar els nivells d'insulina en sang amb un ELISA.

Test oral de tolerància a la glucosa (OGTT)

Aquest test oral de tolerància a la glucosa consisteix en el mateix que l'IpGTT, només que en aquest cas l'administració de D-glucosa es per via oral a través d'una sonda gàstrica (*gavage*) que arriba fins l'estómac de l'animal sense tocar les vies respiratòries. La dosi de glucosa que s'administra és de 2g/kg del pes de l'animal i es mesura la glucèmia amb el glucòmetre (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japan) i també es recull plasma als temps 0-15-30-60-120 minuts. Les mostres de plasma s'utilitzaran per mesurar els nivells d'insulina en sang amb un ELISA.

Test de tolerància a la insulina (ITT)

Per tal d'evaluar la resistència a la insulina, hem realitzat el test de tolerància a la insulina (ITT). Després de dejunar els animals durant 6 hores els hem pesat per tal de calcular la dosi de insulina per cada animal. Hem mesurat la glucèmia inicial amb el glucòmetre (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japan) de la vena de la cua. S'injecta al ratolí una dosi de 0,5U/kg del pes de l'animal d'una solució de 0,2 U/ml. La glucèmia es mesura a la vena de la cua amb el glucòmetre (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japan) en els temps indicats després de l'injecció de insulina a 0-15-30-60-120 minuts.

IMMUNOHISTOQUÍMICA

Fixació, inclusió en parafina i microseccionament del pàncrees

Un cop extret el pàncrees de l'animal, es fixa en PFA 4% (Paraformaldehid) durant una nit en teixits a partir de p14 o bé durant 4 hores en els pàncrees p0 a 4°C.

Implicació de la senyalització dependent de Gsa en l'establiment de la massa cel·lular β

Posteriorment es deshidrata el teixits en una bateria d'etanols i finalment es porta a terme la inclusió en parafina:

Protocol

Deshidratació

- Submergir el pàncrees en solució PBS i incubar 10 minuts amb PBS Eliminar PBS i afegir-ne de nou per incubar-ho 10 minuts més
- Incubar 50 minuts amb etanol 50%
- Incubar 50 minuts amb etanol 70%
- Eliminar l'etanol 70%, afegir-ne de nou i incubar 50 minuts. *En aquest pas es pot guardar a 4°C menys d'una setmana o bé seguir amb el protocol*
- Incubar 50 minuts amb etanol 96%
- Eliminar l'etanol 96%, afegir-ne de nou i incubar 50 minuts
- Incubar 50 minuts amb etanol 100%
- Eliminar l'etanol 100%, afegir-ne de nou i incubar 50 minuts
- Incubar 1 hora amb xilol
- Eliminar el xilol, afegir-ne de nou i incubar 1 hora
- Eliminar el xilol i submergir el teixit en parafina (Paraffin Diawax 56-60°C, DiaPath) líquida a 55°C i incubar 1 hora.
- Eliminar la parafina, submergir el teixit en parafina nova líquida a 55°C i incubar 1 hora
- Muntar els blocs de parafina utilitzant motlles metàl·lics i cassets d'inclusió amb l'estació Leica de parafina.
- Deixar refredar la mostra per tal que solidifiqui la parafina

Seguidament els teixit pancreàtic es secciona en talls molt fins que se situaran en un portaobjectes per tal de portar a terme les diferents tècniques de immunohistoquímica:

Protocol

Realitzar talls del teixits inclòs en parafina d'un gruix de 3 μ m utilitzant un micròtom de Leica RM 2135.

Deixar els talls en un bany d'aigua calenta (38°C) (Leica HistoBath HI1210)

Col·locar de 3-4 talls en un portaobjectes prèviament tractat amb poli L-lisina i fer rèpliques de diferents talls amb els nivells corresponents de teixit.

Deixar assecar les mostres a temperatura ambient durant tota la nit o bé en una estufa a 37°C durant unes hores.

Immunofluorescència en teixit integrat en parafina

En primer lloc es desparafinitzen i rehidraten les mostres amb una bateria de xilols i etanols i seguidament es realitza la permeabilització del teixit:

Protocol
Submergir les mostres en solució de permeabilització Tritó X-100 al 0.5% en PBS, i deixar-ho 20 minuts a temperatura ambient.
Submergir les mostres en PBS 1X durant 5 minuts.
Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5 minuts.

A continuació, per tal d'evitar unions inespecífiques del nostre anticòs primari a regions que no volem reconèixer, es realitza un bloqueig incubant les mostres durant 1 hora a temperatura ambient amb BSA (albúmina de sèrum boví) al 3% diluïda en PBS o bé en 3% de sèrum de camell i s'incuba amb els anticossos primaris corresponents:

INCUBACIÓ ANTICOSSOS
Assecar les mostres i treure l'excés de PBS, evitant que s'assequin del tot les mostres.
Diluir els anticossos (veure Taula següent) en solució diluent d'anticòs (DAKO <i>antibody diluent solution</i>) i afegir-ho a les mostres.
Deixar-ho incubant tota la nit a 4°C en una càmera humida per tal que les mostres no s'assequin.
Eliminar la dilució de l'anticòs primari i submergir la mostra en PBS1X durant 5 minuts.
Submergir les mostres en PBS1X 5 minuts.
Assecar les mostres i treure l'excés de PBS, evitant que s'assequin del tot les mostres.
Diluir els anticossos secundaris (veure Taula següent) en solució diluent d'anticòs (DAKO <i>antibody diluent solution</i>)
Deixar incubant amb l'anticòs 2 hores a temperatura ambient en càmera humida.
Eliminar la dilució de l'anticòs secundari i submergir la mostra en PBS1X durant 5 minuts.
Submergir les mostres en PBS 1X nou durant 5 minuts dues vegades.
Tinció dels nuclis amb Hoescht durant 5 minuts 1:500 en PBS 1X
Submergir les mostres en PBS 1X durant 5 minuts dues vegades
MUNTATGE
Assecar els portes amb les mostres i treure l'excés de PBS, evitant que s'assequin les mostres
Afegir una gota de medi de muntatge, medi de muntatge fluorescent de DAKO i col·locar un cobreobjectes sobre la mostra.
Pressionar suaument amb un paper assecant per eliminar l'excés de solució de muntatge i treure les bombolles que puguin quedar entre el portaobjectes i el cobreobjectes.

Els anticossos primaris i secundaris que s'han utilitzat són els següents:

ANTICÒS PRIMARI	ANTICÒS SECUNDARI
Conillet d'indies anti-insulina (1:1000, Dako)	Alexa Fluor 555 anti-conillet d'indies (1:400, Molecular Probes) Alexa Fluor 488 anti-conillet d'indies (1:500, Jackson I.R) AMCA anti-conillet d'indies (1:50, Jackson I.R)
Conill anti-insulina (1:500, Santa Cruz)	Alexa Fluor 555 anti-conill (1:400, Molecular Probes)
Ratolí anti-glucagó (1:1000, Sigma)	Alexa Fluor 555 anti-ratolí (1:400, Molecular Probes)
Pollastre anti-YFP (1:200, Abcam)	Cy2 anti-pollastre (1:250, Jackson I.R)
Conill anti-MafA (1:250, Novus Biologicals)	Alexa Fluor 555 anti-conill (1:400, Molecular Probes) Anti-conill HRP (1:2000, GE Healthcare)
Conill anti-Ki67 (1:200, Thermo Fisher)	Alexa Fluor 488 anti-conillet d'indies (1:250, Jackson I.R)
Conill anti-p-H3 (1:200, Millipore)	Alexa Fluor 488 anti-conill (1:250, Jackson I.R)

TUNEL

Per la detecció d'apoptosi o mort cel·lular hem utilitzat el sistema DeadEnd Fluorometric de TUNEL (Promega, Madison, WI, USA):

Protocol
Desparafinització dels talls de teixit de 3-5 μ m i fixació en PFA 4% durant 15 minuts seguit d'un rentat amb PBS.
Permeabilització del teixit amb la solució de Proteinasa K (20 μ g/ml) durant 10 minuts.
Tornar a fixar el teixit en PFA 4% durant 15 minuts i rentat en PBS.
Opcionalment, en aquest punt es pot tractar una mostra amb DNAsa per tal de tenir un control positiu a l'experiment. Fer una dilució 1:100 amb PBS de la solució stock de 10mg/ml. Es posaran 100 μ l/tall i incubació durant 10 minuts a temperatura ambient. Posteriorment, es farà un rentat de 5 minuts amb aigua destil·lada i un rentat de 5 minuts amb PBS. <i>En aquest punt és important mantenir separades les mostres tractades amb DNAsa de la resta de mostres.</i>
Equilibri de les mostres afegint 100 μ l de <i>Equilibration Buffer</i> del kit durant 10 minuts i marcatge fluorescent dels nuclis apoptòtics amb el reactiu TdT. Passada 1 hora, s'atura la reacció amb SSC durant 15 minuts.
Rentat del teixit amb PBS i bloqueig en PBS-3%BSA i 0.1% de Tritó X-100 durant 10 minuts.
Incubació de les seccions pancreàtiques amb l'anticòs primari conillet d'indies anti-insulina (1:1000, Dako) durant 2 h i després incubar amb l'anticòs secundari Alexa Fluor 555 anti-conillet d'indies (1:400, Molecular Probes) durant 1 h (tots els anticossos han estat diluïts amb Dako Antibody Diluent).
Els nuclis s'han marcat amb Hoescht i els portaobjectes s'han muntat amb el medi fluorescent de muntatge (Dako, Santa Clara, CA, USA)

Microscopia i anàlisi

Totes les preparacions s'han analitzat emprant un microscopi connectat a un sistema de digitalització i processament d'imatges, LEICA DMR (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanya). Amb la funció *overlay*, si el que es vol és captar imatges independents, per exemple, en el cas de les immunofluorescències de proliferació o TUNEL, o bé amb la funció *multistep* si es vol captar una sèrie ordenada d'imatges de la zona desitjada de la mostra per després acabar obtenint una imatge única (*stack*).

Per la morfometria les imatges es capten a 20X i es mesura l'àrea insulina- o glucagó positiva amb el programa Image J en almenys 4 nivells (amb 120 μ m de separació entre ells) en cada pàncrees. L'àrea fraccional s'ha calculat dividint l'àrea hormona-positiva per l'àrea total pancreàtica i multiplicant per 100 (%). La massa β o α (mg) s'ha calculat multiplicant l'àrea fraccional per el pes total del pàncrees de l'animal. Per tal de conèixer la mida de la cèl·lula β hem dividit l'àrea insulina-positiva entre el nombre de cèl·lules insulina-positives.

Per la quantificació de la proliferació i mort cel·lular (TUNEL) es capten les imatges a 40X. Hem analitzat com a mínim unes 3000 cèl·lules β de cada pàncrees que sol correspondre a 4 nivells. El nombre de cèl·lules β positives per Ki67/TUNEL s'ha expressat en forma de percentatge del total de cèl·lules insulina-positives.

ILLOTS PANCREÀTICS

L'extracció i isolament d'illots pancreàtics s'ha realitzat a diferents edats: p7, p14, p28 i en adults. . Per tal de portar a terme l'aïllament dels illots, hem portat a terme el següent protocol:

Protocol
Mesurar la glicèmia i el pes de l'animal. Sacrifici dels animals per dislocació cervical. La cavitat toràctica s'ha impregnat d'etanol per tal d'evitar contaminacions.
Amb l'ajuda d'una lupa binocular (Leica), disseccionar l'animal obrint la cavitat peritoneal i apartar els òrgans fins localitzar el colèdoc.
Clampar el colèdoc en la seva part més distal, on connecta amb l'intestí i injectar 2ml de la solució col-lagenasa P (1.7 U/mg, Roche Diagnostics) amb una xeringa de 30G – 0.7mg de col-lagenasa P/3ml <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS, Sigma), observant que el pàncrees s'infla.
Extreure el pàncrees i col·locar-lo sobre una placa de petri (Soria Genlab) per treure el greix i els nòduls limfàtics que haguem pogut recollir en el moment de l'extracció.
Col·locar el pàncrees en un Falcon de 50ml (Deltalab) que conté 1ml de solució col-lagenasa i posar els tubs en un bany a 37°C amb agitació moderada durant: p7 i p14: 9 minuts p28 i adults setmanes: 7 minuts
Un cop passat el temps de digestió, col·locar ràpidament els tubs en gel i fer <i>shakes</i> per disgregar el teixit. Per acabar d'homogeneïtzar el contingut dels tubs, ho passem per una pipeta de plàstic Pasteur (DeltaLab).
Aturar la reacció de digestió amb una solució freda de HBSS 0.1% (Bovine Serum Albumin, BSA) i centrifugar a 100G durant 3 min a 4°C.
Eliminar el sobrenedant, afegir més solució HANKS BSA 0.1% i homogenitzar. Passar la mostra per un colador per tal d'eliminar els trossos de pàncrees que no s'han digerit. Tornar a centrifugar a 100G durant 5 minuts a 4°C.
Eliminar el sobrenedant i re-suspendre el pellet corresponent amb 5ml de solució Histopaque 1.119g/L (Sigma). Posteriorment, afegir amb cura de no trencar les fases de gradient 5 ml de Histopaque 1.089g/L (barreja 1:1 de Histopaque 1.119g/L amb Histopaque 1.077g/L (Sigma)). Finalment, afegir amb cura de no trencar les fases del gradient, 5ml de solució HANKS BSA 0.1% freda. Centrifugar a 800G durant 20 minuts a 24°C
Recollir els illots de la fase intermèdia, on hi ha l'Histopaque 1.089/HANKS BSA i els posem en un tub Falcon de 50ml nou.
Afegim 20 ml de solució freda HANKS BSA 0.1% i centrifuguem 500G durant 5 minuts a 4°C
Finalment, eliminem el sobrenedant i afegim 15ml de HANKS BSA 0.1% fred i ho barregem. Transferir els illots en una placa de Petri i procedir a la pesca amb l'ajut d'una lupa binocular (Leica), distingint els illots per la seva forma esfèrica, color blanc i marge refringent.

Un cop hem pescat els illots procedirem a fer un rentat amb HBSS, els centrifugarem i després d'eliminar el sobrenedant els podem utilitzar com a illots frescos isolats o bé com a illots per cultiu transferint-los en medi RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanya) suplementat amb 10% de FBS, 2 mM L-Glutamina, 100 U/ml penicil·lina i 100 µg/ml streptomicina, a 37°C amb 5% CO₂ .

Els illots isolats frescos s'han utilitzat per:

<ul style="list-style-type: none"> • Submergir en el tampó de lisis RA1 amb TCEP (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel) per la purificació de RNA.
<ul style="list-style-type: none"> • Submergir en Tampó de Lisis amb Triple Detergent (TDLB) que conté SDS, NP-40, sodi i inhibidors de proteases i fosfatases (Roche, Basel, Suïssa) per l'extracció de proteïna.
<ul style="list-style-type: none"> • Incubació amb la solució HEPES-buffered Krebs-Ringer (HBKR) amb 2.8 mM de glucosa com a pas de blanquejament previ a l'assaig de secreció d'insulina <i>in vitro</i>.
<ul style="list-style-type: none"> • Dissociació dels illots amb tripsina per purificar les cèl·lules β a través del <i>Fluorescent-Activated Cell Sorting</i> (FACS) en el cas que els illots provinquin dels animals <i>Ins1^{Cre/+}</i>; <i>Rosa26^{YFP/+}</i> i <i>Ins1^{Cre/+} Gnas^{ff}</i>; <i>Rosa26^{YFP/+}</i>.

Els illots que s'han posat en cultiu O/N amb medi RPMI-1640 a 10% FBS 11 mM de glucosa després de l'isolament s'han utilitzat per:

Implicació de la senyalització dependent de Gsa en l'establiment de la massa cel·lular β

<ul style="list-style-type: none">• Blanquejament O/N amb medi RPMI-1640 1% FBS i 8 mM de glucosa. L'any demà els illots s'estimularan amb la proteïna recombinant humana IGF1 (hrIGF1) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanya) a 10nM o l'anàleg estructural de Glp1, l'exendina-4 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanya) a 200 nM durant 24 hores. Després de l'estimulació s'han recollit els illots i s'ha procedit a l'extracció de proteïna per tal de realitzar el Western Blot (WB).
<ul style="list-style-type: none">• Blanquejament O/N amb medi RPMI-1640 0.1% FBS a 5 mM o 8 mM de glucosa. L'any demà els illots s'estimularan amb la proteïna hrIGF1 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanya) a 10nM, l'exendina-4 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanya) a 200 nM, insulina humana recombinant (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanya) a 10 nM i l'activador de l'enzim AdC, Forskolina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanya) a 10 μM a diferents temps (agut o crònic) per tal de procedir a l'extracció de RNA i posterior RT-PCR o bé per l'extracció de proteïna i posterior WB.
<ul style="list-style-type: none">• Cultiu dels illots durant 5-7 dies amb medi RPMI-1640 a 10% FBS 11 mM de glucosa per tal de dissociar els illots i cultivar les cèl·lules dels illots en monocapa. El medi s'ha canviat cada 2-3 dies. El cultiu dels illots durant 5-7 dies permet l'eliminació de les cèl·lules mesenquimals que es troben entre els illots (principalment fibroblasts) i permet una qualitat millor del cultiu monocapa.

Dissociació cel·lular dels illots per cultiu monocapa (DICS)

En aquesta tesi apart de la realització d'experiments amb illots isolats sencers, també hem dissociat illots per tal d'obtenir les cèl·lules en una monocapa, anomenades DICS. Després de 5-7 dies en cultiu per tal d'eliminar les cèl·lules mesenquimals del cultiu, hem rentat els illots amb HBSS-BSA 1%. Per la dissociació dels illots hem seguit el següent protocol:

Protocol
Digestió dels illots en 1 ml de tripsina-EDTA 0.05% (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) durant 6 minuts i seguidament hem aturat la reacció afegint 4 ml de medi RPMI-1640 suplementat amb 10% de FBS.
Centrifugació dels tubs i eliminació del sobrenedant per tal de resuspendre les cèl·lules en 500 μ l de medi RPMI-1640.
Contatge de les cèl·lules amb un aparell automàtic (Countess) contador de cèl·lules (Invitrogen).
Hem sembrat unes $14-16 \times 10^3$ cèl·lules en plaques de 384 pouets en un volum total de 35 μ l.
Passades 24 hores de recuperació de la tripsinització, hem realitzat un O/N de blanquejament amb 0.1% FBS i 8 mM de glucosa i el dia següent s'ha procedit a l'estimulació amb les diferents condicions: hrIGF1 (10 nM), hrInsulina (10 nM), Fk (10 μ M), Ex-4 (200 nM)
Passades 24 h de l'estimulació amb les diferents condicions de tractament, les DICS s'han utilitzat per l'assaig de proliferació de BrdU

Assaig de proliferació BrdU

La proliferació de les DICS s'ha mesurat a través de l'incorporació de l'anàleg de timidina bromodeoxiuridina (BrdU) a l'ADN sintetitzat *de novo* mitjançant la replicació de cèl·lules utilitzant la Proliferació Cel·lular Colorimètrica BrdU ELISA (Roche, Basel, Suïssa) en plaques de 384 pouets:

Incubació de les cèl·lules durant 5-6 h amb el BrdU diluït prèviament a l'ELISA (3 μ l/pouet)
Fixació de les cèl·lules durant 30 minuts, seguit d'una incubació amb l'anticòs anti-BrdU conjugat amb la peroxidasa <i>horseradish</i> durant 60 minuts, múltiples rentats i incubació amb 30 μ l la solució substrat durant 5-10 minuts.
Finalment es mesura l'absorbància a 450nm després d'aturar la reacció amb 1 M H_2SO_4

Assaig de secreció d'insulina *in vitro*

Els illots frescos isolats s'han utilitzat per realitzar l'assaig de secreció d'insulina *in vitro*. Després del blanquejament dels illots durant 30 min amb HBKR a 2.8 mM de glucosa hem seguit el següent protocol:

Protocol

Pescar 6 illots (amb triplicats per cada condició) i transferir-los en un vial de secreció (tub cònic de 2ml), en el que hi ha 1 ml de solució de blanquejament HBKR amb 2.8 mM de glucosa i incubar-los a 37°C amb durant 30 min amb agitació suau.

Extreure el medi de blanquejament sota lupa binocular i incubar els vials amb 1 ml de HBKR i els diferents secretogogs: la glucosa (2.8 mM, 11 mM i 16.7 mM), forskolina (2 µM) i exendina-4 (100 nM).

Els vials s'han incubat a 37°C durant 90 min amb agitació suau.

S'han recollit els sobrenedants en eppendorfs per tal de mesurar la quantitat d'insulina secretada.

Seguidament hem afegit 1 ml de solució àcid-alcohol (per 100 ml, 75 ml d'EtOH absolut, 1.5 ml de HCL 37% i 23.5 ml d'aigua) per tal de trencar la membrana i mesurar el contingut d'insulina. Per tal de promoure l'alliberació del contingut de l'illot, hem sonicat suaument els illots amb la solució àcid-alcohol.

La insulina s'ha mesurat per ELISA Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit (Crystal Chem, Downers Grove, illinois, USA). Per cada animal (n), hem analitzat 3 rèpliques (6 illots cadascuna) per cada condició. La secreció d'insulina s'ha expressat com a percentatge del contingut total d'insulina.

Recollir el medi de secreció amb una lupa binocular i congelar-ho a -20°C fins el seu ús.

Solucions**Medis de secreció**

○ Solució I	
NaCl (Serva)	2.68 g (460 mM)
H ₂ O	100 ml
○ Solució II	
NaHCO ₃ (Serva)	0.806 g (96 mM)
KCl (Merck)	0.149 g (20 mM)
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Sigma)	0.0812 g (4 mM)
H ₂ O	100 ml
○ Solució III	
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma)	0.147 g (10 mM)
H ₂ O	100 ml
○ HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfonat sòdic) 1M	
HEPES-Na (Fluka)	26.03 g (1 M)
H ₂ O	100 ml
○ Glucosa 1M	
D-(+)-Glucosa H ₂ O (Merk)	1.981 g (1 M)
H ₂ O	10 ml

Solució de secreció sense glucosa

Solució I	25ml	} Ajustar a pH=7.4
Solució II	25ml	
Solució III	25ml	
HEPES 1M	2ml	
BSA	0.5g	
H ₂ O	23ml	

Implicació de la senyalització dependent de G α en l'establiment de la massa cel·lular β

Solució de secreció a 2.8 mM de glucosa:

Solució de secreció sense glucosa	10 ml
Glucosa 1 M	28 μ l

Solució de secreció a 11 mM de glucosa:

Solució de secreció sense glucosa	10 ml
Glucosa 1 M	110 μ l

Solució de secreció a 16.7 mM de glucosa:

Solució de secreció sense glucosa	10ml
Glucosa 1 M	167 μ l

Solució de secreció a 11 mM de glucosa + Forskolina 2 μ M:

Solució de secreció sense glucosa	10 ml
Glucosa 1 M	110 μ l
Forskolina 10mM	2 μ l

Solució de secreció a 11 mM de glucosa + Exendina4 100 nM:

Solució de secreció sense glucosa	10 ml
Glucosa 1 M	110 μ l
Exendina 4 250 μ M	25 μ l

Mesura dels nivells d'AMPc en illots isolats

Per tal de valorar els nivells del segon missatger AMPc en illots de ratolí hem col·laborat amb al grup de recerca del Dr. Stephane Dalle (Montpellier). S'ha utilitzat el kit cAMP dynamic 2 (Cisbio, Parc Marcel Boiteux, Codolet, França). Es tracta d'un kit d'alta sensibilitat que quantifica de manera directa els nivells del segon missatger a través d'un principi basat amb la tecnologia HTRF (Homogenous Time-Resolved Fluorescence). Aquest kit funciona a través d'un immunoassaig competitiu entre l'AMPc produït per les cèl·lules residents i l'AMPc marcat. La senyal que s'observa en l'experiment és inversament proporcional a la concentració del missatger en la mostra.

Un cop s'han isolat els illots pancreàtics es realitza una recuperació O/N amb medi RPMI-1640 que conté 10% FBS i 11mM de glucosa. El dia següent, els illots s'incuben durant 1h 30 min a 37°C amb agitació suau en la solució HBKR a 2.8 mM de glucosa per procedir a fer el blanquejament. Per la mesura dels nivells basals d'AMPc, s'agafen directament aquests illots i es realitza el protocol del kit cAMP dynamic 2 (Cisbio, Parc Marcel Boiteux, Codolet, França). Per la mesura de la producció d'AMPc en resposta a l'estimulació amb diferents components es posen 10 illots per cada condició (3 rèpliques) en la solució HBKR amb els secretagogs corresponents: forskolina 1 μ M (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) i exendina-4 20 nM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) amb IBMX (isobutilmetilxantina 0.5 mM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) en cada condició d'estimulació per tal d'evitar la degradació de l'AMPc produït.

Després de la incubació amb els secretagogs es fan dos rentats amb solució HANKS sense BSA i s'afegeix 30 μ l de tampó de lisis en cada tub. En aquest moment, es poden congelar els illots a -80°C o bé començar el protocol per mesurar els nivells de AMPc:

Protocol
Preparar la corba estàndard (0.07-0.70 nM)
Pipetejar 5 µl de mostra en cada pou i afegir 5 µl del <i>compound buffer</i>
Tapar la placa i incubar-ho durant 30 minuts a temperatura ambient
Afegir 5 µl de AMPc-d2 i 5 µl d'anti AMPc-Cryptate
Tapar la placa i incubar-la durant 1 hora a temperatura ambient
Llegir la placa amb un aparell compatible per HTRF.

FACS en cèl·lules *Ins1*^{Cre/+}; *Rosa26*^{YFP/+} d'illots dissociats

Per tal d'obtenir cèl·lules β pures, s'han dissociat illots d'animals control (*Ins1*^{Cre/+}; *Rosa26*^{YFP/+}) i β-Gs α KO YFP (*Ins1*^{Cre/+} *Gnas*^{fl/fl}; *Rosa26*^{YFP/+}) i les cèl·lules β s'han separat de les resta de cèl·lula endocrines (la majoria cèl·lules α). Per tal de dissociar els illots i seleccionar les cèl·lules β hem seguit el següent protocol:

Protocol
Rentat dels illots en HBSS-BSA1%
Digestió dels illots en 150 µl de tripsina-EDTA 0.125% amb DNase (50ng/ml) (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) durant 9 minuts i aturada de la reacció afegint 50 µl de FBS.
Comptatge de les cèl·lules en el Countess automàtic (Invitrogen)
Les cèl·lules fluorescents i no fluorescents han sigut separades i recollides directament en un tub amb tampó de lisis RA1 amb TCEP (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel) per la purificació de RNA. La separació de les poblacions cel·lulars (FACS) ha sigut realitzada per treballadors de la plataforma de Citometria de l'IDIBAPS amb l'analitzador BD LSRFortessa SORP.

ANÀLISI DE L'EXPRESSION GÈNICA

Extracció de RNA

Per tal d'extreure RNA de mostres, és molt important que tot el material estigui lliure de ribonucleases (RNases). De forma rutinària s'utilitza RNaseZAP (Sigma), per tal d'assegurar un ambient lliure d'aquests enzims: pipetes, guants, superfície i tots aquells materials en els que treballem. S'ha utilitzat un únic mètode d'extracció de RNA que funciona a través de columnes (Nucleospin RNA XS kit) per on passaran les mostres (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

El mètode de purificació per columnes es basa en un mètode a través d'unes resines de sílice gel que permeten l'extracció de RNA de quantitats petites de mostra, permetent una bona recuperació i integritat per captar fragments de RNA superiors a 200 nucleòtids.

Implicació de la senyalització dependent de Gsa en l'establiment de la massa cel·lular β

Protocol
Partir d'un pèl·let d'illots (mínim 40) en 204 μ l de buffer de lisis RA1 amb TCEP
Homogenitzar el teixit amb una xeringa estèril de 30G per disgregar els illots mecànicament. En aquest punt es pot guardar la mostra a -80°C o bé seguir amb el protocol
Afegir 5 μ l/mostra de la solució de treball Carrier RNA i mesclar-ho bé
Filtrar el lisat a través de les columnes NucleoSpin Filter per tal de reduir la viscositat de la mostra i centrifugar a 11,000 x g durant 30 segons
Descartar les columnes i afegir en el lisat 200 μ l d'etanol 70% i homogeneitzar amb la pipeta
Unió RNA. Filtrar el lisat resultant a través de les columnes NucleoSpin RNA XS i centrifugar durant 1 minut a 11,000 x g
Per tal d'extreure el màxim de sals que pugui contenir la mostra, s'afegeix 100 μ l de la solució MDB a la membrana de la columna i centrifugar a 11,000 x g durant 1 minut.
Digestió del DNA. Afegir 25 μ l de <i>rDNAse reaction mixture</i> directament a la membrana de la columna i incubar-ho durant 15 minuts a temperatura ambient.
Rentats i assecament de la membrana. Afegir 100 μ l de la solució RA2 a la columna i incubar-ho 2 minuts a temperatura ambient. Centrifugar 30 segons a 11,000 x g.
Passar la columna a un nou tub de 2ml i afegir 400 μ l de la solució RA3. Centrifugar a 11,000 x g durant 1 minut.
Afegir 200 μ l de la solució RA3 a la membrana de la columna i centrifugar durant 3 minuts a 11,000 x g.
Elució RNA. Finalment, passar la columna a un eppendorf's lliure de nucleases i eluir la mostra en 14 μ l d'aigua lliure de RNase.

Quantificació del RNA

Per tal de mesurar la quantitat de RNA que s'ha obtingut després de la seva extracció, s'ha mesurat 1 μ l de mostra en un Nanodrop, espectrofotòmetre de nova generació que mesura l'absorbància amb un rang de treball de 2 a 4000ng/ μ l. Per mesurar la puresa de la mostra, hi ha els ràtios de les absorbàncies de la mostra a 260 i 280nm. Aleshores, ràtios Abs_{260}/Abs_{280} iguals o superiors a 1,8 indiquen una qualitat òptima del RNA.

Retrotranscripció de RNA a cDNA

Per tal de transcriure l'RNA obtingut a cDNA, s'ha utilitzat la retrotranscriptasa SuperScript III (Invitrogen, California, EEUU).

En primer lloc, en un tub de 0.2 ml afegir 0.5 μ g de primers randomitzats i la mostra de 150-800ng. Posteriorment, incubar les mostres durant 10 minuts a 70°C.

Seguidament afegir:

H₂O lliure RNases	2.25μl
First Strand Buffer 5x	5.00 μ l
DTT (ditiotreitòl) 0.1M	2.5 μ l
dNTPs 10mM	1.25 μ l
RNaseOUT (40U/μl)	0.50 μ l
SuperScript III (200U/μl)	0.50 μ l

Finalment, s'afegeix 12 μ l de barreja RT per cada tub de RNA amb els primers randomitzats. Les mostres s'incubaran en un termociclador a 42°C 15 min; 50°C 90 min; 55°C 10 min; 70°C 15 min i es mantindran a 4°C.

PCR a temps real (RT-PCR) i anàlisi d'expressió gènica

En una PCR convencional, només es pot mesurar el nombre final de còpies generades en la reacció; en canvi, en el mètode de la PCR quantitativa o PCR en temps real, es pot monitoritzar la reacció de PCR mentre succeeix i quantificar el nombre de còpies inicials d'àcid nucleic que hi ha en la mostra. L'amplificació és més ràpida com més elevat sigui el nombre de còpies inicials, i per tant, es detecta abans l'increment en la fluorescència emesa de la reacció.

Existeixen diferents fluoròfors i encebadors però en aquesta tesi s'ha utilitzat la tecnologia SYBR green (Applied Biosystems, Foster City, califòrnia, EUA), en la que s'utilitza el fluorocrom SYBR Green que s'uneix únicament al DNA de doble cadena. Al llarg de la reacció de PCR es generen més amplicons, que es van unint al fluorocrom SYBR Green, aleshores com a resultat s'obté un increment en la intensitat de la fluorescència que és proporcional al producte de PCR amplificat. Quan es passa un cert límit de fluorescència (threshold), es considera que a partir d'aquell moment el gen en estudi és present, i el cicle en el que això succeeix se'l defineix com Ct (threshold cycle). Per tal d'establir un punt de tall on considerem que el gen d'interès és present a la mostra que estudiem, es va aplicar l'algoritme executat de forma automàtica pel programa SDS (Sequence Detection System, Applied Biosystems), el qual es basa en seleccionar un punt prou elevat per poder diferenciar entre soroll de fons i un de prou baix per no arribar al límit de saturació.

Per el procés de l'amplificació s'ha utilitzat el reactiu comercial Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), que combina el fluorocrom SYBR Green 1 Dye, la polimerasa AmpliTaq Gold DNA Polymeras, un mix de dNTP amb dUTP i un tampó optimitzat per fer la reacció. La reacció de PCR i l'anàlisi de les dades obtingudes s'ha portat a terme amb el sistema 7900HT Fast real-Time PCR System (Applied Biosystems).

En la quantificació dels resultats, s'ha analitzat l'expressió del gen control *Tbp* (TATA binding protein) el qual es coneix s'expressa de forma homogènia en les diferents mostres utilitzades. D'aquesta manera, es poden normalitzar els resultats, els quals s'expressen com a *ratio* entre el valor del gen que estudiem respecte el valor del gen control *Tbp* (housekeeping), a partir del mètode $\Delta\Delta Ct$.

Protocol (placa 384 pouets – Applied Biosystems)	
Master Mix SYBR Green 2x	5µl
• H ₂ O destil·lada	2.55µl
• Mescla d'encebadors 10µM	0.25µl
• cDNA (2-20ng)	2µl
Centrifugar 1 minut per baixar el contingut de la placa	
Introduir la placa al termociclador 7900HT (Applied Biosystems):	
• 50°C	2min
• 5°C	10min
35 cicles de:	
• 95°C	15s (desnaturalització)
• 60°C	1min (anellament i extensió)
• 95°C	15s
Increment de 60°C a 95°C a una velocitat d'uns 1.92°C/min (corba de dissociació)	

Aquesta tècnica ens permet mesurar la fluorescència total de les cadenes dobles de DNA unides a SYBR Green. Aleshores, si apareixen diversos transcrits durant el procés d'amplificació, la fluorescència que s'observarà resultarà del total de transcrits. Si en l'anàlisi de la RT-PCR s'afegeix la fase de corba de dissociació, es pot veure l'especificat dels encebadors que s'han dissenyat en cada cas per tal d'estudiar

Implicació de la senyalització dependent de Gsa en l'establiment de la massa cel·lular β

els gens d'interès. En el cas que aparegui més d'un pic de fluorescència, més d'un transcrit, serà recomanable dissenyar nous encebadors més específics del gen d'interès ja que significarà que l'encebador probablement no és específic del nostre gen d'interès i que per tant està amplificant més d'un transcrit. Les seqüències dels encebadors utilitzats en aquesta tesi són:

GEN	SEQÜÈNCIA FORWARD	SEQÜÈNCIA REVERSE
<i>Atf3</i>	GTCCGGGCTCAGAATGGAC	CGTGCCACCTCTGCTTAGCT
<i>Akap11</i>	CCTTCTAAACCAAGACTGCTCC	TGTTGGTGAAGACAGCACAGG
<i>Akap12</i>	TGTCTGCCGTCAATGGTGTA	CCTCCTGCTCGTCCTTTGTG
<i>Arrb1</i>	AGCATGAGGACACGAATCTG	ATCACTGGATGCAAGGTCTC
<i>Arrb2</i>	ATGGGAGAAAAACCCGGGAC	CACGCCATCCACAGGGTC
<i>Bcl2</i>	GGGATGCCTTTGTGGAATA	CTCACTTGTGGCCAGGTAT
<i>Btc</i>	CCCAAGCAGTACAAGCATTAC	GGAGGTA AACAGGTCCACTC
<i>Casp9</i>	ATGCAGGGTGC GCCT	GGTCTCAAGGTCTGTG
<i>Ccna2</i>	CGACGGGTTGCTCCTCTTA	CTGAGTCTCTTCTGCTTCATCC
<i>Ccnd1</i>	GCGTACCCCTGACACCAATCTC	CTCCTCTTCGCACCTTCTGCTC
<i>Ccnd3</i>	CGAGCCTCCTACTTCCAGTG	GGACAGGTAGCGATCCAGGT
<i>Cdk2</i>	CGTACGGAGTGGTGACAAA	CACCTTCAGTCTCAGTGTGCG
<i>Cdk4</i>	ATCAAGGTCACCCTAGTGTGTTG	AGAAACTGACGCATTAGATCCTTA
<i>Cdkn1a</i>	CCTGGTGATGTCCGACCTG	CCATGAGCGCATCGCAATC
<i>Celf1</i>	CTGCCGTTTGTTCATCGTTG	GAAGAGACAGGGATTTGGACG
<i>Chop</i>	TCATCCCCAGGAAACGAAGAG	GCTTTGGGATGTGCGTGTG
<i>Cpe</i>	GAACCGTAACTCCCAGACC	TCCAGTGAATGACAGCCTTG
<i>Creb1</i>	GCTCCCACTGTAACCTTAGTG	GGACTTGTGGAGACTGGATAAC
<i>Creb3</i>	CCACTCTGGGATCTTTCTTCAG	AAAGAAGGGCTGTGGTTAGG
<i>ErbB2</i>	ACCTCTCTACATGCCTATCTG	ATGAATGTCACTGGGCTGG
<i>ErbB3</i>	GGGCTATGAGACGCTACTTG	ACAGTTCCAAAGACACCAGAG
<i>Fas</i>	TCTGGGCTGCCTGCCTCT	ACGAACCCGCCTCCTCAG
<i>FoxO1</i>	CTACGAGTGGATGGTGAAGAG	TGTGAAGGGACAGATTGTGG
<i>Gipr</i>	TGGTTCCGTCAGGTGTCT	TGAGTGTGGTCTCTCCAAGAT
<i>Gcgr</i>	TTGCGTCCTTTGTGCTCAA	ATCTTCTGGCTGTACCGTGTCTT
<i>Glp1r</i>	CACAAAGGCAAAGATGACTTCAT	CCCTAAGTGATCCGCTACAATC
<i>Gnai 1</i>	CTCGCCGGTGT CATAAAGAG	GTTGGGATGTAATTTGGCTGTG
<i>Gnai 2</i>	AGAGGAACAAGGGATGCTTC	CGCTCCAGATCATTAGGTAG
<i>Gnai 3</i>	TTCAGAACTAGCAGGCGTG	TTGGAATGTAGTTGGTCTGGG
<i>Gpr119</i>	GTGGCTATGCTGCTATCAATCT	CCACGCCAATCAAGGTATCAG
<i>Grk2</i>	TCTTCCAGCCATACATTGAGG	TCATGGTCAGGTGGATGTTG
<i>Iapp</i>	CTCCAAACTGCCAGCTGTCC	TCCGTTTGTCCATCTGAGGG
<i>Igf1</i>	ATGTTCCCCAGCTGTTTCC	ATTCCATTGCGCAGGCTCTA
<i>Igf2</i>	CCTGTGAGAACCTTCCAGCC	ACCAACATCGACTTCCCCAC
<i>Igf1r</i>	GTGTGGATCGCGATTTCTGC	GTACATGCTCTGGGTGCTGT
<i>Igf2r</i>	AAGACACCAGAACCAGACAC	TCCTCTCCCATCCTTACCTG
<i>Igf2bp2</i>	GAAAGAAGGCAAGGAGGCGT	AAGAGCAGCAGCAAGAGCA
<i>Igfbp4</i>	GGGAAAGGAATGGGGTGAGG	GGCCATTCTCAGACACACA
<i>Ins1</i>	CTCCAGTCCAGCTGCAAAGA	GCACAGTGGTCACCCAAGAT
<i>Ins2</i>	CCCTAAGTGATCCGCTACAATC	CATGTTGAAACAATAACCTGGAAGA
<i>Ins1+2</i>	AGCGTGGCTTCTTCTACACACC	CCAGCTCCAGTTGTGCCACT
<i>Insr</i>	CCCTGAGTACCTCAGTGCCAG	GTCCGGCACGTACACAGAAGA
<i>Insr-B</i>	AGGAGCTGGAGGAGTCTTCA	CTACTGTCCTCGGCACCATT
<i>Irs2</i>	GCCTATGCCTGTCTGCGC	GTTCCGAATTGAGCTTCACGA
<i>Mafa</i>	CAAGGAGGAGGTCATCCGAC	TCTCCAGAATGTGCCGCTG

Mbn1	GCACATCCTTCGAAAAGCTG	TCCGCCCATTTATCTCTAACTG
NeuroD1	GGATCAATCTTCTCTCCGGTG	TGCGAATGGCTATCGAAAGAC
Nfat1c	TGGGAGATGGAAGCAAAGAC	ATAGAACTGACTTGGACGGG
Nfat3	AACTTCCTGCCAGACTCTAAAG	TCAATGTCACCTCACTGCTC
Nfat5	GGTGAAGCTGGAAGGCCATA	CCGCCAGTGTCATGTTGTTG
Ngn3	TTCTCATCGGTACCCTTGCTG	GCAGACTCACCAGGAAGTATGG
Nkx6.1	TGGACAGCAAATCTTCGCCCTG	TGTTGTAATCGTCGTCATCCTC
Pcsk1/3	AGTTGGAGGCATAAGAATGCTG	GCCTTCTGGGCTAGTCTGC
Pcsk2	AATGGGAAGACGGTTGATGG	AGTTGCAGTCATCGTAGCTG
PdgfrA	CAAACCCTGAGACCACAATG	TCCCCAACAGTAACCCAAG
PdgfrB	CCGATACTTACTACGTCTACAGC	ACCACATCATTGCCCATCAC
PdgfA	GTCCAGGTGAGGTTAGAGG	CACGGAGGAGAACAAAGAC
PdgfB	TGAAATGCTGAGCGACCAC	AGCTTTCCAACCTCGACTCC
Prkaca1	GTCATGGAGTATGTAGCTGGTG	CAGATACTCAAAGGTCAGGACG
Prkrb1	GACTATAAGACCATGACCGCG	CTGTATGACTGTTTCCCACC
Ptp1n	ACAGTACGACAGTTGGAGTTG	TGGTGTAGTGGAAATGCAGG
Rapgef3	TGCATATCAAGGCGGTGG	CCCTTCCAGATAATGTACCACG
Rapgef4	TTATGGCAAGGGTGTGGTC	CTTGGAGCATCGTTCACTAGAG
Srsf1	GTCCGAGAACAGAGTGGTTG	TACAACTCCACGACACCAG
Srsf3	CTCTAGAAAAGTGACCTGCTCC	CTCTAGAAAAGTGACCTGCTCC
Tbp	ACCCTTACCAATGACTCCTAGT	ATGATGACTGCAGCAAATCGC
Xbp1	ATGCAGGGTGCGCCT	GAACCAGGAGTTAAGAACACG

Disseny dels encebadors

Per tal de realitzar les PCR i qPCR hem dissenyat els primers corresponents utilitzant el sistema Integrated DNA Technologies (IDT) SciTools® (<http://eu-idtdna.com/site>). Aquest software i altres aplicacions semblants determinen les propietats de qualsevol seqüència d'oligonucleòtids i facilita el disseny intel·ligent per cada condició experimental. En aquesta línia, hem utilitzat l'eina PrimerQuest® per tal de customitzar el disseny dels primers per experiments de PCR i qPCR regulars. A més, també s'han utilitzat eines d'anàlisi d'oligonucleòtids, concretament la de OligoAnalyzer®. Aquest software ens permet conèixer i identificar diferents propietats dels primers seleccionats i dissenyats, com és la temperatura de melting, *hairpins*, dímers, discordances (*mismatches*), entre d'altres.

Validació d'encebadors

El disseny i validació dels encebadors d'un gen específic és molt important degut al mètode de quantificació que s'ha utilitzat ($\Delta\Delta Ct$). Per tal d'obtenir uns resultats reproduïbles, és necessari que l'eficiència del nostre gen control i del nostre gen d'interès siguin el més semblants possible. Les eficiències acceptades per els encebadors emprats en un experiment, són d'un mínim del 85%, i aquesta eficiència es calcula a partir de la pendent d'una corba estàndard realitzada per testar aquest parell d'encebadors (Eficiència = $10^{(-1/pendent)-1}$).

WESTERN BLOT

Extracció de proteïnes

Els teixits utilitzats per l'extracció de proteïna són els illots pancreàtics de ratolins controls i gen anul·lats de les diferents edats d'estudi. Es posen uns 80-150 illots en cada tub i es fan dos rentats amb solució HANKS per tal d'extreure les restes de proteïnes com poden ser l'albumina. Seguidament s'afegeix un

Implicació de la senyalització dependent de Gsa en l'establiment de la massa cel·lular β

tampó de lisis que conté solució TDLB^A, inhibidors de proteases (10%) i inhibidors de fosfatases (10%) per tal d'evitar la digestió per enzims cel·lulars de les proteïnes i fosfoproteïnes.

^ATampó TLDB (Triple Lysis Buffer), per preparar 10ml de tampó:

Tris pH 8,0	50 mM
NaCl	150 mM
SDS 10%	100 μ l
NP-40 (IGEPAL)	100 μ l
Deoxicolat sòdic	50 mg
H ₂ O	fins a 10ml

Posteriorment, la mostra es pot congelar o bé procedir a l'extracció de proteïna a través de sonicacions (2 polsos durant 30 segons amb 1 minut de descans enmig). Després es fan 3 cicles de congelació i descongelació per acabar d'homogeneïtzar els illots i finalment es centrifuga la mostra a màxima velocitat durant 20 minuts a 4°C. Es recull el sobrenedant i es fa la quantificació.

Quantificació de proteïnes

Existeixen diferents mètodes de quantificació però en aquest tesi s'ha utilitzat el mètode de l'assaig de proteïnes de BioRad DC (Reagent A, Reagent S, Reagent B) que es basa en una modificació del mètode de valoració de proteïnes Lowry. S'utilitzen plaques de 96 pous, seguint el protocol detallat pel fabricant:

Protocol
Elaborar la recta patró utilitzant un estàndard de BSA (BioRad). Diluir, si és necessari, les mostres i també el tampó d'homogeneïtzació (serveix de blanc)
<i>Sempre que sigui possible, fer els punts per triplicats de l'STD, buffer i les mostres</i>
Posar en cada pou 5 μ l del estàndard, el tampó de lisis o la mostra amb la dilució corresponent.
Afegir 25 μ l de reactiu A en cada pou
Afegir 200 μ l del reactiu B en cada pou
Remoure els pou
Esperar 15 minuts per fer la lectura amb l'espectrofotòmetre
Finalment, llegir l'absorbància a 750nm a l'espectrofotòmetre. Restar el valor d'absorbància del blanc al de les mostres i interpolar les concentracions de les mostres a partir dels resultats de la recta patró.

Les mostres es dilueixen en tampó de càrrega amb un agent reductor (2-mercaptoetanol) per tal de trencar els ponts disulfur i convertir les proteïnes en un estat més soluble. La transferència es realitza en un estat humit sobre una membrana de PVDF i la detecció es realitza a través d'un anticòs específic contra la nostra proteïna d'interès.

- Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)

Aquesta tècnica ens permet separar les molècules de les proteïnes en funció de la seva mida i càrrega. Es tracta d'un gel sintètic, termo-estable, relativament inert químicament i que permet preparar un rang de mides de porus diferents. La mida dels porus està determinada principalment per dos factors; la quantitat total d'acrilamida i la quantitat de reticulat. La mida del porus disminueix a mesura que augmentem el percentatge d'acrilamida en el gel. El detergent SDS desnatura i confereix càrrega negativa a les proteïnes, de manera que, en una matriu de poliàcrilamida sotmesa a un camp elèctric, les proteïnes avancen cap el pol positiu a diferents velocitats segons la seva massa. En aquesta tesi hem utilitzat gels separadors del 7.5-8% d'acrilamida ja que el pes de les proteïnes d'interès estava al voltant de 36-94 kDa.

Aquesta electroforesi està formada per dos tipus de gel: el concentrador (*stacking*) al 5% d'acrilamida i el separador (*resolving*). La diferent composició dels gels permet la concentració de les proteïnes en el límit entre ambdós gels, punt a partir del qual s'inicia la separació per massa. En aquesta tesi s'utilitza l'aparell MiniProtean Kit de BioRad. Per la preparació de les mostres és molt important recordar que les proteïnes s'han de descongelar i mantenir-se en gel fins el moment que es carreguin en el gel ja que si no es poden degradar. Per tal de preparar les mostres, s'afegeix prèviament el tampó de càrrega anomenat Laemmli que pot estar a diferents concentracions (2x^a/4x/6x), que conté 2-mercaptoetanol. Seguidament, es desnaturalitzen durant 5 min a 95°C en un bloc tèrmic i després es posen en gel fins el moment de carregar-les.

COMPOSICIÓ DELS GELS	CONCENTRADOR (6 ml)	SEPARADOR (15 ml)
Acrilamida Solució acril/bis-acril al 30% (29/1) (BioRad)	5%	8%
Aigua	4.1 ml	7.2 ml
Bis-N, N'-metilen-bis-acrilamida	1 ml	3.8 ml
Tris-HCL (pH=6.8/8.8)	750 µl	3.8 ml
Dodecil sulfat de sodi (SDS) (Serva)	60 µl	140 µl
Persulfat d'amoni (APS) (Bio-Rad)	60 µl	140 µl
N,N,N,N'-tetra-metil-etilendiamina (TEMED) (Bio-Rad)	6 µl	9 µl

En l'electroforesi els complexos-SDS de la mostra són arrossegats per un front de moviment generat pel corrent elèctric. Passen a través d'un gel d'apilament i es depositen a una línia molt prima o una pila en la superfície del gel de resolució, en aquest punt es concentra la mostra i per tant, millora la resolució. En les primeres etapes d'aquest procés, es forma un gradient de ions que permet que totes les proteïnes es concentrin en una sola banda. Aquest fet, succeeix en una zona del gel que conté els porus més grans, per tal que la matriu de gel no alenteixi la migració durant l'*stacking*. Els complexos SDS-proteïna travessen el gel de resolució, en una zona on la tensió i el pH són uniformes, i se separen per la seva mida. En el moment en el que es desconnecta l'electroforesi les bandes comencen a difondre's, aleshores per prevenir aquest fet es pot fixar amb un 40% d'aigua destil·lada, 10% d'àcid acètic i 50% metanol.

Protocol

Polimeritzar els gels entre els vidres del sistema (vegeu-ne la composició a la taula adjunta). Primer preparar el gel separador i abocar-lo entre els vidres deixant uns 2 cm de marge per el gel concentrador. Afegir una capa prima de butanol (Carlo Erba, Rodano, Itàlia) saturat amb aigua (1:1) per tal d'eliminar bombolles, alinear la superfície i per impedir la inhibició de la polimerització per l'oxigen atmosfèric.

Una vegada el gel separador ha polimeritzat, preparar el gel concentrador i abocar-lo entre els vidres sobre el gel separador. Posar la pinta que forma els pous de càrrega.

Una vegada polimeritzat, retirar la pinta, col·locar el gel en el suport d'electroforesi i dins la cubeta. Omplir amb tampó d'electroforesi^b fins a cobrir el gel.

Carregar les mostres de proteïna i el marcador en els pous corresponents.

Tancar el circuit elèctric i connectar l'electroforesi (150V aprox.). Aturar quan el front del colorant arriba al final del gel o bé posteriorment, per tal d'afavorir la separació de les proteïnes de major pes molecular.

Desmuntar el sistema i separar el gel dels vidres. Eliminar la porció corresponent al gel concentrador. Iniciar el protocol de transferència de proteïnes.

^A Tampó de càrrega Laemmli 2X: 125 mM tris-HCL (Serva, Heidelberg, Alemanya) (ph=6,8), 20% glicerol (Carlo Erba), 4% SDS (Serva), 10% 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich).

^B Tampó d'electroforesi (pH=8.3): 25mM tris-HCL, 192 mM glicina i 0.1 % SDS

Transferència

○ Transferència humida

Aquest pas ens permet passar les proteïnes del gel a una membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride) (Perkin Elmer, Boston, EUA). En aquest sistema el gel i la membrana es col·loquen en una cubeta, completament coberts de tampó, en posició vertical i entre dos electròdes que creen el camp elèctric que fa avançar les proteïnes del gel a la membrana. S'ha seguit el protocol MiniProtean de Bio-Rad:

Protocol

Activar la membrana de PVDF submergeint-la 1 minut en metanol (VWR, Fontenay-sous-Bois, França) i deixar-la en aigua destil·lada durant 1 minut més. Després posar-la per equilibrar 5 minuts amb tampó fred de transferència. Aquesta activació caldrà repetir-la cada vegada que la membrana es deixi assecar.

Submergir en tampó de transferència ^a el gel separador, la membrana, els papers 3MM i les esponges de l'aparell de transferència durant uns minuts.

Col·locar dins el muntatge de l'aparell de transferència una esponja, un paper *whatman*, el gel, la membrana, un altre paper *whatman* i una altra esponja. És important mantenir-ho tot ben humitejat amb tampó de transferència, seguir l'ordre i evitar la formació de bombolles entre el gel i la membrana.

Tancar el muntatge i col·locar-lo dins la cubeta de manera que el gel quedi en el costat del pol negatiu i la membrana en el pol positiu,

Omplir la cubeta de tampó de transferència, tancar l'aparell i aplicar un voltatge de 50 V durant 3 hores a 4°C.

Un cop finalitzada la transferència, desmuntar el sistema per recuperar la membrana i marcar-hi al costat on s'han transferit les proteïnes.

Per tal de comprovar l'eficiència de la transferència i la càrrega proteica es tenyeix la membrana amb una solució de roig de *Ponceau* ^b i posteriorment destenyir amb aigua.

La membrana es pot guardar entre papers *whatman* a 4°C o bé iniciar la immunodetecció.

^A Tampó de transferència (pH=8.3): 25mM de tris-HCL, 192 mM de glicina i 20% de metanol.

^B Solució roig de Ponceau: 0.2% de roig de Ponceau (Sigma-Aldrich) en àcid tricloracètic al 3%.

○ Transferència semiseca

En aquest tipus de transferència, el gel i la membrana es disposen horitzontalment entre diversos papers 3MM humitejats en tampó que estan en contacte amb dos electròdes. L'avantatge d'aquest sistema és que en trobar-se els dos electròdes a menys distància, es pot aconseguir una major intensitat de corrent i la transferència és més ràpida. A continuació s'indiquen els passos a seguir:

Protocol

Tallar una membrana de nitrocel·lulosa (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire, EUA) i 12 papers 3MM (Whatman®) de la mateixa mida que el gel separador.

Equilibrar el gel separador amb tampó de transferència ^A durant uns minuts. Realitzar la mateixa operació amb una membrana de nitrocel·lulosa i els 12 papers.

Muntar el sistema de transferència sobre l'aparell de transferència (Trans-Blot SD Bio-Rad) col·locant l'un sobre l'altre: 6 papers 3MM, la membrana de nitrocel·lulosa, el gel i 6 papers 3MM més. És molt important mantenir-ho tot ben humitejat amb tampó de transferència, seguir l'ordre especificat i evitar la formació de bombolles entre el gel i la membrana.

Tancar l'aparell i aplicat un amperatge constant (150mA) durant uns 15-20 minuts. La transferència finalitza un cop el voltatge s'ha estabilitzat.

Desmuntar el sistema, recuperar la membrana i marcar-la adequadament. Per tal de poder comprovar l'eficàcia de la transferència es pot tenyir la membrana amb una solució de roig Ponceau.

Guardar la membrana o iniciar la immunodetecció.

^A Tampó de transferència semiseca (pH=8.3): 25mM de tris-HCL, 192 mM de glicina i 0.1% de SDS.

Immunodetecció de proteïnes

Aquest procés permet la detecció específica d'una proteïna d'interès sobre la membrana on s'han transferit les proteïnes aprofitant les propietats del reconeixement antigen-anticòs.

Protocol

Bloqueig de la membrana - Per evitar unions inespecífiques de l'anticòs primari a altres epitops, es bloqueja la membrana durant 1 hora a temperatura ambient en agitació amb una solució rica en proteïnes de la llet (NFDM) o BSA en tampó TBS-Tween ^a.

Incubació anticòs primari – incubar amb l'anticòs primari contra la proteïna d'interès (vegeu taula adjunta) diluït en tampó TBS-Tween durant tota la nit a 4°C en agitació.

Rentar la membrana amb PBS o bé tampó TBS-Tween 3 vegades durant 15 minuts cadascuna, a temperatura ambient i agitació.

Incubació anticòs secundari – incubar amb l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa (vegeu taula adjunta) diluït en tampó TBS-Tween durant 1-2 hores a 4°C i en agitació.

Rentar la membrana amb tampó TBS-Tween 3 vegades durant 15 minuts cadascuna a temperatura ambient i en agitació.

Revelat – incubar la membrana durant 1 minut amb el reactiu ECL (Enhanced Chemiluminescence; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Anglaterra)

Obtenir la imatge mitjançant el software ImageQuant Las4000 (Luminiscent image analyzer) ajustant els paràmetres d'exposició adequats per obtenir el senyal.

^A TBS-Tween: 20mM tris-HCL (pH=8), 150mM NaCl (Serva) i 0.05% Tween-20 (Sigma)

Els anticossos primaris i secundaris que s'han utilitzat per Western Blot són els següents:

ANTICÒS PRIMARI	ANTICÒS SECUNDARI
Conill anti-MafA (1:250, Novus Biologicals)	Anti-conill HRP (1:2000, GE Healthcare)
Conill anti-Akt/p-Akt (T308) (1:1000, Cell Signaling)	Anti-conill HRP (1:5000, GE Healthcare)
Ratolí anti-Creb/p-Creb(S133) (1:1000, Cell Signaling)	Anti-ratolí HRP 1:5000 (1:5000, GE Healthcare)
Conill anti-Erk1/2/p-Erk1/2 (tyr202/204) (1:1000, Cell Signaling)	Anti-conill HRP (1:5000, GE Healthcare)
Conill anti-S6/p-S6 (Ser235/236) (1:1000, Cell Signaling)	Anti-conill HRP (1:5000, GE Healthcare)
Conill anti-Insr/p-Insr (tyr1361)(1:1000, Cell Signaling)	Anti-conill HRP (1:2000, Cell Signaling)
Conill anti-Igf1r/p-Igf1r (tyr1135) (1:1000, Cell Signaling)	Anti-conill HRP (1:2000, Cell Signaling)

Eliminació d'anticossos (Stripping)

Una vegada finalitzat l'assaig de transferència per Western Blot, utilitzant la mateixa membrana, es poden detectar altres proteïnes però per poder-ho portar a terme cal eliminar prèviament els anticossos que hem incubat anteriorment. S'incuba la membrana durant 5 minuts amb aigua milliQ bullint en agitació i es repeteix 3 vegades. A continuació es pot seguir amb el bloqueig i la incubació amb el següent anticòs d'interès o bé assecar la membrana.

ANÀLISIS ESTADÍSTICS

Les dades de les gràfiques s'expressen com la mitjana dels valors en el grup \pm la SEM (Standard Error Mean, mitja de l'error estàndard). S'han realitzat anàlisis de dues-vies (two-way) de variances per analitzar les diferències estadístiques dels tests metabòlics. Per altra banda, les dades han sigut analitzades amb el test Shapiro-Wilk per tal de comprovar i acceptar que se segueix una normalitat, seguit de el test T-Student no paramètric desaparellat per la resta d'experiments. Valors amb $p < 0.05$ es consideren estadísticament significatius. Les dades *outliers* s'han tret de l'anàlisi quan s'allunyaven 2 desviacions estàndards de la mitjana. El programa GraphPad Prism software (versió 6, GraphPad Software, Inc., CA, USA) s'ha utilitzat per fer tots els gràfics i els anàlisis estadístics.

RESULTATS

MODEL MURÍ GEN ANUL·LAT PER LA SUBUNITAT $G\alpha$ ESPECÍFIC DE CÈL·LULA β

Per tal d'investigar el paper de la senyalització GPCR-Gs a la cèl·lula β vam generar un model murí condicional deficient en $G\alpha$ a la cèl·lula β . Inicialment, el vam obtenir creuant ratolins mascles *Ins2Cre*²⁰²; *Gnas*^{f/+} amb femelles *Gnas*^{ff} 203 (veure a Mètodes). Els animals gen anul·lats ($\beta G\alpha$) generats en aquests creuaments no sobreviuen més enllà dels dos dies de vida (p2) i es distingien per absència de llet a l'estómac. A dia postnatal (p) 0, els ratolins deficientes per $G\alpha$ tenien un pes semblant als animals controls de la mateixa camada (control: 1,45±0,07g; $\beta G\alpha$: 1,33±0,056g), presentaven hipoglucèmia (control: 53±9,4mg/dl; $\beta G\alpha$: 18±14,8mg/dl) i hipoinsulinèmia (control: 2,2±2,27mg/ml; $\beta G\alpha$: 0,227±0,073mg/ml) en comparació al grup control. L'estudi morfomètric del pàncrees indicava que els animals KO tenien una àrea fraccional d'insulina similar als controls (control: 0,22±0,06%; $\beta G\alpha$: 0,18±0,07%) i el contingut d'insulina del pàncrees a p0 mesurat mitjançant ELISA tampoc va mostrar diferències significatives entre els animals gen anul·lats respecte al grup control (control: 1724ng insulina/illot; $\beta G\alpha$: 2080,2±733,62ng insulina/illot). Aquests resultats mostraven que el compartiment β pancreàtic no estava afectat i suggeria que defectes a nivell del sistema nerviós central podien estar involucrats en la mort temprana d'aquests animals, donada la reconeguda expressió neuronal de Cre en la línia transgènica *Ins2Cre*.

Davant la impossibilitat de poder estudiar l'establiment de la massa β pancreàtica durant l'etapa postnatal utilitzant el model murí descrit anteriorment, vam optar per utilitzar la nova línia transgènica *knockin Ins1^{Cre}* generada pel Dr. B. Thorens i J. Ferrer²⁰⁴. Aquest model transgènic indueix una recombinació eficient, precisa i selectiva del gen floxejat en les cèl·lules β des del moment del naixement, sense recombinació en el cervell. A més, aquests animals presenten un pes corporal i homeòstasi de la glucosa indistingibles dels animals control, a diferència del model *Ins2Cre*²⁰⁵. Una altre aspecte a tenir en compte és que el promotor *Ins2* és més potent que *Ins1*²⁰⁶ i per tant, això pot portar a concentracions més elevades de la recombinasa Cre les quals són potencialment deletèries.

Generació i comprovació del model animal

Generació del ratolí β -Gsa KO

Per tal de generar el model animal gen anul·lat de $G\alpha$ específic de cèl·lula β , hem creuat mascles *Ins1^{Cre/+}*; *Gnas*^{f/+} amb femelles *Gnas*^{ff}. D'aquests creuaments hem obtingut els següents genotips a les proporcions mendelianes esperades: un 25% de ratolins genoanul·lats *Ins1^{Cre/+}*; *Gnas*^{ff} (als quals anomenem β -Gsa KO), un 25% de ratolins amb la meitat de dosis gènica de *Gnas* a la cèl·lula β (*Ins1^{Cre/+}*; *Gnas*^{f/+}, Htz a la figura), i un 50% de ratolins negatius per Cre que designarem com a controls (Ct) i que inclouen tant *Gnas*^{ff} com *Gnas*^{f/+}. A la Figura 18 es pot observar el patró de bandes de les PCR de genotipatge dels animals.

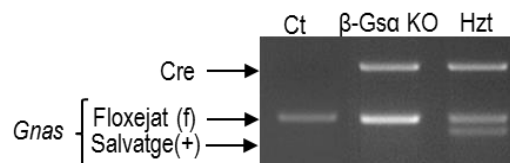


Figura 18. Amplificació per PCR convencional de l'ADN extret d'un petit tall de la cua dels ratolins per tal de d'analitzar el seu genotip. D'esquerra a dreta observem el patró de bandes d'un animal KO (β -Gsa KO), un heterozigot (Hzt) i control (Ct). Es pot observar la banda superior que correspon a la recombinasa Cre, i les dues bandes inferiors que corresponen a l'al·lel *Gnas* floxejat (f) i l'al·lel salvatge (+).

Comprovació de l'eficiència de recombinació

L'expressió del gen *Gnas* en illots pancreàtics isolats de ratolins β -Gsa KO de quatre setmanes d'edat (p28) es troba reduïda en un 50% respecte illots control de la mateixa edat (Fig. 19).

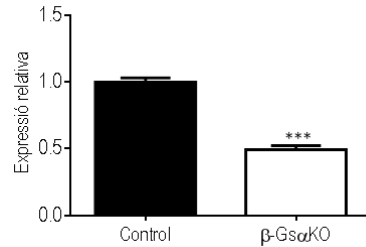


Figura 19. Expressió gènica de *Gnas* en illots isolats d'animals controls i β -Gsa KO a p28. Els resultats s'han analitzat per RT-PCR i s'han normalitzat per *Tbp*. n=12 animals en cada genotip. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana \pm SEM ***p<0.001

L'expressió romanent de *Gnas* en illots β -Gsa KO pot provenir de cèl·lules β que no han recombinat i/o de les cèl·lules no β de l'illot. Per tal de poder determinar l'eficiència de recombinació del nostre model, hem creuat ratolins mascles *Ins1^{Cre/+} ; Gnas^{fl/+}* amb femelles *Gnas^{fl/fl}* que contenen el gen reporter YFP en el locus *Rosa 26* (*Rosa26^{YFP/YFP}*). Els animals nascuts d'aquests creuaments amb el genotip *Ins1^{Cre/+} ; Gnas^{fl/fl} ; Rosa26^{YFP/+}*, expressaran YFP en totes aquelles cèl·lules on hi hagi hagut recombinació. Hem realitzat immunofluorescència utilitzant anticossos específics per Insulina i YFP en pàncrees fixats de ratolins control i *Ins1^{Cre/+} ; Gnas^{fl/fl} ; Rosa26^{YFP/+}* de p28 (Fig.20 A-B). Com era d'esperar, els animals control no mostren expressió de la proteïna fluorescent a l'illot mentre que els β -Gsa KO presenten una proporció entre 80-90% de cèl·lules β amb clar marcatge citoplasmàtic, en alguns casos nuclear, de YFP. Finalment hem avaluat l'expressió gènica de *Gnas* en cèl·lules β purificades mitjançant FACS d'illots que expressen YFP en cèl·lula β d'illots d'animals *Ins1^{Cre/+} ; Gnas^{fl/fl} ; Rosa26^{YFP/YFP}* a p28 i hem trobat una reducció del 95% dels nivells de mRNA, confirmant l'eficiència de recombinació del gen *Gnas* (Fig. 20C).

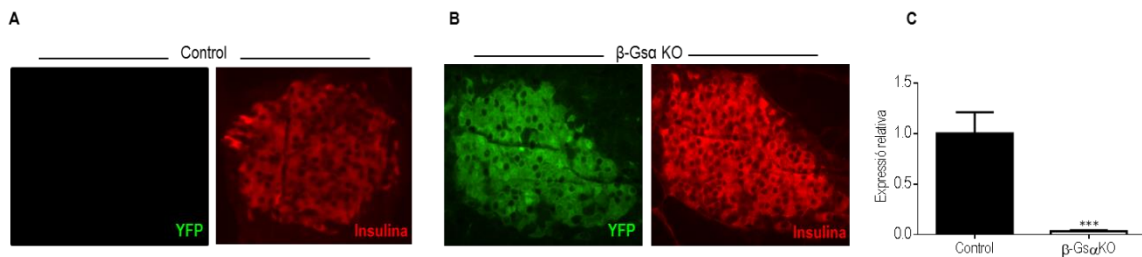


Figura 20. A -B Imatges representatives d'immunofluorescència de pàncrees fixats d'animals p28 control i *Ins1^{Cre/+} ; Gnas^{fl/fl} ; Rosa26^{YFP/+}* (β -Gsa KO YFP) utilitzant anticossos contra YFP (verd) i insulina (vermell). C Nivells d'expressió gènica de *Gnas* en cèl·lules β dissociades d'illots control i *Ins1^{Cre/+} ; Gnas^{fl/fl} ; Rosa26^{YFP/YFP}*. Els resultats s'han analitzat per RT-PCR i s'han normalitzat normalitzats per *Tbp*. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1 n=12 Els valors representen mitjana \pm SEM n=4-6 animals en cada genotip. ***p<0.001.

CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DEL MODEL MURÍ β -G α KO

Edats estudiades

Prèviament a la caracterització del model animal hem seleccionat diferents edats d'interès que se situen en el naixement, abans del deslletament i després del deslletament, moment en que es produeix la transició d'una dieta rica en grasses a una dieta sòlida estàndard. En la següent taula (Taula 3) es mostren les etapes escollides i la seva justificació corresponent:

Edat	Cèl·lula β	
	Proliferació	Maduresa
p0	Molt elevada	Immadura
p7 i p14	Elevada	Incompleta
p28	Baixa	Completa
Adult	Molt baixa	Completa

Taula 3. Taula representant les edats estudiades en aquesta tesi en els animals control i β -G α KO amb la justificació corresponent segons l'estat de proliferació i maduresa de la cèl·lula β .

Caracterització del metabolisme de la glucosa en el model β -G α KO

Pes corporal, glucèmia i insulínemia

Els animals β -G α KO neixen i mantenen un pes corporal similar al dels controls fins a l'etapa adulta, moment en que el seu pes és significativament menor (Fig. 21A). Els ratolins deficientes per G α desenvolupen hiperglucèmia moderada des de la primera setmana de vida (p7) que empitjora a mesura que augmenta l'edat (Fig. 21B). Per altra banda, els nivells d'insulina en sang són normals fins a p28 que és quan els animals β -G α KO exhibeixen hipoinsulinèmia que es manté en l'edat adulta (Fig. 21C).

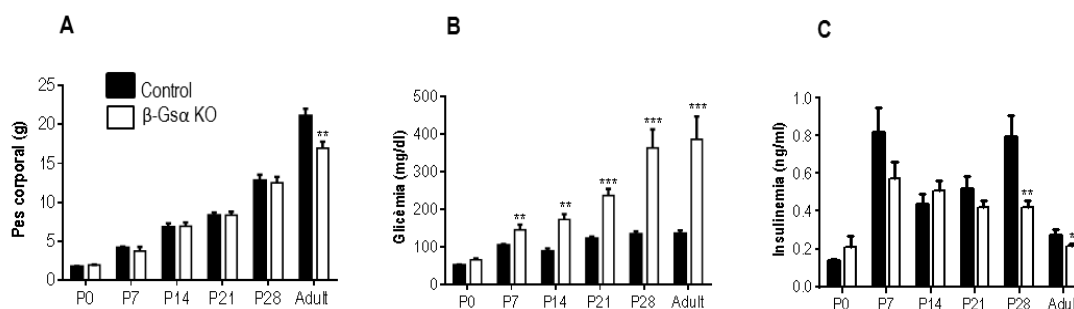


Figura 21. Caracterització general del fenotip dels animals deficientes per G α i controls des de p0 fins l'etapa adulta (8 setmanes d'edat). **A** Pes corporal (g) d'animals control i β -G α KO des de p0 a l'edat adulta **B** Nivells de glucosa en sang o glucèmia (mg/dl) aleatòria d'animals control i β -G α KO des de p0 a l'edat adulta . **C** Nivells d'insulina en plasma o insulínemia (ng/ml) aleatòria d'animals control i β -G α KO des de p0 a l'edat. Els valors representen mitjana \pm SEM de 30 animals control i 20 animals gen-anul·lats. * p <0.05, ** p <0.01 i *** p <0.001.

Homeòstasi de la glucosa

Per tal de detectar possibles defectes en la funció endocrino-pancreàtica com a conseqüència de l'eliminació de la subunitat G α de les cèl·lules β del pàncrees, hem estudiat el metabolisme de la glucosa mitjançant diferents tests metabòlics en animals de p28 (1 setmana després deslletament) (Fig. 22) i animals adults (Fig. 23).

A p28 els animals β -G α KO exhibeixen intolerància a la glucosa tant quan aquesta hexosa s'administra mitjançant injecció intraperitoneal (IpGTT) com de manera oral (OGTT). També presenten un defecte en la secreció de insulina estimulada per glucosa *in vivo* (GSIS). No obstant, no exhibeixen defectes en la sensibilitat perifèrica a la insulina mesurada amb el test de tolerància a insulina (ITT).

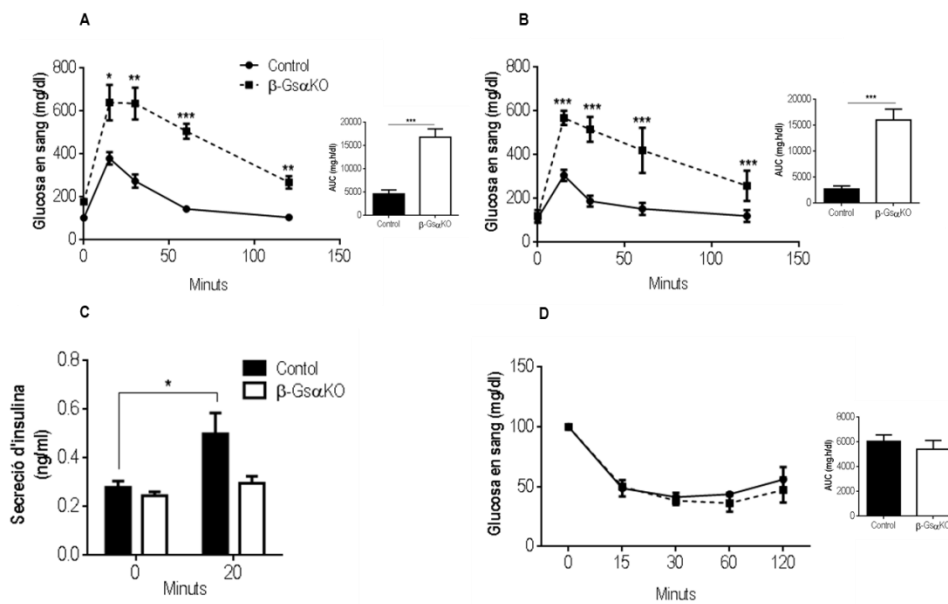


Figura 22. Tests metabòlics en animals controls i β -G α KO a p28. **A** Corbes de glucèmia (mg/dl) del test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (IpGTT) i càlcul de l'àrea sota la corba (AUC). **B** Corbes de glucèmia (mg/dl) del test oral a la glucosa (OGTT) i càlcul de l'AUC. **C** Nivells de secreció d'insulina (ng/ml) estimulada per glucosa *in vivo* (GSIS) al minut 0 i 20. **D** Corbes de glucèmia (mg/dl) del test de tolerància a la insulina (ITT) i càlcul l'AUC. Els valors representen mitjana \pm SEM de 5 animals control i 5 animals gen anul·lats en tots els tests de 2 experiments independents * p <0.05, ** p <0.01 i *** p <0.001

A l'etapa adulta els animals β -G α KO exhibeixen un patró metabòlic molt semblant que a p28. Presenten una clara intolerància a la glucosa tan en la IpGTT com en la OGTT sense signes de resistència perifèrica a la insulina (Fig. 23).

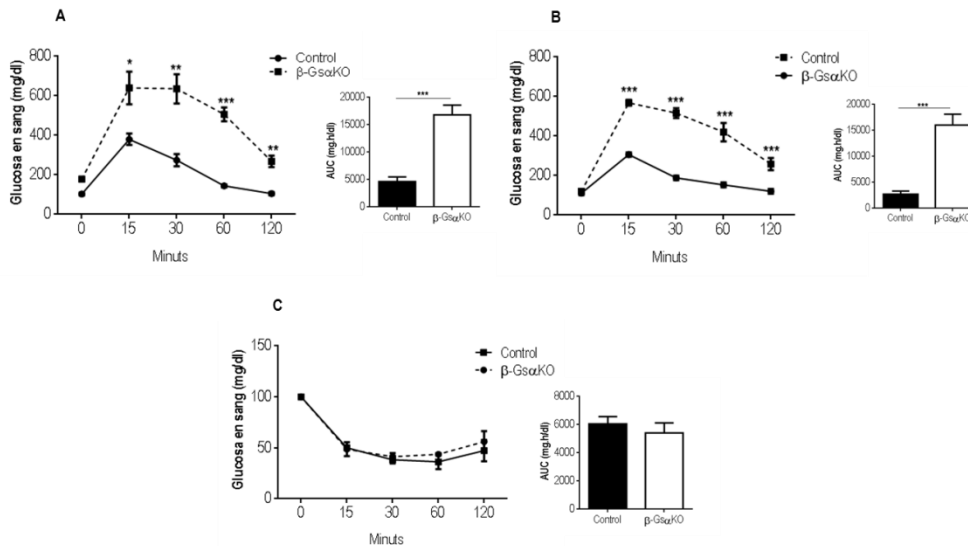


Figura 23. Tests metabòlics en animals controls i β -Gsa KO adults. **A** Corbes de glucèmia (mg/dl) del test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (IpGTT) i càlcul de l'àrea sota la corba (AUC). **B** Corbes de glucèmia (mg/dl) del test oral a la glucosa (OGTT) i càlcul de l'AUC. **C** Corbes de glucèmia (mg/dl) del test de tolerància a la insulina (ITT) i càlcul l'AUC. Els valors representen mitjana \pm SEM de 5 animals control i 5 animals gen anul·lats en tots els tests de 2 experiments independents * p <0.05, ** p <0.01 i *** p <0.001.

Aquestes dades indiquen que l'ablació de la subunitat Gsa en cèl·lula β provoca una intolerància a la glucosa a nivell de l'organisme sencer la qual s'associa a defectes en la secreció d'insulina sense canvis en la resposta perifèrica a aquesta hormona.

CARACTERITZACIÓ DEL COMPARTIMENT β -PANCREÀTIC EN EL MODEL β -Gsa KO

Els resultats mostrats anteriorment mostren defectes en l'homeòstasi de la glucosa en els animals β -Gsa KO que ja són observables des de p7 (hiperglucèmia) i demostrables mitjançant tests metabòlics a p28. L'etapa postnatal temprana (des de p0 fins a p28) es considera un període de desenvolupament crític per l'establiment adequat d'una massa cel·lular β suficient i funcional que pot influir en la susceptibilitat de desenvolupar DM2 en l'edat adulta. Hem volgut estudiar si el fenotip observat és conseqüència de defectes en la funcionalitat de la cèl·lula β i/o defectes en l'establiment de la massa cel·lular β .

Anàlisi de la funció insulino–secretora del model β -Gsa KO

Donat que els animals transgènics són hipoinsulinèmics a partir de p28 i desenvolupen una clara intolerància a la glucosa i una resposta insulino-secretora deficient *in vivo*, hem volgut estudiar si això es deu a un defecte intrínsec en la capacitat secretora de la cèl·lula β . Per això, hem estudiat la secreció d'insulina en incubacions estàtiques d'illots isolats a p28 (Fig. 24A) i en adults (Fig. 24B).

A p28 els illots β -Gsa KO exhibeixen secreció d'insulina en resposta a glucosa, si bé són incapaços d'augmentar la secreció entre les concentracions de glucosa de 11mM i 16.7 mM. També responen a forskolina, un activador directe de l'enzim AdC, però no responen a exendina-4, anàleg de Glp1 que actua via GPCR-Gs. A l'etapa adulta els illots β -Gsa KO perden la resposta en totes les condicions estudiades. Cal tenir present que fins a p28 a nivell macroscòpic els illots no són distingibles entre controls i β -Gsa

Implicació de la senyalització dependent de G α en l'establiment de la massa cel·lular β

KO però a l'edat adulta s'observa un canvi en la seva aparença macroscòpica sent menys arrodonida i translúcids compatible amb menys densitat cel·lular, característiques que estan en línia amb l'empitjorament de la capacitat insulino-secretora observada.

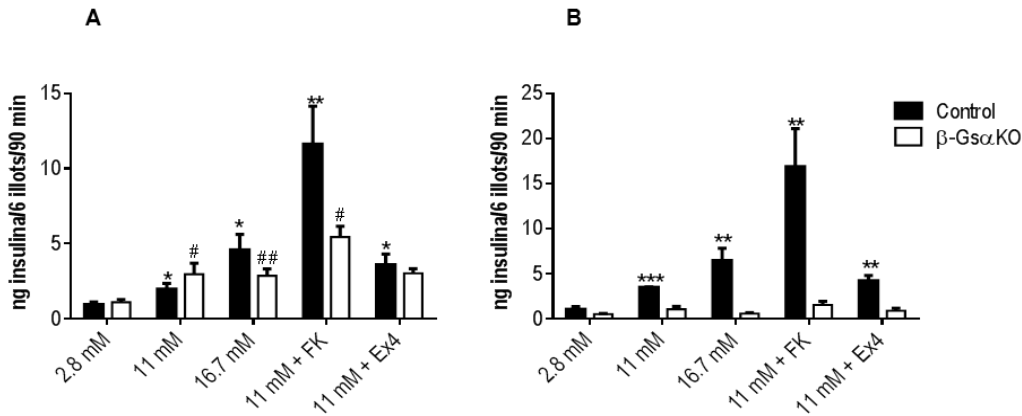


Figura 24. **A** Nivells de secreció d'insulina a diferents condicions d'estimulació: glucosa 2.8 mM, glucosa 11 mM, glucosa 16.7 mM, forskolina (10 μ M) i exendina-4 (200 nM) durant 90 min en illots isolats d'animals control i β -G α KO p28 i **B** adults. Els valors representen mitjana \pm SEM de n=3-7 rèpliques en cada condició. *#p<0.05, **/##p<0.01 i ***/###p<0.001 N=3-7 (*control # β -G α KO).

Estudi macroscòpic del pàncrees

No s'observen diferències en el pes del pàncrees en cap de les edats estudiades (Fig. 25A). Per tal de veure la integritat, estructura i arquitectura del pàncrees hem realitzat una tinció hematoxilina-eosina, la qual mostra l'absència d'alteracions macroscòpiques evidents entre els dos grups d'animals, assumint en aquest cas que els animals gen anul·lat presenten un patró histològic normal (Fig. 25B).

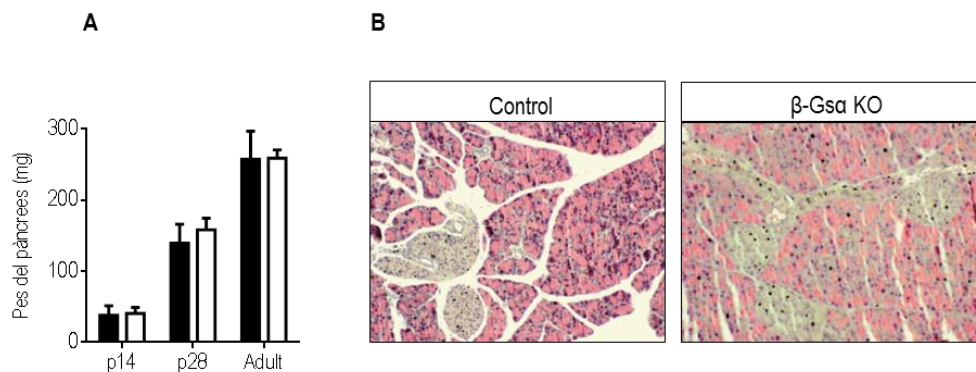


Figura 25. **A** Pes del pàncrees (mg) d'animals p14, p28 i adults n=15-20. **B** Imatges representatives d'una tinció hematoxilina-eosina de pàncrees fixats d'animals control i β -G α KO a p28.

Anàlisi morfomètric del pàncrees endocrí en animals β -G α KO

Hem realitzat un estudi morfomètric de les àrees positives per insulina i glucagó en pàncrees fixats de ratolins de diferents edats. Aquesta anàlisi mostra que a p0 els β -G α KO presenten una àrea fraccional d'insulina similar a la dels controls (Fig. 26A-B) indicant que l'ablació de la subunitat G α no altera la

formació de cèl·lules β durant l'etapa embrionària. Pel que fa al compartiment α , s'observa un augment significatiu en l'àrea fraccional. Més endavant, a p14 es comença a mostrar una tendència de disminució tant en l'àrea fraccional insulino-positiva com en la massa β sense canvis en el compartiment α . És a p28 quan apareix una reducció estadísticament significativa en l'àrea fraccional d'insulina i una reducció de la massa β en comparació amb el grup control. Aquest defecte es manté en l'etapa adulta. Tan a p28 com a l'edat adulta no s'observen canvis significatius en el compartiment α (Fig. 26 B-E).

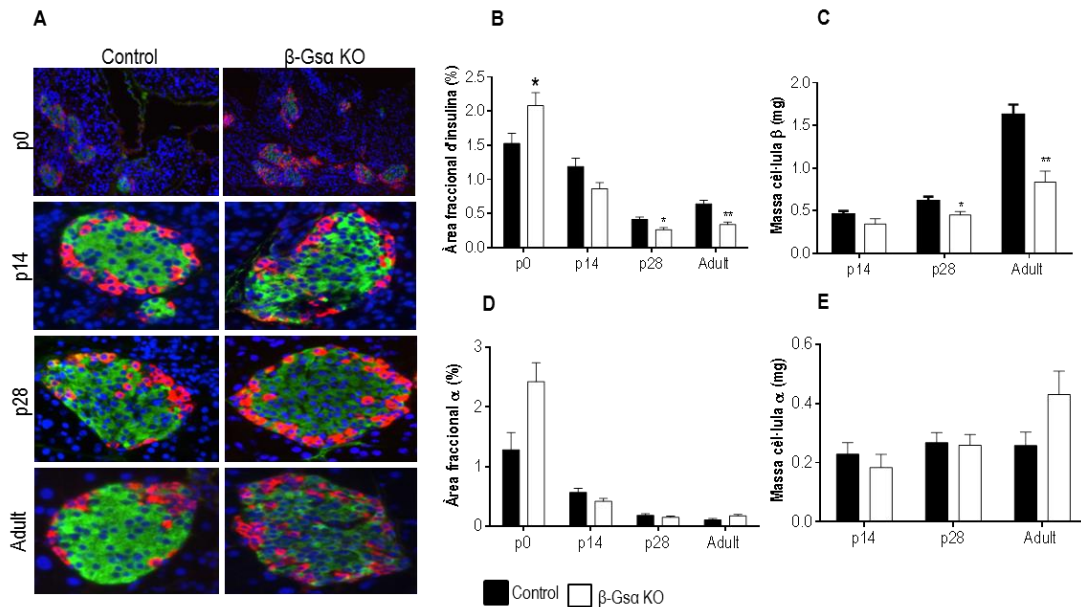


Figura 26. Anàlisi morfomètric de pàncrees fixats d'animals control i β -Gsa KO a les edats: p0, p14, p28 i adults. **A** Imatges representatives d'immunofluorescència utilitzant anticossos contra insulina (verd), glucagó (vermell) i nuclis (blau). **B** Àrea fraccional d'insulina (%= àrea d'insulina / àrea total del pàncrees x 100). **C** Massa de cèl·lula β (mg= àrea fraccional x pes del pàncrees). **D-E** Àrea fraccional i massa cèl·lula α . Els valors representen mitjana \pm SEM de n=5-6 animals en cada anàlisi. * p <0.05, ** p <0.01.

En col·laboració amb el grup del Professor Ulf Ahlgren del Departament de Medicina Molecular de Umeå, Suècia, hem analitzat pàncrees d'animals control i β -Gsa KO a p28 per tomografia de projecció òptica (OPT). Mitjançant aquesta tècnica es pot analitzar el pàncrees en la seva totalitat a diferència dels estudis morfomètrics on se seleccionen un nombre limitat de seccions per fer l'estudi. Hem trobat que els animals β -Gsa KO i controls no mostren diferències en el volum pancreàtic total com tampoc en el volum dels seus illots (Fig. 27A&B). No obstant, els pàncrees dels animals β -Gsa KO tenen un nombre menor d'illots, en concret dels illots classificats de mida petita ($<1^6 \mu\text{m}^3$) en comparació amb el grup control (Fig. 27C-E).

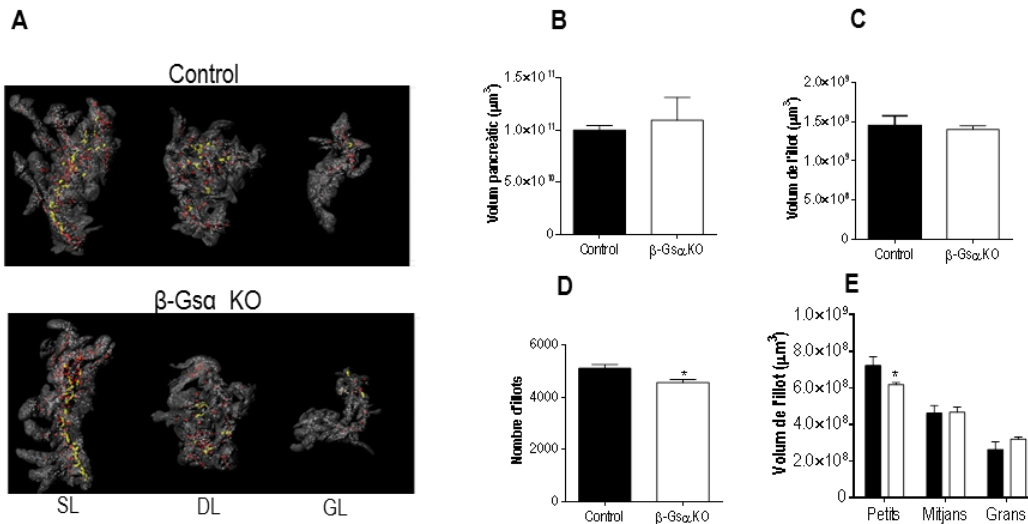


Figura 27. Anàlisi morfomètric utilitzant la tècnica OPT en animals control i β -Gs α KO a p28. Imatges representatives 3D de les 3 regions (SL, DL, GL) d'un pàncrees control i de ratolí KO. **A** Representació del volum pancreàtic total d'illots control i β -Gs α KO, **B** de la mitjana del volum dels illots, **C** del nombre total d'illots **D** i la distribució del nombre d'illots segons la seva mida (petits, mitjans i grans). Els valors representen mitjana \pm SEM de n=3-4 animals de cada genotip. * p <0.05.

Aquests resultats demostren que la deficiència de la subunitat Gs α en cèl·lula β impedeix l'expansió de la massa cel·lular β durant l'etapa postnatal temprana.

Estudi de la proliferació i mort de les cèl·lules β en animals β -Gs α KO

Immunofluorescència de Ki67 i fosfo-histona H3

En aquest punt ens preguntem si la disminució de l'àrea fraccional d'insulina i la massa de cèl·lula β observats anteriorment, estan relacionades amb una reducció en la taxa de proliferació i/o en un augment en els nivells d'apoptosi d'aquestes cèl·lules en illots isolats d'animals p14 i p28. En la immunofluorescència de pàncrees fixats d'animals control i β -Gs α KO hem utilitzat dos tipus de marcadors diferents: Ki67 que marca nuclis en cicle cel·lular i la fosfo-histona H3 (pH3) que marca nuclis en mitosi. Hem analitzat la taxa de proliferació quantificant el percentatge de cèl·lules doblement positives per insulina i pels marcadors de proliferació.

Els pàncrees dels animals β -Gs α KO presenten una reducció significativa en la proliferació de cèl·lula β a p28 quan es mesura tan amb Ki67 com amb pH3 (Fig. 28A&C). De fet, a p14 ja s'observa una clara disminució en els nivells de proliferació amb el marcatge de p-H3 (Fig. 28C).

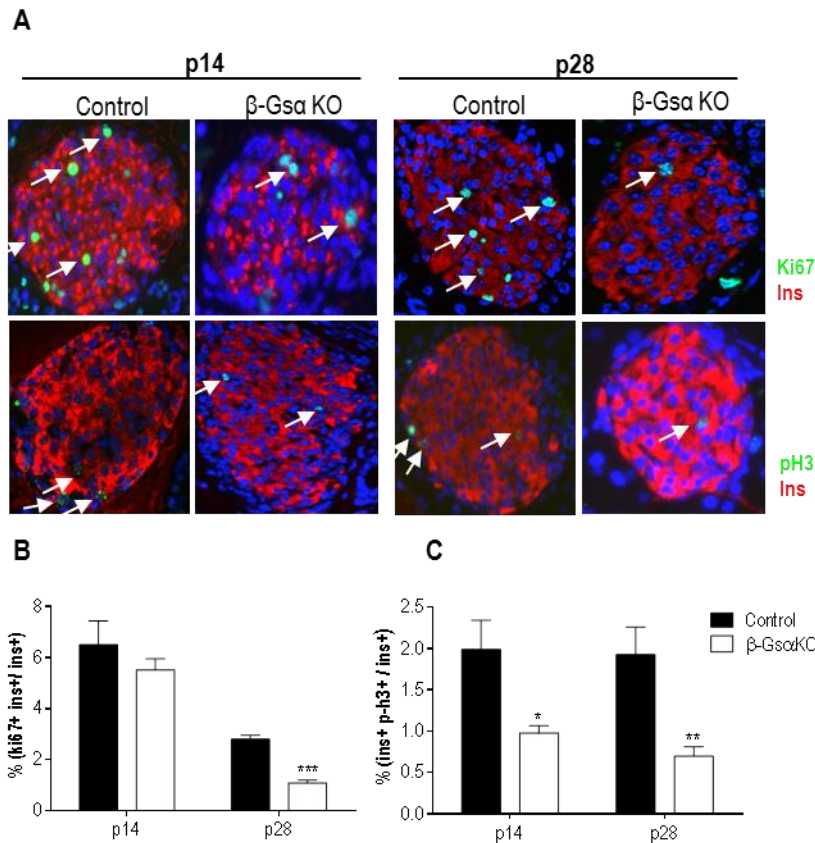


Figura 28. A Immunofluorescència de insulina (vermell) i Ki67 (verd) o fosfo-Histona H3 (verd) en pàncrees fixats d'animals control i β -Gsa KO p14 i p28. **B-C** Quantificació corresponent de les immunofluorescència del panell a. Els valors representen mitjana \pm SEM de n=3-5 animals de cada genotip. * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001.

A continuació hem estudiat els nivells basals d'expressió de gens rellevants en cycle cel·lular en illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a les edats p14 i p28.

Illots isolats d'animals β -Gsa KO a p14 exhibeixen un augment en els nivells d'expressió de *Cdkn1a*, el qual inhibeix l'activitat de Cdk en les fases de G1/S i G/M de cycle, a més d'unir-se a l'antigen nuclear de proliferació cel·lular PCNA, inhibint d'aquesta manera la replicació del DNA. No hi ha canvis en la resta de gens. De fet mostren un augment en la *Ccna2* malgrat la reducció observada anteriorment en els nivells de proliferació valorats pel marcador de proliferació p-H3 des d'aquesta edat, suggerint un mecanisme de compensació en aquesta edat (Fig. 29A). En canvi, dues setmanes més tard, a l'edat p28, els illots β -Gsa KO presenten una disminució significativa en els nivells basals d'expressió gènica de *Ccna2*, *Cdk4*, *Ki67* i *FoxM1* junt amb l'augment en l'expressió de *Cdkn1a* observat a p14 (Fig. 29B). Tots aquests canvis en expressió gènica suporten l'observació prèvia de reducció en la proliferació de la cel·lula β .

Implicació de la senyalització dependent de Gsa en l'establiment de la massa cel·lular β

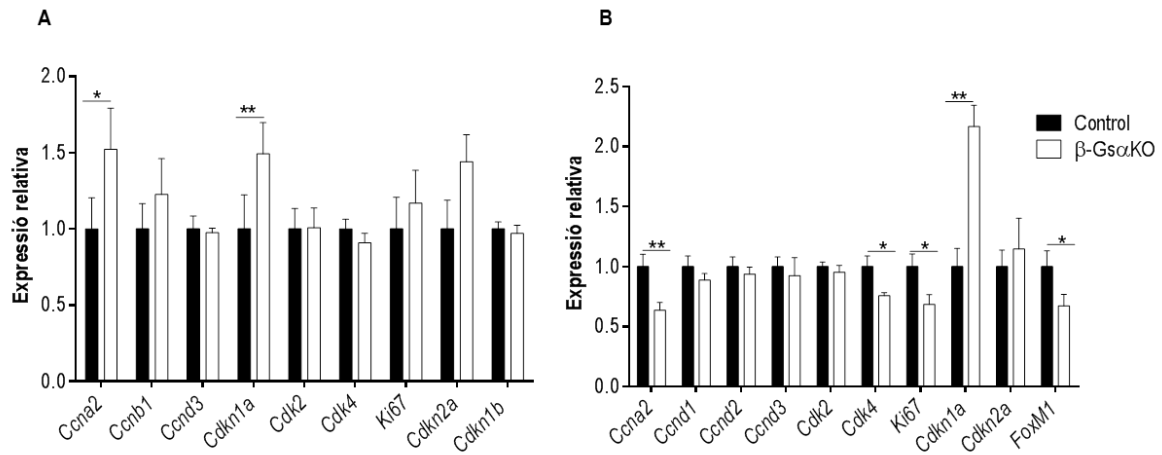


Figura 29. Nivells d'expressió de gens rellevants en cicle cel·lular en illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a l'edat **A** p14 i **B** p28. Expressió normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana \pm SEM de n=7-10 animals de cada genotip * p <0.05 ** p <0.01.

Donat que molts dels gens que presenten un efecte en proliferació també afecten a les vies de mort cel·lular, hem volgut quantificar la taxa d'apoptosi de les cèl·lules β utilitzant l'assaig TUNEL que detecta la fragmentació de l'ADN característica del procés apoptòtic. En aquest cas no s'observen diferències en els nivells d'apoptosi en els animals β -Gsa KO en comparació amb el grup control en cap de les edats estudiades: p7, p14, p21, p28 i adult (dades no mostrades). Per altra banda, l'estudi de l'expressió de gens d'apoptosi i d'estrès de reticle endoplasmàtic en illots isolats d'animals control i β -Gsa KO p28 (Fig. 30A-B) i p14 (Fig. 30C-D) tampoc es es mostra alterada.

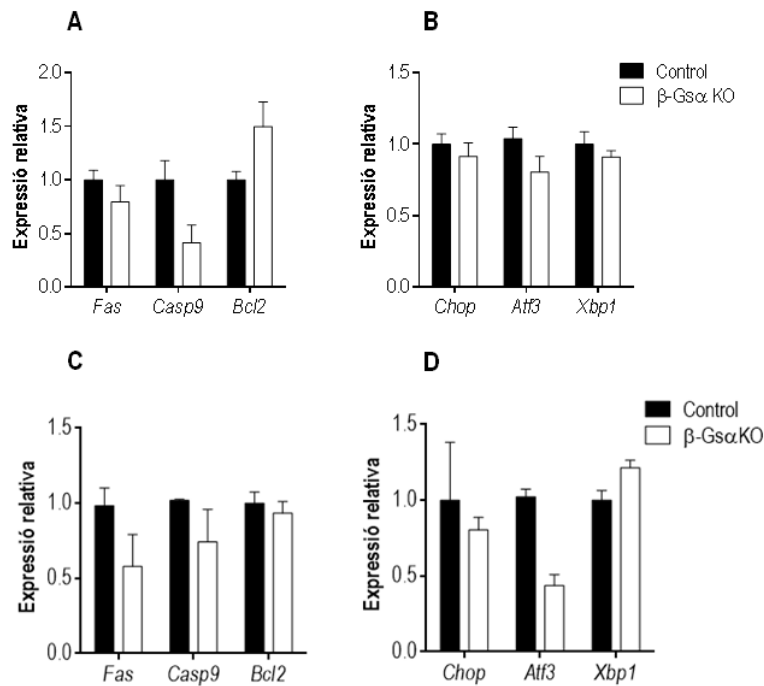


Figura 30. Nivells d'expressió gènica de gens rellevants en apoptosi d'illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a **A** p28 i **B** p14. Nivells d'expressió gènica de gens rellevants d'estrès de reticle endoplasmàtic d'illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a **C** p28 i **D** p14. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Expressió normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana \pm SEM de n=8-10 animals de cada genotip.

Aquests resultats indiquen que la reducció en massa cel·lular β que apareix a p28 es correlaciona amb una baixada en la taxa de proliferació de les cèl·lules deficientes per Gsa sense que hi hagi un increment mesurable dels nivells d'apoptosi.

En aquest punt de la tesi hem decidit centrar la major part del treball a l'edat p28, moment en que apareixen la majoria d'alteracions estudiades. Tot i així, hem continuat analitzant algunes dades a p7 i p14, així com en l'etapa adulta per tal d'aprofundir en el mecanisme dels resultats obtinguts.

IDENTIFICACIÓ DE LES ALTERACIONS MOLECULARS EN ELS ILLOTS POSTNATALS β -Gsa KO

En aquesta segona part de l'estudi tenim com a objectiu la identificació dels determinants moleculars responsables del defecte en l'expansió de la massa cel·lular β observat en els animals β -Gsa KO.

Nivells d'AMPc

En primer lloc hem volgut determinar l'impacte de l'ablació de Gsa sobre els nivells basals d'AMPc i en resposta a una estimulació amb forskolina, i amb exendina-4 en illots isolats d'animals p28 i adults. La quantificació de l'AMPc va ser portada a terme pel laboratori del Dr. Stephane Dalle de Montpelier.

Els illots β -Gsa KO isolats no estimulats d'ambdues edats presenten nivells dràsticament reduïts d'AMPc en comparació amb el grup control (-85%) (Fig. 31A), tot i així els nivells augmenten significativament quan els illots s'estimulen durant 90 minuts amb forskolina (Fig. 31B-C). Aquests resultats demostren que la part de la via de senyalització després de l'AdC no es troba afectada. Pel que fa a la resposta d'exendina-4 a p28 els illots controls i β -Gsa KO no responen a l'anàleg de Glp1 (Fig. 31B). En el cas dels animals transgènics era d'esperar ja que presenten una deleció de la subunitat Gsa i per tant, no poden activar la via canònica d'aquesta senyalització, mentre que pel que fa al grup control suggerim que en aquesta edat el sistema d'incretines encara podria no està completament desenvolupat o madur i per tant, no tenir la capacitat per generar una resposta. No obstant, a l'edat adulta els illots KO continuen sense respondre a exendina-4 a diferència del grup control que respon augmentant els nivells del segon missatger (Fig. 31C).

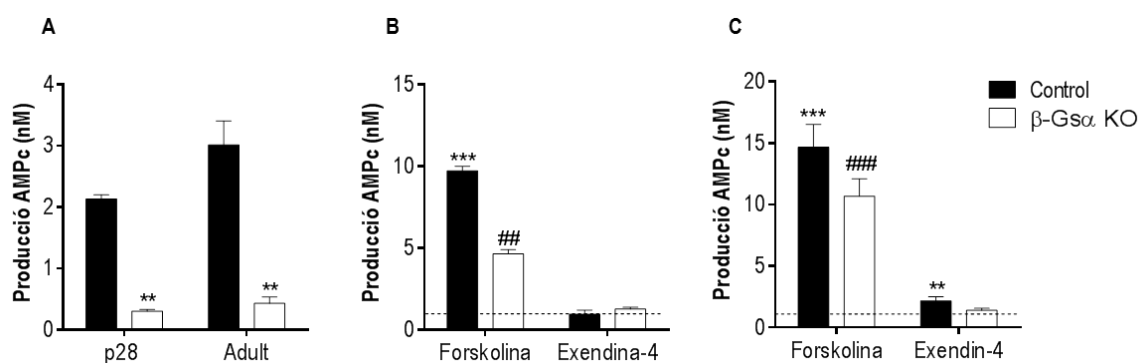


Figura 31. A Nivells basals d'AMPc (nM) en illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a p28 i adults. B-C Producció d'AMPc (nM) en resposta a 90 min d'estimulació amb forskolina (10 μ M) i exendina-4 (200 nM) en illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a p28 i adults. Els valors representen mitjana \pm SEM de n=6 animals de cada genotip **/### p <0.01 ***/### p <0.001 (* diferències entre controls # diferències entre transgènics).

Expressió de components de la via Gs-cAMP en illots murins

Hem estudiat els nivells d'expressió gènica de diferents components (receptors, components transducció de senyal, efectors) de la senyalització de la via Gs-cAMP a en illots isolats d'animals control i β-Gsα KO a p28.

Les cèl·lules β expressen diferents Gs-GPCRs sent els principals i més coneguts els dels receptors de les hormones incretines Glp1 i Gip, no obstant no són els únics ja que també expressen Gcgr (receptor de glucagó, el receptor cannabinoide Gpr119, PACAP (polipèptid activador de de l'adenilat ciclase pitüitària), VIPR2 (receptor del pèptid vasoactiu intestinal), B2r (receptor de noradrenalina), P2Y (receptor d'ADP i ATP) o Gal1R (receptor de galanina 1).

Els nivells basals d'expressió dels receptors en illots isolats d'animals β-Gsα KO a p28 (Fig. 32) mostra una forta disminució en *Glp1r*, *Gipr*, com també de *Gpr119*, mentre que *Gcgr* es troba augmentat. Aquests resultats estan en línia amb articles on observen un augment en els nivells d'expressió de *Gcgr* en illots isolats murins incubats amb dosis elevades de glucosa (22 mM), mentre que en aquesta mateixa concentració de glucosa apareix una disminució moderada però significativa en els nivells gènics de *Glp1r*^{207,208,209}. No hi ha alteracions en l'expressió gènica de les arrestines (*Arb1* i *Arb2*), proteïnes carcassa que s'adapten al receptor acoblat a proteïna G de Glp1r i promouen la seva funcionalitat¹⁴⁷ però sí s'observa una disminució en els nivells de dues subunitats de l'enzim PKA, la subunitat reguladora *Prkarb1* i la subunitat catalítica *Prkaca1*, com també d'*Akap11*. Per altra banda, l'estudi de la senyalització d'AMPc que segueix la via Epac 1/2 mostra un augment en els nivells d'expressió del gen *Rapgef3* (Epac 1). Finalment hem estudiat els factors de transcripció Creb i Nfat, efectors de la part final de la via d'AMPc/PKA i AMPc/Epac, respectivament. En aquest cas no apareixen diferències en els nivells dels transcrits que codifiquen per *Nfat* però sí una reducció moderada de la isoforma *Creb3* i en una de les seves principals dianes transcripcionals, *FoxO1*.

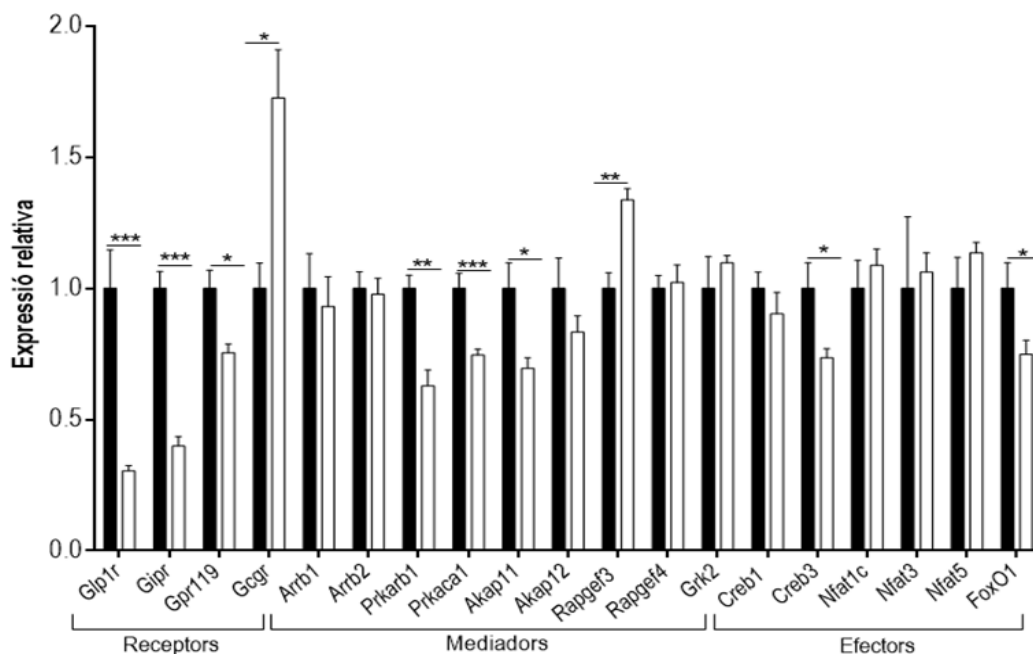


Figura 32. Expressió gènica de receptors, mediadors i efectors de la via de senyalització de les incretines en illots isolats d'animals control i β-Gsα KO a p28. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. L'expressió gènica ha estat normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. Els valors representen mitjana±SEM de n=7-12 animals de cada genotip *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

Per tal d'assegurar-nos que no apareixen mecanismes compensatoris i/o un desequilibri entre la senyalització Gs-AMPC i Gi-AMPC com a conseqüència de l'ablació de Gs α en cèl·lula β , hem analitzat els nivells d'expressió gènica dels tres gens que codifiquen per les isoformes de la subunitat G inhibidora en la cèl·lula β (*Gnai1*, *Gnai2* i *Gnai3*) en illots isolats d'animals control i β -Gs α KO a p28 (Fig. 33). No obstant, no s'observen alteracions estadísticament significatives entre illots KO i control, suggerint que no hi ha alteració de la branca Gi com a conseqüència de la pèrdua de Gs.

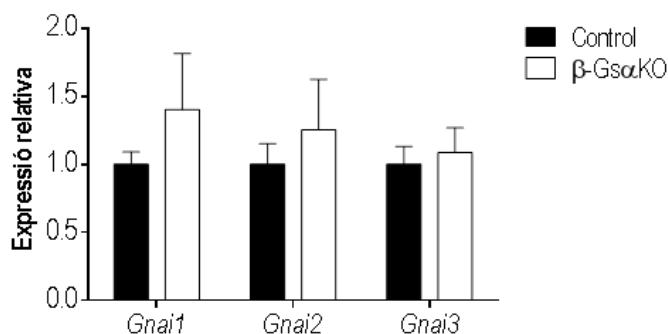


Figura 33. Expressió gènica de les tres subunitats Gi (*Gnai1*, *Gnai2* i *Gnai3*) en illots isolats d'animals control i β -Gs α KO a p28. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. L'expressió gènica ha estat normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. Els valors representen mitjana \pm SEM de n=7-8 animals de cada genotip.

A continuació hem estudiat el factor de transcripció Creb el qual ha sigut descrit com a factor clau en la secreció d'insulina, transcripció del gen de la insulina i la supervivència de la cèl·lula β ¹²¹. Hem analitzat els nivells totals de proteïna de Creb per WB en illots isolats de ratolins control i β -Gs α KO a p28. Una setmana després del deslletament, els illots β -Gs α KO exhibeixen una disminució significativa en els nivells totals de proteïna (Creb/tubulina) així com en els nivells de fosforilació a (pCreb/Creb) en comparació amb els illots control (Fig. 34A-C).

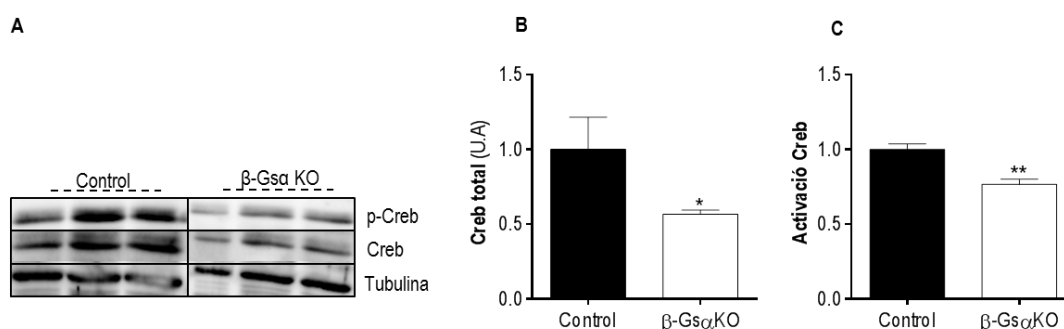


Figura 34. **A** WB dels nivells de Creb en illots isolats d'animals control i β -Gs α KO p28. **B** Quantificació per densiometria del panell (a) dels nivells basals de Creb (Creb/Tubulina) (Unitats arbitràries= U.A) i **C** nivells de fosforilació de Creb (p-Creb/Creb). Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana \pm SEM de n=4 animals de cada genotip de 3 experiments independents ** p <0.01.

La disminució en els nivells d'activació de Creb que apareix en illots isolats d'animals β -Gs α KO a p28 ens ha sorprès que fos moderada ja que tal i com s'ha mostrat anteriorment, els nivells basals d'AMPC

Implicació de la senyalització dependent de Gsα en l'establiment de la massa cel·lular β

són molt baixos en aquesta edat en comparació amb el grup control. Aquest resultat ens fa pensar que la fosforilació del factor de transcripció dels illots transgènics podria venir donada per altres quinases diferents a PKA que puguin estar relacionades amb la via de senyalització.

Aleshores hem estudiat els nivells basals d'activació de la quinasa Erk1/2 en illots isolats d'animals control i β-Gsα KO a p28. Aquesta quinasa s'activa per la via AMPc/ePAC/Rap1 i fosforila a Creb, entre d'altres efectors¹²⁹. Tal i com es pot observar a la Figura 35 no s'observen alteracions en el *ratio* d'activació basal d'Erk en els illots deficientes per Gsα en comparació amb el grup control.

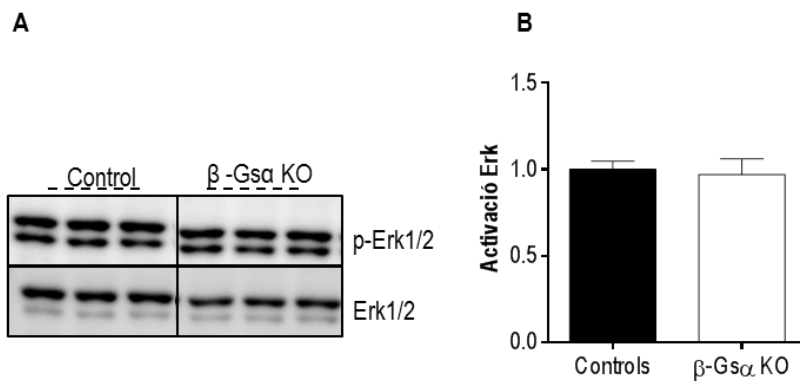


Figura 35. **A** WB dels nivells d'Erk1/2 en illots isolats d'animals control i β-Gsα KO p28. **B** Quantificació per densitometria del panell (a) dels nivells d'activació d'Erk1/2 (p-Erk1/2/Erk1/2). Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana±SEM de n=7 animals de cada genotip de 2 experiments independents.

Per estudiar en més profunditat la funcionalitat de la via de senyalització Gs/AMPc, hem realitzat un experiment d'estimulació aguda a 5 i 15 minuts en illots controls i β-Gsα KO de sis setmanes d'edat després d'una recuperació d'una nit en medi complet seguit d'un blanqueig amb medi RPMI 0.5% de FBS i 8 mM de glucosa. Els illots β-Gsα KO incubats amb exendina-4 no presenten un augment en els nivells de fosforilació de Creb, mentre que tal i com esperàvem, en el cas dels illots control s'observa una activació del factor de transcripció quan s'estimula la via de senyalització (Fig. 36).

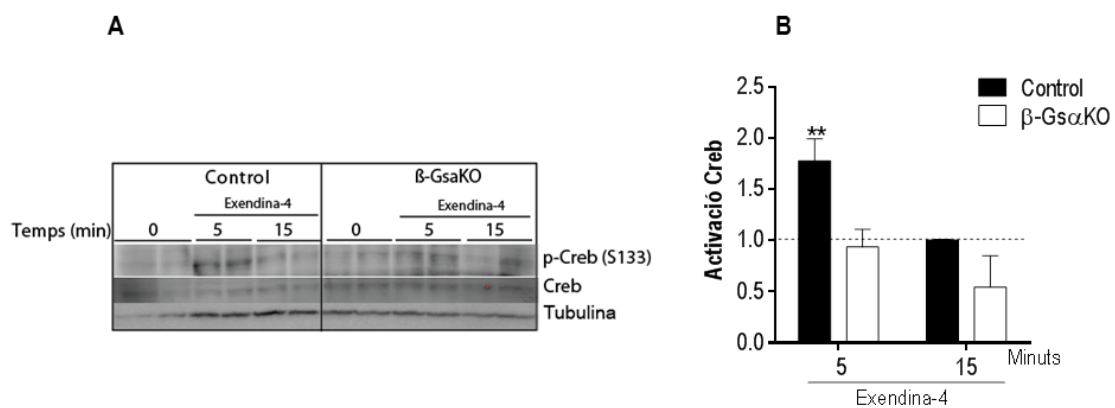


Figura 36. **A** WB de Creb en illots isolats d'animals control i β-Gsα KO de 4-6 setmanes d'edat després d'una estimulació aguda a 5 i 15 min amb exendina-4 (200 nM) amb 0.1% FBS i 8 mM de glucosa. **B** Quantificació densitòmica del panell (a) dels nivells d'activació de Creb (p-Creb/Creb). Un cop s'han isolat els illots, s'incuben 24 h en medi complet amb 10% de FBS i 11 mM de glucosa i seguidament es posen en medi de privació durant 24 h amb 0.1% FBS i 8 mM de glucosa per tal de realitzar l'experiment el dia següent. Els valors de la condició control (0 min) s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana±SEM de 3 grups d'animals cada n amb n=2 de cada condició de 2 experiments independents **p<0.01.

En aquest experiment d'estimulació aguda també hem analitzat els nivells de fosforilació d'Erk1/2. Després de l'incubació amb exendina-4 es pot observar que grup control respon adequadament augmentant de manera sostinguda l'activació de la quinasa en els dos temps, mentre que en el cas dels illots β -Gsa KO als 15 minuts d'estimulació la fosforilació arriba pràcticament als nivells basals (Fig. 37). Aquest resultat coincideix amb articles de la literatura demostrant que l'AMPC contribueix en el manteniment de la fosforilació de Erk1/2¹¹².

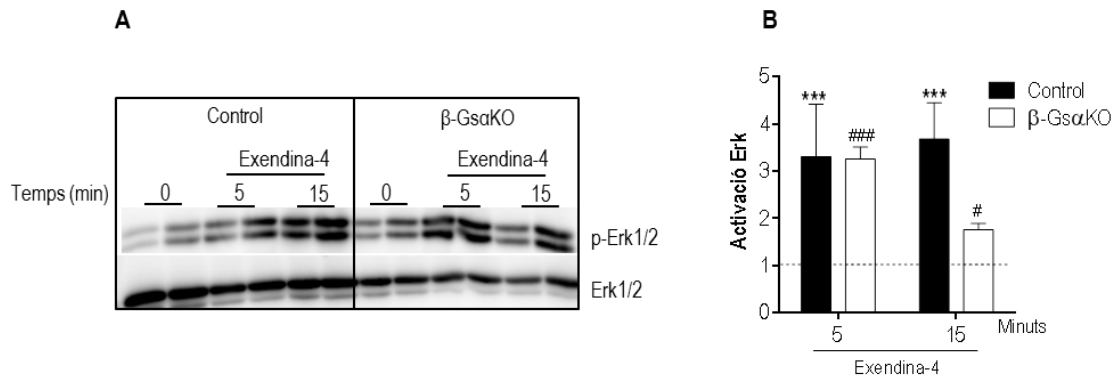


Figura 37. **A** WB de la quinasa Erk1/2 en illots isolats d'animals control i β -Gsa KO de 4-6 setmanes d'edat després d'una estimulació aguda a 5 i 15 min amb exendina-4 (200 nM) amb 0.1% FBS i 8 mM de glucosa. **B** Quantificació densiomètrica del panell (a) del nivell d'activació d'Erk (p-Erk/Erk). Un cop s'han isolat els illots, s'incuben 24 h en medi complet amb 10% de FBS i 11 mM de glucosa i seguidament es posen en medi de privació durant 24 h amb 0.1% FBS i 8 mM de glucosa per tal de realitzar l'experiment el dia següent. Els valors de la condició control (0 min) s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana \pm SEM de 3 grups d'animals cada n amb n=2 de cada condició de 2 experiments independents *** p <0.001 (Ct) / ### p <0.001 (β -Gsa KO).

Seguidament hem estudiat dianes gèniques conegudes de Creb per tal de verificar les conseqüències de la menor activació d'aquest factor de transcripció. Entre les dianes analitzades hi ha els gens *Igf1r* i *Irs2*¹⁷⁹ de la via d'igf1/insulina, els gens marcadors d'identitat de cèl·lula β *Pdx1* i *Mafa* i el regulador de cycle cel·lular *Ccna2*¹²¹ el qual es troba disminuït en els illots β -Gsa KO a p28 tal i com hem mostrat anteriorment en la Fig. 29.

Trobem una disminució significativa dels mRNAs de *Pdx1* i *Mafa*. En canvi, l'expressió d'altres gens específics de cèl·lula β no dianes de Creb com *NeuroD1*, *Nkx6.1*, *Ngn3* i *laPP* no es troben alterats en els illots deficients per Gsa en cèl·lula β , la qual cosa suggereix que la reducció en *Pdx1* i *Mafa* no es pot explicar només per un menor contingut de cèl·lula β per illots (Fig. 38A). Per altra banda, els illots β -GsaKO mostren una reducció significativa en els nivells d'expressió gènica de *Igf1r* mentre que *Irs2* es troba moderadament augmentat. Donat que *Irs2* també s'expressa a cèl·lula α , hem estudiat la seva expressió en cèl·lules β purificades mitjançant FACS d'illots que expressen YFP en cèl·lula β (veure a Mètodes). Veiem que *Irs2* que apareixia augmentat en illots sencers en cèl·lula β s'observa clarament reduït quan ho estudiem de manera específica en les cèl·lules β recombinades (Fig. 38B). Confirmant els resultats obtinguts amb illots sencers, els nivells d'expressió de *Igf1r* (específic de cel·lula β) i *Ccna2* són significativament menors en comparació amb el control. Aquestes dades suggereixen que la resta de cèl·lules de l'illot pancreàtic que no són β o bé que no han recombinat estan contribuint d'alguna manera en l'augment dels nivells d'expressió de *Irs2*.

Implicació de la senyalització dependent de Gsα en l'establiment de la massa cel·lular β

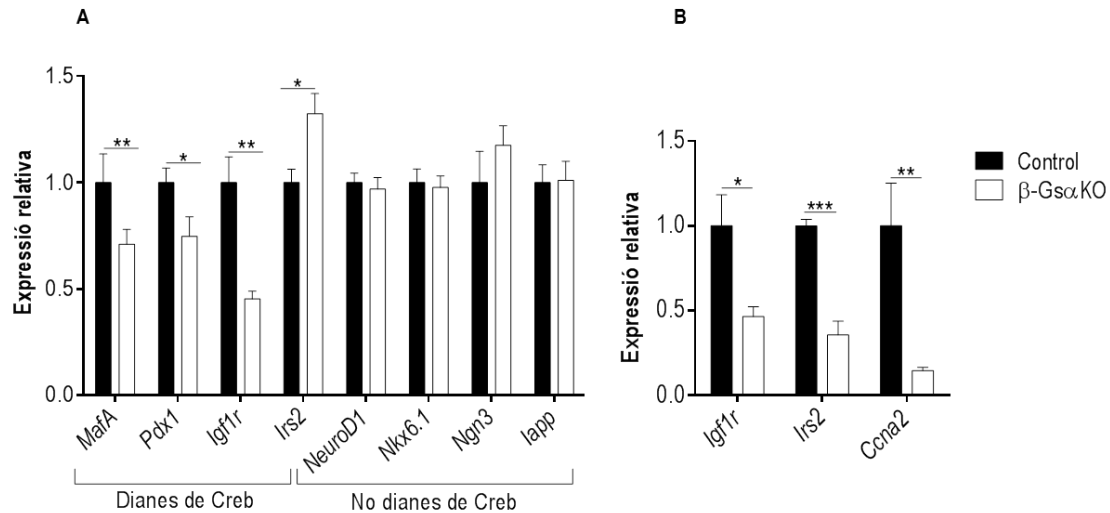


Figura 38. **A** Nivells d'expressió gènica basals de dianes conegudes de Creb i marcadors d'identitat de cèl·lula β (no dianes de Creb) en illots isolats d'animals control i β-Gsα KO a p28. **B** Nivells d'expressió gènica basals de les tres dianes principals de Creb no específiques de cèl·lula β en cèl·lules dissociades d'illots d'animals control i β-Gsα KO purificades mitjançant FACS d'illots que expressen YFP en cèl·lula β a p28. Els valors del grup control s'ha normalitzat a 1. Expressió normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. Els valors representen mitjana±SEM de n=7-12 animals de cada genotip * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

A continuació, hem corroborat la disminució del factor de transcripció Mafa a nivell proteic, mitjançant WB utilitzant extractes totals d'illots frescos isolats de ratolins β-Gsα KO i controls a p28 (Fig. 39).

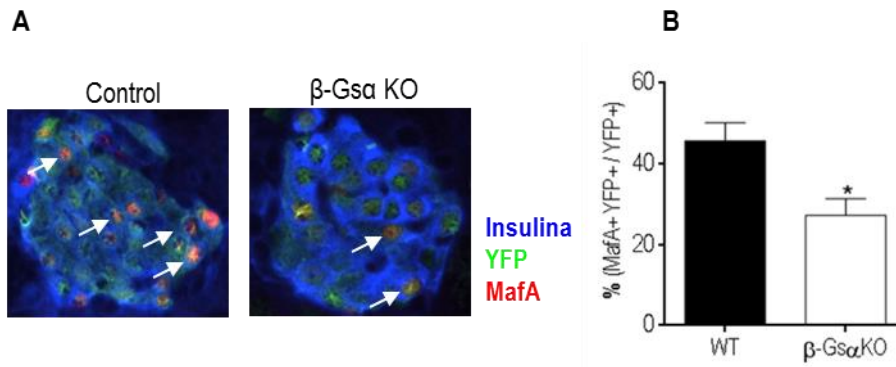


Figura 39. **A** Immunofluorescència de pàncrees fixats d'animals control i *Ins1^{Cre/+} ; Gnas^{fl/fl} ; Rosa26^{YFP/YFP}* p28 utilitzant anticossos contra insulina (blau), YFP (verd) i Mafa (vermell). **B** Quantificació del nombre de cèl·lules Mafa+ YFP+ respecte el total de cèl·lules YFP+ (%). Els valors representen mitjana±SEM de n=2-4 animals de cada genotip * $p < 0.05$

Aquests resultats venen acompanyats d'una disminució estadísticament significativa en els nivells totals de proteïna de Mafa en illots frescos isolats de ratolins β-Gsα KO p28, en comparació amb grup control (Fig. 40).

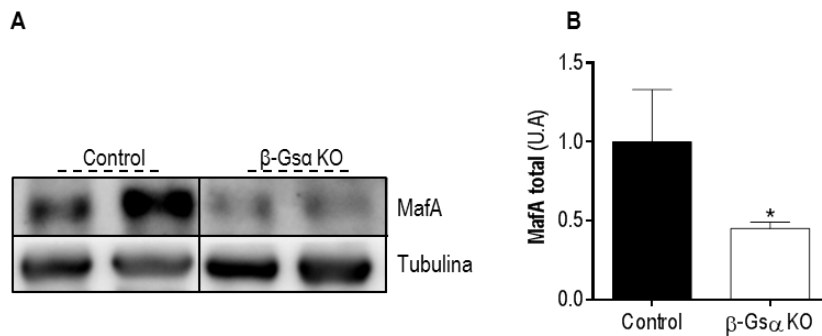


Figura 40. **A** WB dels nivells totals de proteïna MafA d'illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a p28. **B** Quantificació per densitometria del panell (a) (MafA/Tubulina). La tubulina s'ha utilitzat per tal de normalitzar els nivells de proteïna. El grup control s'ha normalitzat a 1. Els valors representen mitjana \pm SEM de 4 animals de cada genotip ** p <0.01

En conjunt, els resultats obtinguts fins el moment demostren que la deficiència de la subunitat Gs α en la cèl·lula β compromet de manera clara el funcionament i senyalització intracel·lular de la via dependent de PKA/Creb.

Expressió gènica de components de vies de senyalització implicades en proliferació de la cèl·lula β

Publicacions prèvies han demostrat l'efecte de diverses vies de senyalització sobre la proliferació en la cèl·lula β . Hem estudiat algunes d'aquestes vies en illots isolats d'animals control i β -Gsa KO amb l'objectiu d'establir la seva possible contribució en el fenotip d'aquest model transgènic.

Aleshores, hem analitzat les vies estimulades pels factors PDGF (factor de creixement derivat de plaquetes)²¹⁰ i la via EGFR-BTC (receptor del factor de creixement epidèrmic i betacel·lulina) que també intervé en la regulació de la proliferació, regeneració i expansió de la massa cel·lular β ^{211,212}.

Els resultats no mostren alteracions en els receptors *Pdgfra* i *Pdgfrb* com tampoc en els seus lligands, suggerint que aquesta via no es troba afectada per la deleció de Gs, almenys a nivell gènic (Fig. 41A). Pel que fa als nivells d'expressió de la via EGFR-BTC observem un increment general moderat dels gens *ErbB2*, *ErbB3* i *Btc* suggerint que aquesta via de senyalització no està contribuint en el defecte en l'expansió de la massa cel·lular β fent-lo menys evident que si es trobés alterada en els illots β -Gsa KO (Fig. 41B).

Implicació de la senyalització dependent de Gsα en l'establiment de la massa cel·lular β

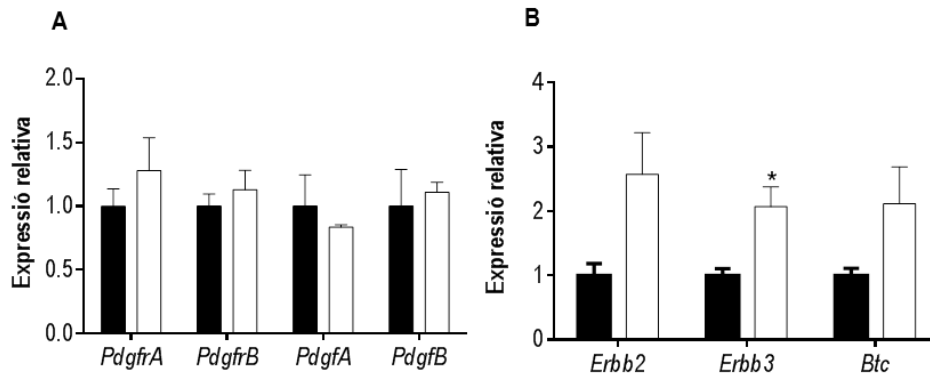


Figura 41. A Nivells d'expressió gènica d'illots isolats d'animals control i β-Gsα KO a p28 de la via de senyalització PDGF (n=7-10) i B la via de senyalització EGFR-BTC (n=7-10). Expressió normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. Els valors representen mitjana±SEM de n=7-12 animals de cada genotip * $p < 0.05$.

Alteracions moleculars en edats anteriors a p28

Per tal de determinar si les principals alteracions en la via Gs-AMPC observades a p28 apareixen en edats més joves, hem analitzat per RT-PCR els nivells d'expressió dels principals gens clau en illots isolats control i β-Gsα a p14 i p7.

A p14 els illots β-Gsα KO ja manifesten una reducció significativa en l'expressió dels receptors *Glp1r* i *Gipr* juntament amb un augment significatiu en els nivells de *Gcgr* (Fig. 42A). Pel que fa als components de la senyalització de la via Gs-AMPC/PKA, mostren una reducció en *Prkarb1* i *FoxO1* així com un augment lleuger en els nivells de *Creb1* i *Creb3*, segurament degut a un mecanisme de compensació. La disminució en els nivells del receptor d'incertina *Glp1r* ja és evident des de la primera setmana de vida, juntament amb una reducció en l'expressió de *Igf1r* i els marcadors d'identitat de cèl·lula β *MafA* i *Pdx1* els quals es troben disminuïts més del 50% en comparació amb els illots control (Fig. 42B).

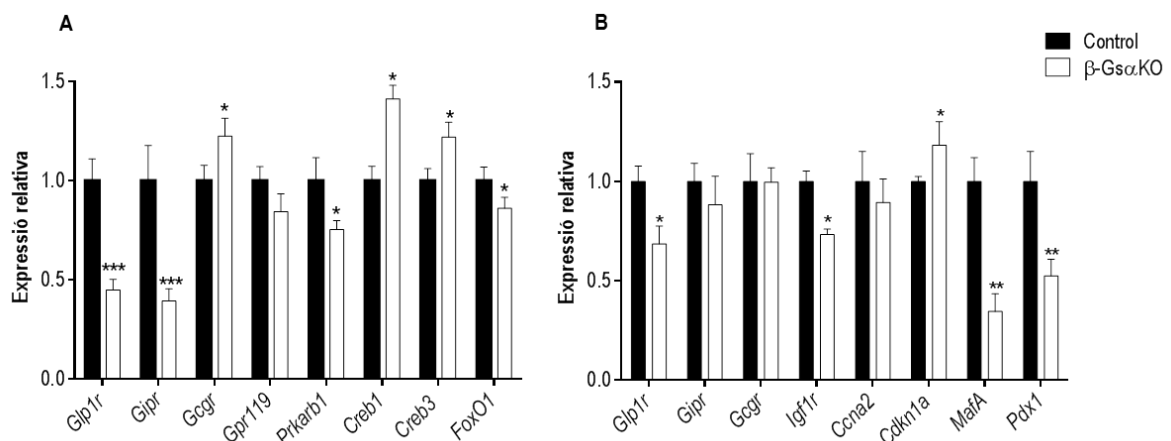


Figura 42. A Nivells d'expressió dels principals gens alterats a p28 de la via Gs-AMPC/PKA en illots isolats d'animals control i β-Gsα KO a A p14 i B p7. Expressió normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. Els valors representen mitjana±SEM de n=7-12 animals de cada genotip * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Aquests resultats indiquen que la via de senyalització Gs-AMPC/PKA es troba alterada des d'una etapa postnatal molt temprana portant a conseqüències en edats més avançades.

ESTUDI DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE IGF1/INSULINA EN LA CÈL·LULA β

S'ha demostrat que la deleció genètica de *Glp1r* o bé en combinació amb *Gipr* a la cèl·lula β no té un impacte en la massa cel·lular β en condicions fisiològiques en ratolins adults^{141,143,144,198}. Aquesta observació genera dubtes sobre el paper real de la senyalització guiada per incretines en l'expansió postnatal i en l'establiment de la massa massa cel·lular β . Contràriament, la deleció genètica combinada d'*Insr* i *Igf1r* produeix una reducció clara en l'establiment postnatal de la massa cel·lular β que es fa evident a les dos setmanes de vida^{142,173,178,213}. Tenint en compte que l'expressió gènica d'*Igf1r* i *Irs2* és regulada per AMPc^{110,115} i que ambdós gens es troben disminuïts en els illots d'animals β -GsaKO des d'una etapa postnatal temprana, hem volgut estudiar amb més detall el paper potencial de la via d'Igf1/Insulina en el defecte en l'expansió de la massa cel·lular β observat en els animals deficientes per Gsa en la cèl·lula β .

Regulació de la proliferació en resposta a insulina

En primer lloc per tal d'estudiar la resposta proliferativa en resposta a lligands de la via Gs-AMPC (exendina-4) i la via de l'Igf1/Insulina (insulina i Igf1), hem dissociat illots de ratolins β -Gsa KO i controls de 4-6 setmanes d'edat mitjançant una digestió amb tripsina per tal d'obtenir les DICS (Fig. 43). Hem incubat les cèl·lules durant 24 hores amb les molècules indicades i seguidament hem analitzat els nivells de proliferació realitzant l'assaig d'incorporació de BrdU.

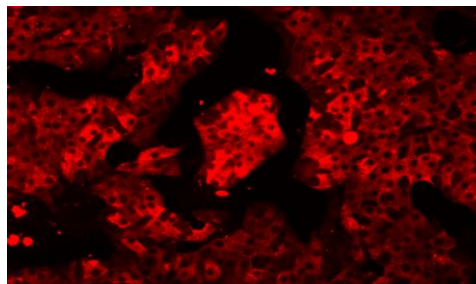


Figura 43. Imatge representativa d'una immunofluorescència amb insulina (vermell) d'un cultiu de 3 dies de DICS d'animals control C57BL/6J de 6 setmanes d'edat.

Tal i com es pot observar a la Figura 44A, sorprenentment malgrat la reducció en l'expressió del *Igf1r* l'estimulació amb *Igf1* exhibeix una resposta proliferativa molt semblant entre les cèl·lules KO i les control. Pel que fa a l'estimulació amb insulina, les DICS no presenten una resposta mitogènica a l'hormona a diferència del grup control que respon correctament augmentant la taxa de proliferació de manera significativa. Per altra banda, tal i com era d'esperar el grup β -Gsa KO no respon a exendina-4 a diferència del grup control que augmenta els nivells de proliferació en comparació amb la seva condició basal.

Seguidament hem volgut conèixer i establir el paper de la senyalització de la insulina en la resposta proliferativa a *Glp1*. Hem estimulat DICS d'animals C57B6 adults amb exendina-4, forskolina i insulina en presència o absència de l'antagonista competitiu específic del receptor de insulina anomenat S961. L'ús d'aquest antagonista ens permet estudiar si la inducció de la proliferació de la cèl·lula β induïda per la senyalització Gs-AMPC a través de forskolina i exendina-4 és dependent de l'activació de la via de la insulina.

Després d'un blanquejament de les cèl·lules a 5 mM de glucosa i 0.1% FBS, les hem incubat amb les diferents condicions mencionades anteriorment en presència o absència de S961 durant 24 hores. Els resultats mostren que l'antagonista del receptor d'insulina S961 bloqueja la inducció de la proliferació en resposta a l'activació de la via Gs-AMPC i la via de la insulina (control positiu) (Fig. 44B).

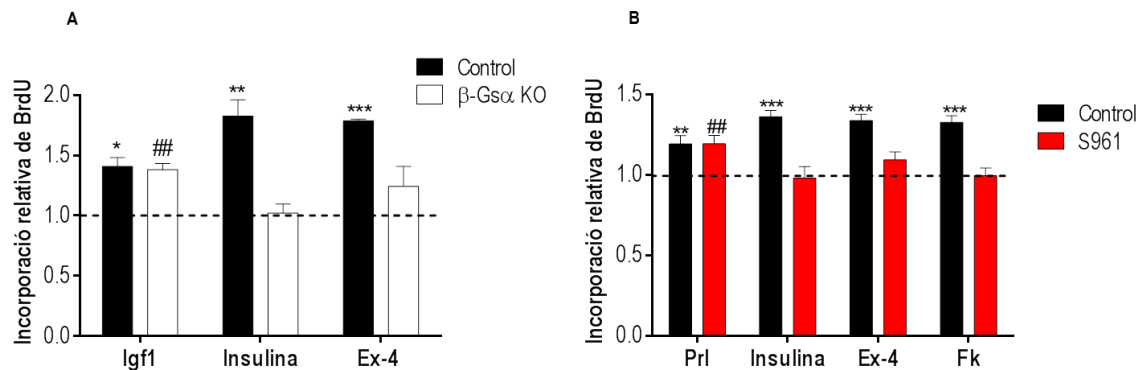


Figura 44. **A** Estudi de la taxa de proliferació a través de l'incorporació relativa de BrdU en DICS obtingudes d'illots d'animals C57BL/6J adults. Les DICS s'han estimulat amb exendina-4 (200 nM), forskolina (10 μM) o insulina humana recombinant (10 nM) amb 0.1% FBS i 8 mM de glucosa durant 24 hores. **B** Estudi de la taxa de proliferació a través de l'incorporació relativa de BrdU en DICS obtingudes d'illots d'animals C57BL/6J adults. Les DICS s'han estimulat amb exendina-4 (200 nM), forskolina (10 μM) o insulina humana recombinant (10 nM) durant 24 hores en presència o absència de l'antagonista del receptor de insulina, S961 amb 0.1% FBS i 8 mM de glucosa. Les comparacions s'han realitzat en les diferents condicions d'incubació entre presència i absència de S961. Els valors representen mitjana±SEM de 2 experiments independents n=9-11. *p<0.05 ***p<0.001

Aquests resultats demostren que la insulina no té capacitat mitogènica sobre les cèl·lules d'illots β-GsαKO. D'altra banda, en cèl·lules d'illots control l'activació de la proliferació en resposta a Exendina-4 i Forskolina requereix que la via de senyalització de l'insulina sigui operativa.

Caracterització de la via Igf1/Insulina en illots β-Gsα KO

Les dades obtingudes sobre la pèrdua de la capacitat mitogènica a insulina de les cèl·lules β-Gsα KO, així com la disminució significativa en l'expressió de *Igf1r* i *Irs2* mostrat anteriorment en la Figura 38, ens ha portat a aprofundir sobre l'impacte de la delecció de Gsα en la senyalització de la via de la insulina en la cèl·lula β.

Lligands de la via

En primer lloc hem estudiat l'expressió gènica dels lligands *Igf1*, *Igf2* i la *insulina* en illots de p28. En ratolins, hi ha dos gens que codifiquen per la insulina: *Ins1* i *Ins2*. S'observa una disminució significativa en l'expressió gènica de *Ins1* (60% vs. Ct) el qual és específic de cèl·lula β (Fig. 45A), mentre que *Ins2* no es troba afectat. L'expressió d'*Igf1* i *Igf2* tampoc és diferent entre KO i controls. Amb aquests resultats hem volgut estudiar si aquests defectes gènics es tradueixen en una alteració en el contingut d'insulina. Tal i com es pot observar a la Figura 45B, el contingut d'insulina a p28 és molt baix en comparació amb els illots control.

La insulina es sintetitza com a prohormona que madura cap a insulina en el grànul de secreció gràcies a l'acció de les peptidases *Pcsk1/3*, *Pcsk2* i *Cpe*. Hem observat que l'expressió d'aquestes està alterada en illots KO destacant la reducció dels nivells de mRNA de *Pcsk1/3* i *Pcsk2* (Fig. 45C). Aquesta observació ens ha portat a analitzar el contingut de proinsulina de l'illot el qual trobem incrementat de manera significativa (Fig. 45D). També els nivells plasmàtics de proinsulina en els animals β-Gsα KO

estan augmentats (Fig. 45E) i això va acompanyat d'una disminució del peptid C circulant (Fig. 45F) en comparació amb el grup control.

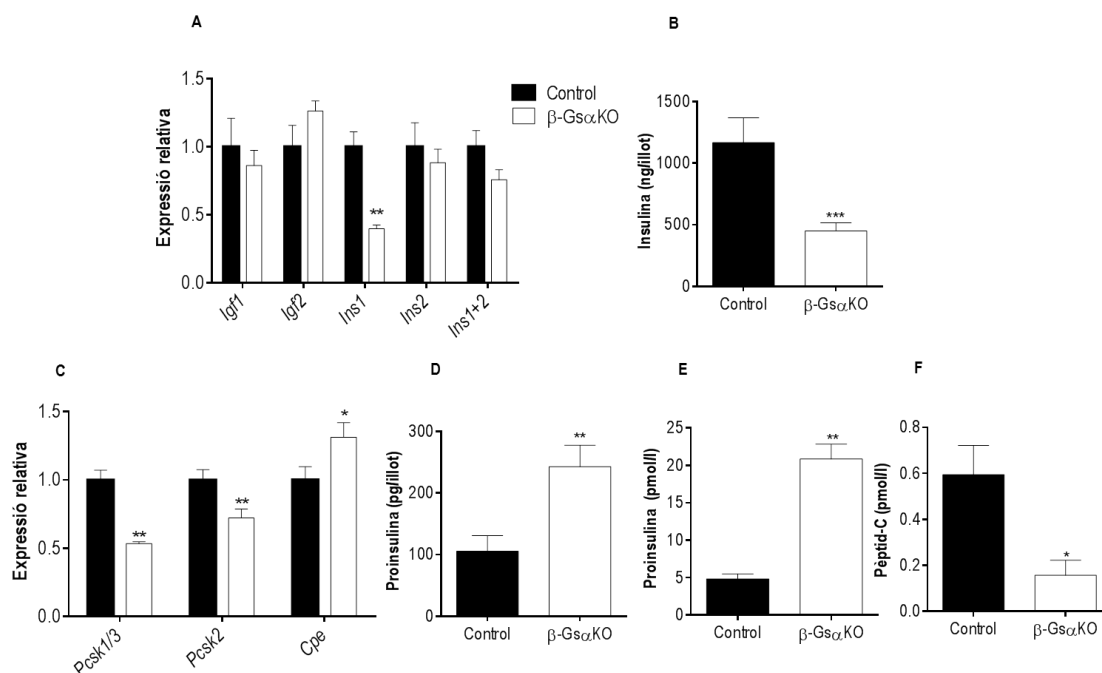


Figura 45. **A** Expressió gènica dels lligands de la via d'Igf1/Insulina en il·lots isolats d'animals control i β -G α KO p28. **B** Expressió gènica dels principals enzims responsables de la maduració de la insulina en il·lots isolats d'animals control i β -G α KO p28. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Expressió normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. **C-D** Contingut d'insulina (ng/illot) i proinsulina (pg/illot), respectivament en il·lots isolats d'animals control i β -G α KO p28. **E-F** Nivells plasmàtics de proinsulina (pmol/l) i Peptid-C (pmol/l) d'animals control i β -G α KO p28, respectivament. n=4-12 animals de cada genotip. Els valors representen mitjana \pm SEM de 2 experiments independents * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001

Aquests resultats demostren que els animals β -G α KO presenten uns nivells molt baixos d'insulina tan a nivell gènec com a nivell de contingut proteic. Això, ve acompanyat d'un defecte en el processament de la insulina que es tradueix a un increment en els nivells tan de contingut com plasmàtics de la prohormona.

Receptors de la via

Els resultats obtinguts en els assajos de proliferació on es mostra que els il·lots β -G α KO no responen a insulina exògena ens ha portat a pensar que també podia haver-hi defectes a nivell del seu receptor. Per tal de comprovar-ho, inicialment hem estudiat els nivells d'expressió gènica del receptor de la insulina en cèl·lules β purificades d'il·lots isolats *Ins1^{Cre/+} ; Gnas^{fl/fl} ; Rosa26^{YFP/YFP}* a p28. S'observa una disminució significativa en els nivells d'expressió d'*Insr* en comparació amb el grup d'il·lots control (Fig. 46A). Aquest resultat es troba en línia amb una disminució significativa en els nivells totals de proteïna tan de *Insr* (Fig. 46B-C), com d'Igf1r (Fig. 46D-E) que està d'acord amb la disminució en la seva expressió gènica observada en resultats mostrats anteriorment.

Implicació de la senyalització dependent de Gsa en l'establiment de la massa cel·lular β

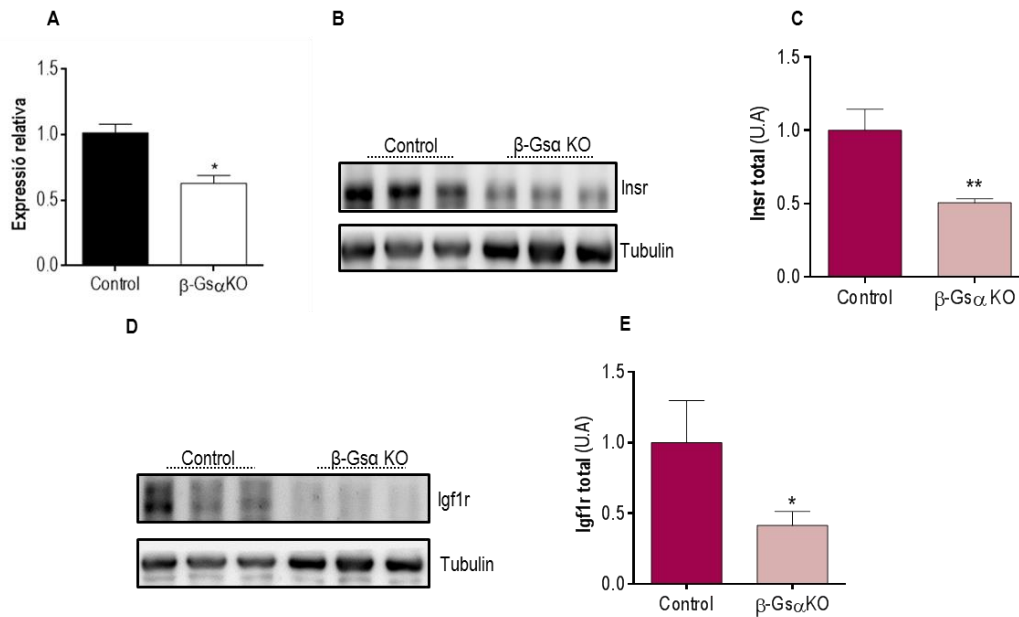


Figura 46. **A** Nivells d'expressió gènica de *Insr* en il·lots isolats d'animals control i *Ins1^{Cre/+}; Gnas^{fl/fl}; Rosa26^{YFP/YFP}* a p28. **B** WB de *Insr* d'extractes proteics d'il·lots isolats d'animals control i β -Gsa KO a p28. **C** Quantificació densiomètrica dels nivells de totals de proteïna (*Insr*/Tubulina) del panell (b). **D** WB d'Igf1r d'extractes proteics d'il·lots isolats d'animals control i β -Gsa KO a p28. **E** Quantificació densiomètrica dels nivells de totals de proteïna (Igf1r/Tubulina) del panell (d). En tots els experiments els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana \pm SEM de 3 experiments independents amb n=4-7 animals de cada genotip * p <0.05 ** p <0.01.

El receptor d'insulina presenta dues isoformes provinents d'un mecanisme d'splicing o processament alternatiu del seu pre-mRNA. Per una banda es genera *Insr-A* el qual conté l'exó 11, mentre que la isoforma *Insr-B* l'exclou. Per tal d'estudiar les dues isoformes del receptor hem utilitzat encebadors que amplifiquen ambdues variants i per altra banda encebadors específics per *Insr-B*. Hem quantificat per RT-PCR els nivells del transcrit *Insr-B* el qual es mostra reduït en comparació amb el grup control (60% vs Ct) en il·lots isolats p28 (Fig. 47A). A continuació, per tal d'estudiar de manera més específica el percentatge de disminució d'aquest receptor en la cèl·lula β , hem generat DICS d'animals control i *Ins1^{Cre/+}; Gnas^{fl/fl}; Rosa26^{YFP/+}*. Els resultats exhibeixen una reducció encara més evident dels nivells d'*Insr-B* en comparació amb les cèl·lules control demostrant que l'afectació d'aquest receptor és específic de cèl·lula β (Fig. 47B).

Per tal d'estudiar el balanç entre *Insr-A*/*Insr-B* hem realitzat una PCR convencional i hem analitzat les dues bandes corresponents a cada isoforma gràcies a la diferència en mida que presenten a l'incloure o excloure l'exó 11 (Fig. 47C-D). Utilitzant encebadors específics pels exons 10 i 12 es pot observar com els il·lots isolats d'animals β -Gsa KO a p28 mostren un major quocient *Insr-A*/*Insr-B* en comparació amb el grup control, reforçant el resultat que els animals presenten una disminució en els nivells de *Insr-B*, tot i així amb aquestes dades no podem afirmar que també presentin una disminució en els nivells de *Insr-A*.

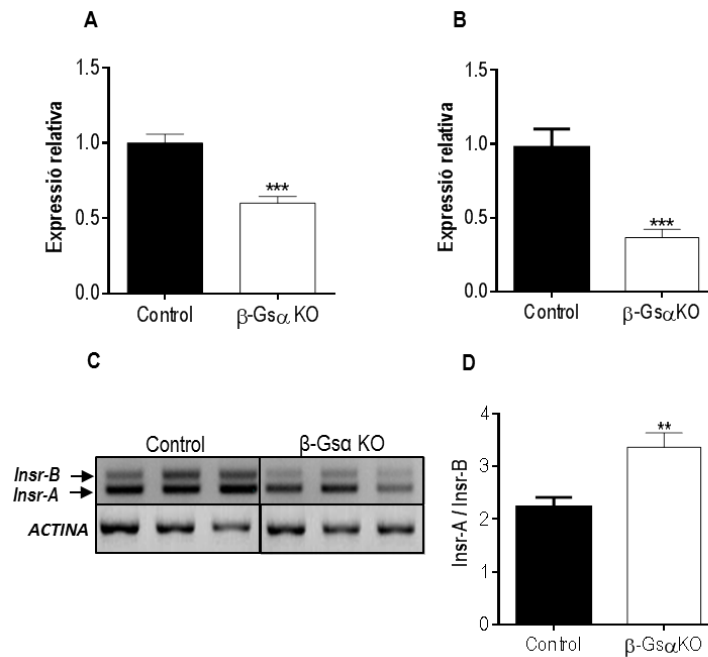


Figura 47. **A** Nivells d'expressió gènica d'*Insr-B* en illots isolats d'animals control i β -Gsa KO p28. **B** Nivells d'expressió gènica d'*Insr-B* en cèl·lules β purificades d'illots control i *Ins1^{Cre/+}; Gnas^{fl/fl}; Rosa26^{YFP/+}* a p28 n=4-6 Expressió normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. **C** Imatges representatives d'una PCR convencional utilitzant encebadors que amplifiquen les dues isoformes de l'*Insr* expressades en illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a p28 n=7-10. **D** Quantificació desnomètrica del panell (c) (*Insr-A/Insr-B*). L'actina s'ha utilitzat com a control intern. Els valors representen mitjana \pm SEM de 3 experiments independents amb 7-10 animals de cada genotip ** p <0.01 *** p <0.001.

S'han descrit diversos factors d'splicing que regulen la distribució relativa de *Insr-A* i *Insr-B* que varien en funció del teixit, l'edat, l'estat de salut i del desenvolupament¹⁵⁹. *Srsf3*, *Srsf1* (anteriorment coneguts com SRp20 i SF2/ASF, respectivament) i *Mbnl1* s'uneixen als potenciadors de splicing exònics de l'exó 11, augmentant la seva inclusió, mentre que *Celf1* (*Cugbp1/Elavl1*) promou l'exclusió per unió al silenciador exònic. D'aquesta manera, els *ratios* relatius de *Srsf3* i *Srsf1* respecte *Celf1* en els diferents tipus cel·lulars determina el grau d'inclusió de l'exó¹⁵⁶. L'estudi d'expressió gènica en illots isolats d'animals controls i β -Gsa KO a p28 mostren una disminució en l'expressió de *Srsf1*, juntament amb un augment de *Celf1* (Fig. 48), dades que correlacionen amb la reducció en els nivells de la isoforma B que hem observat anteriorment.

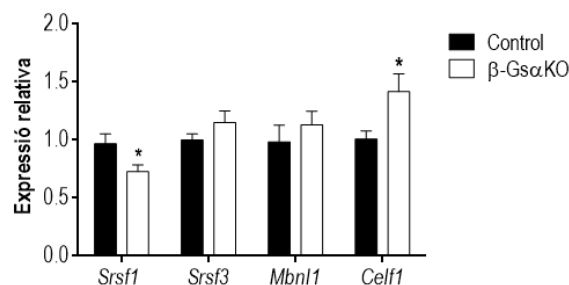


Figura 48. Expressió gènica basal de factors d'splicing que regulen la distribució del receptor de insulina en illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a p28 n=7-10. L'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana \pm SEM de 2 experiments independents * p <0.05

Aquests resultats indiquen que la deficiència en la subunitat Gs α en cèl·lula β produeix una disminució en els nivells de receptor d'insulina tan a nivell gènic com a nivell proteic juntament amb una alteració en la distribució de les seves isoformes donant lloc a una reducció en *Insr-B* i un augment en la proporció *Insr-A/Insr-B*.

Mediadors intracel·lulars de la via Igf1/Insulina en illots β -Gs α KO

Els resultats anteriors són compatibles amb la hipòtesi que alteracions autocrines en la senyalització de la via d'Igf1/Insulina podrien ser responsables del defecte en l'expansió de la massa cel·lular β en els animals deficients per Gs α en l'etapa postnatal temprana. Per tal d'estudiar l'estat d'activació de la via, hem analitzat els nivells de fosforilació del principal mediador, la quinasa Akt, en extractes proteics d'illots isolats d'animals control i β -Gs α KO a p28. Els resultats mostren una reducció de més del 50% en l'activació de la proteïna en comparació amb el grup control (Fig. 49A-C). Així mateix, la fosforilació de la proteïna ribosomal S6, efectora de la senyalització per mTORC1 i que s'ha relacionat amb la proliferació de la cèl·lula β induïda per Akt²¹⁴, també presenta una disminució en la seva activació en els illots β -Gs α KO a p28 en comparació amb el grup control acompanyat d'un augment modest en els nivells de proteïna total (Fig. 49D-F).

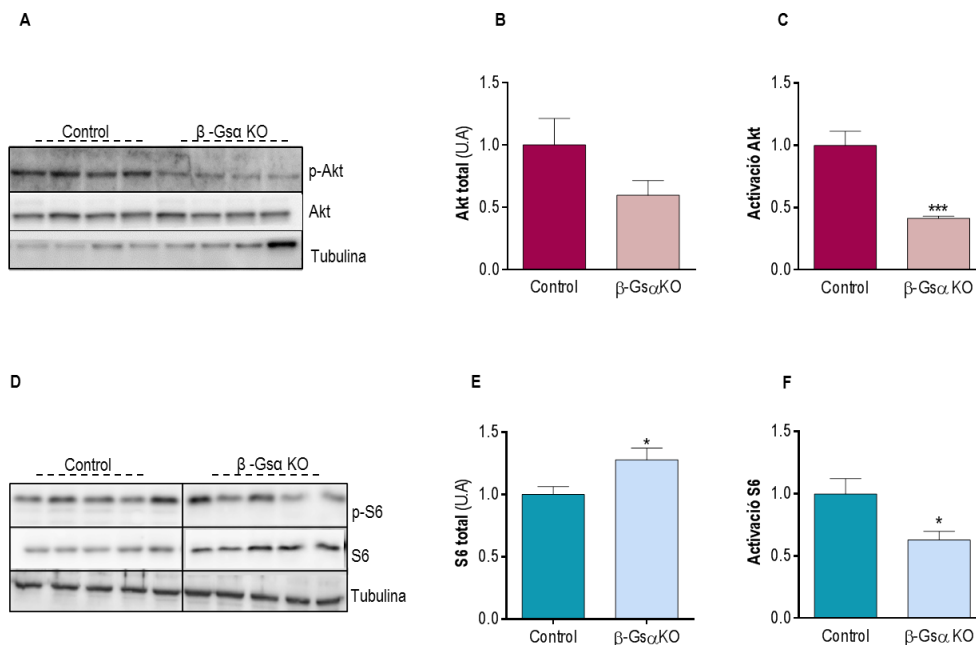


Figura 49. A WB d'Akt d'extractes proteics d'illots isolats d'animals control i β -Gs α KO a p28. B-C Quantificació densitomètrica del panell (a) dels nivells totals (Akt/Tubulina) de proteïna i nivells de fosforilació o d'activació (p-Akt/Akt), respectivament. D WB de la proteïna ribosomal S6 en extractes proteics d'illots isolats d'animals control i β -Gs α KO a p28. E Quantificació densitomètrica del panell (d) dels nivells d'activació del mediador (p-S6/S6). La tubulina s'ha utilitzat com a control de càrrega. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana \pm SEM de 3 experiments independents amb n=3-5 animals de cada genotip * p <0.05 *** p <0.001

La disminució en l'activació d'Akt es relaciona amb un augment estadísticament significatiu dels nivells basals d'expressió de *Ptp1n* a p28 (Fig. 50), una fosfatasa que actua com a mediador negatiu en la via de la insulina¹⁷². Aquest augment pot contribuir accentuant el defecte observat en la via de senyalització de la insulina/igf1 en els ratolins β -Gs α KO ja que disminueix els nivells d'activació del mediador Akt.

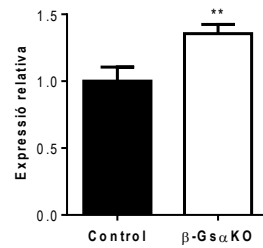


Figura 50. Nivells d'expressió gènica basal de *Ptp1n* en illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a p28. L'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. Els valors representen mitjana \pm SEM de n=4-6 animals de cada genotip. ***p<0.001

Hem volgut comprovar si la reducció en els nivells d'activació d'Akt estar relacionada directament amb la via de les incretines. Veiem que l'estimulació aguda amb exendina-4 no indueix canvis en els nivells de fosforilació d'Akt ni en illots isolats β -Gsa KO ni en el grup control (Fig. 51A-C), com tampoc en l'experiment d'estimulació a més llarg termini durant 24 hores (Fig. 51C-D). Aquests resultats indiquen l'absència d'un efecte directe de la senyalització Glp1 sobre la quinasa Akt, almenys en aquest context experimental.

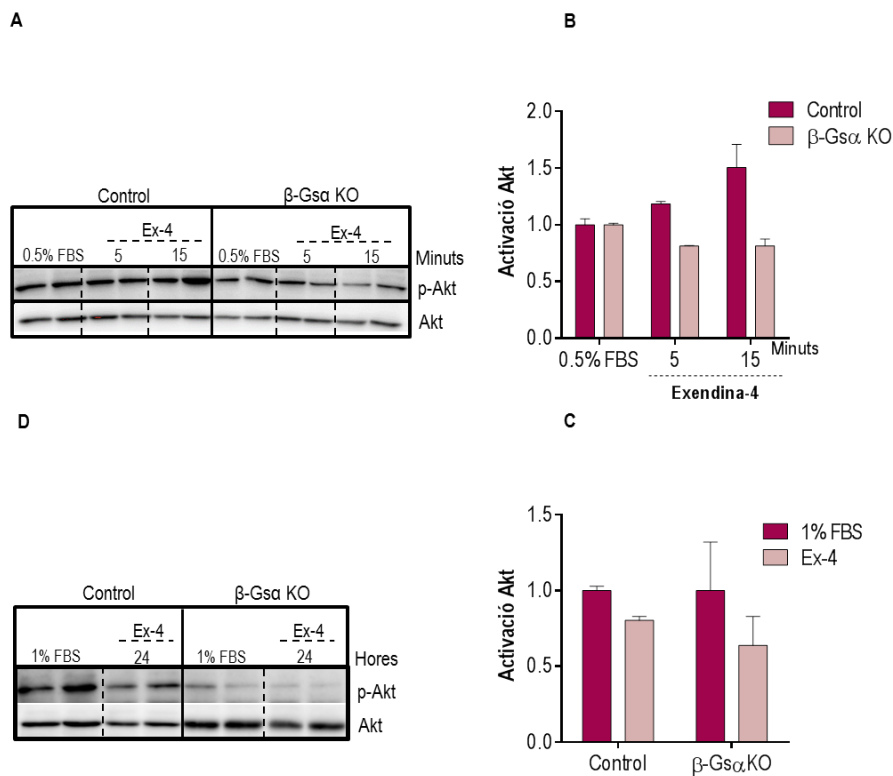


Figura 51. **A** WB d'Akt d'extractes proteics d'illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a p28 després d'una estimulació aguda (5 i 15 min) amb exendina-4 (200 nM) amb 0.5% FBS i 8 mM de glucosa. **B** Quantificació densiomètrica del panell (a) dels nivells d'activació d'Akt (p-Akt/Akt). **C** WB d'Akt d'extractes proteics d'illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a p28 després d'una estimulació durant 24 h amb exendina-4 (200nM) amb 1% FBS i 8 mM de glucosa. **D**. Quantificació densiomètrica del panell (c) dels nivells de fosforilació d'Akt (p-Akt/Akt). Prèviament a realització dels experiments, després de l'isolament els illots es recuperen una nit en medi complet (10% FBS i 11mM de glucosa) i seguidament es realitza un blanquejament amb 0.5% FBS i 8 mM de glucosa durant 5-6 h o una nit per tal de procedir a l'experiment d'estimulació. Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana \pm SEM de 2 experiments independents d'un grup de 5-7 animals de cada genotip.

Activació aguda de la via de l'insulina

L'estimulació aguda durant 5 minuts amb insulina recombinant humana en illots isolats β -G α KO no indueix un augment dels nivells de fosforilació del Insr com tampoc d'Akt a diferència del que s'observa en el grup control (Fig. 52A-D). Per altra banda, l'activació de la quinasa Erk1/2 sembla no estar involucrada a curt termini en la regulació per insulina ja que no observem canvis en la seva activació en cap dels grups experimentals (Fig. 52E-F).

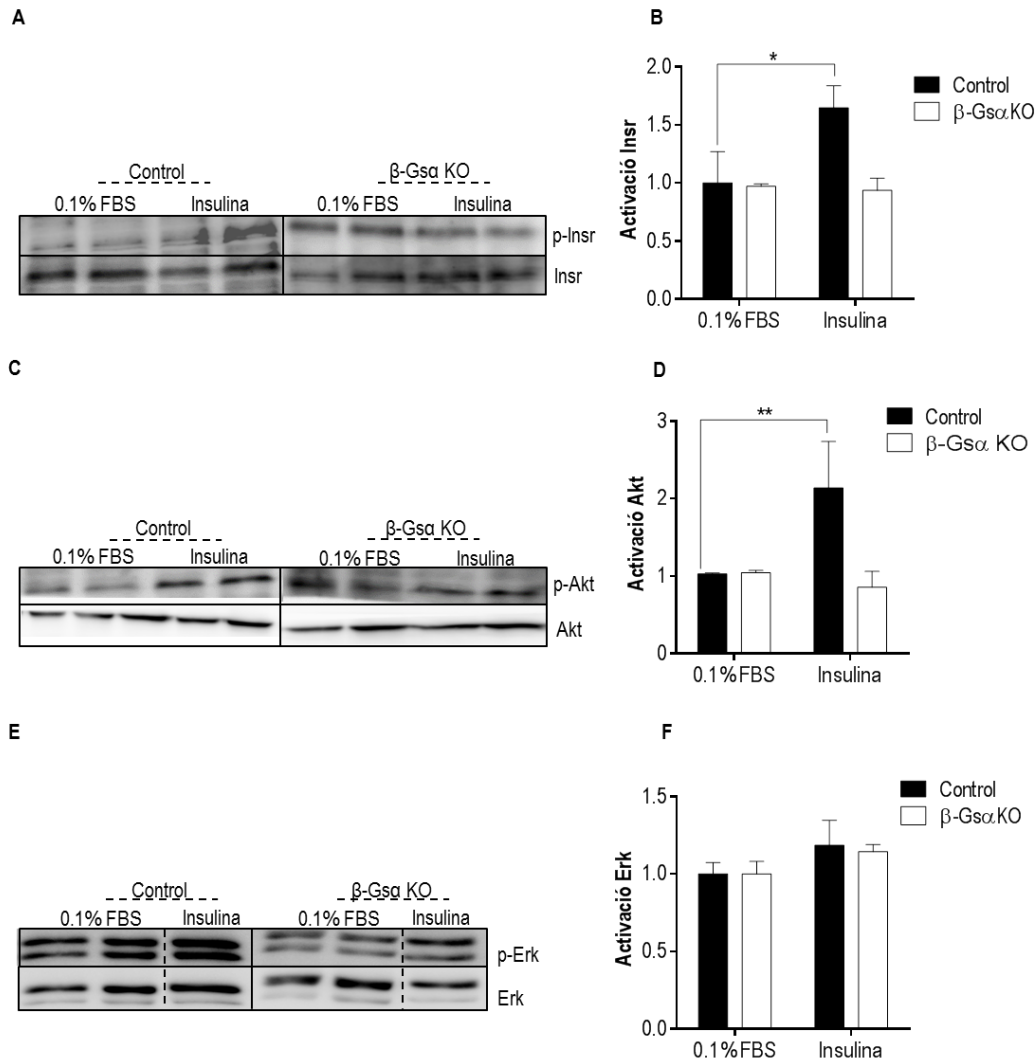


Figura 52. **A** WB representatiu dels nivells de fosforilació d'Insr, d'illots isolats d'animals control i β -G α KO p28 en resposta a l'estimulació amb Insulina humana recombinant (10 nM) durant 5 min amb 0.1% FBS i 5 mM de glucosa. **B** Quantificació per densitometria del panell (a). **C** WB representatiu dels nivells de fosforilació d'Akt d'extractes proteics d'illots isolats d'animals p28 control i β -G α KO, estimulats durant 5 min amb insulina humana recombinant (10 nM) amb 0.1% FBS i 5 mM de glucosa. **D** Quantificació per densitometria del panell (c). **E** WB representatiu dels nivells de fosforilació d'Erk1/2 en resposta aguda (5 i 15 min) amb insulina humana recombinant (10 nM) en illots controls i gen anul·lats p28. **F** Quantificació per densitometria del panell (a). Els valors representen mitjana \pm SEM de 2 experiments independents. Prèviament a realització dels experiments, després de l'isolament els illots es recuperen una nit en medi complet (10% FBS i 11mM de glucosa) i seguidament es realitza un blanquejament amb 0.1% FBS i 5 mM de glucosa durant una nit per tal de procedir a l'experiment d'estimulació. En tots els experiments els valors del grup control s'han normalitzat a 1. Els valors representen mitjana \pm SEM de 3 experiments independents d'un grup de 10-12 animals de cada genotip. * p <0.05 ** p <0.01.

Alteracions moleculars en edats anteriors a p28

Per tal de determinar si les alteracions en la via de l'insulina són evidents en etapes anteriors a les quatre setmanes d'edat, hem isolat illots d'animals control i β -Gsa KO a p7 i p14.

A p7 els ratolins deficients per Gsa ja exhibeixen una reducció significativa en els nivells d'expressió gènica de *Ins1*, *Pcsk1/3*, així com en la isoforma B del receptor de l'insulina (Fig. 53A). En línia amb aquests resultats, els illots d'animals β -Gsa KO mostren un menor contingut d'insulina des de p7 que es manté a nivells molt baixos a p14 en comparació amb el grup control, acompanyat d'un augment en la proinsulina plasmàtica (Fig. 53B-C). Finalment, el defecte en l'activació basal del mediador Akt ja és evident des de p14 en els illots β -Gsa KO en comparació amb el grup control (Fig. 53E-D). Aquests resultats demostren que la delecció de la subunitat Gsa en la cèl·lula β del pàncrees té un impacte en una etapa molt temprana sobre la via de transducció de senyal de la insulina.

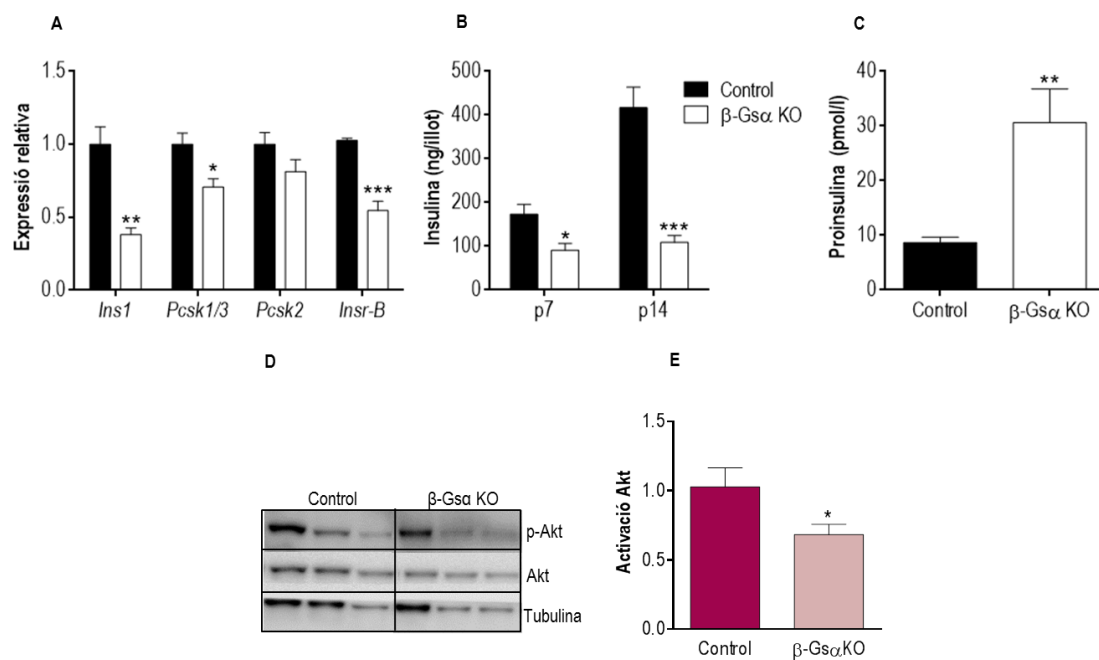


Figura 53. **A** Nivells d'expressió de gènica de *Ins1*, *Pcsk1/3*, *Pcsk2* i *Insr-B* en illots isolats de ratolins control i β -Gsa KO a p7. L'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. **B** Contingut d'insulina (ng insulina/illot) en illots d'animals control i β -Gsa KO a p7 i p14. **C** Nivells plasmàtics de proinsulina (pmol/l) d'animals control i β -Gsa KO a p14. **D** WB dels nivells de fosforilació d'Akt d'extractes proteics d'illots isolats d'animals control i β -Gsa KO a p14. **E** Quantificació per densitometria del panell (e) (p-Akt/Akt). Els valors del grup control s'han normalitzat a 1. n=7-10. Els valors representen mitjana \pm SEM de 2 experiments independents * p <0.05; ** p <0.01.

REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA D'ILLOTS EN RESPOSTA A INSULINA I AMPc

Finalment hem estudiat si l'expressió d'alguns dels gens que hem trobat alterats en els animals β-Gsα KO, és regulada de manera directa pels nivells d'AMPc o bé per insulina (Fig. 55). Per tal de portar-ho a terme hem incubat illots isolats d'animals C57B6J adults durant 48 hores en presència d'exendina-4, forskolina i insulina. Es coneix que la glucosa té la capacitat de regular l'expressió de diferents gens, i donada la connexió existent entre glucosa i insulina, hem realitzat l'experiment en dues concentracions diferents: a una concentració fisiològica (5 mM) i a una concentració estimuladora (8 mM)²¹⁵.

En primer lloc, podem observar com els dos gens de la insulina (*Ins1*, *Ins2*) presenten un patró d'expressió molt semblant en les diferents condicions esmentades. Ambdós gens venen regulats per glucosa augmentant de manera significativa la seva expressió a 8 mM, tal i com demostren estudis previs tot i que el mecanisme pel qual aquest gen es regula no està ben elucidat^{33,46,216}. *Ins1* i *Ins2* també augmenten els seus nivells gènics per un augment en AMPc induït per forskolina. A diferència de la incubació amb exendina-4, on els nivells del segon missatger AMPc no augmenten tan com quan s'estimula amb forskolina, que no s'observen diferències significatives. Pel que fa a les regulacions a 8 mM de glucosa, podem veure com aquestes regulacions es perden segurament degut a que l'estimulació de la transcripció del gen ja arriba al seu màxim llindar.

Per altra banda, la regulació del factor de transcripció *Mafa* i la proconvertasa *Pcsk1/3*, gens clau en la maduració de la cèl·lula β, també es troben augmentats a 8 mM de glucosa en comparació a la condició de glucosa no estimuladora. A més a més, a aquesta mateixa concentració, *Mafa* és regulat positivament per exendina-4, tal i com està descrit a la literatura per activació del factor de transcripció Creb¹¹⁶ i sorprenentment també per insulina, la regulació inversa al que demostren estudis previs on el factor de transcripció regula directament el promotor de la *insulina* augmentant els seus nivells d'expressió^{37,38}. A més, també es pot observar una regulació de l'expressió de *Pcsk1/3* per glucosa però no per AMPc ni per insulina.

Tal i com esperàvem, *Igf1r* no és regulat per glucosa però sí que augmenta els seus nivells d'expressió en les dues condicions de glucosa per forskolina i a 8 mM per exendina-4, dades que estan en línia amb el que està descrit a la literatura^{207,217}. Contràriament, a 5 mM de glucosa la insulina disminueix *Igf1r* suggerint un mecanisme de compensació d'un dels seus possibles receptors d'unió. L'expressió gènica de *InsrB* no apareix modificada per la pròpia glucosa però sí per insulina a 5 mM, resultat que coincideix amb el que Malakar et al. han descrit recentment¹⁵⁷. Aquesta regulació es perd quan augmenta la concentració de glucosa.

Curiosament, el factor de processament del receptor de la insulina que inclou l'exó 11 anomenat *Srsf1* apareix regulat de manera positiva en les dues concentracions de glucosa quan augmenten els nivells d'AMPc per forskolina, mentre que disminueix per exendina-4 a 5 mM de glucosa. Aquest resultat no coincideix amb les poques dades que estan descrites a la literatura sobre les isoformes del receptor on s'atribueix una regulació positiva directament per la insulina¹⁵⁷.

Finalment, el receptor d'increines *Glp1r* apareix regulat positivament per glucosa, observació que contrasta amb publicacions prèvies on es mostra que concentracions elevades de glucosa (16.7 – 25 mM) porten a una disminució en els seus nivells d'expressió²⁰⁹, així com per forskolina a la concentració no estimuladora de glucosa.

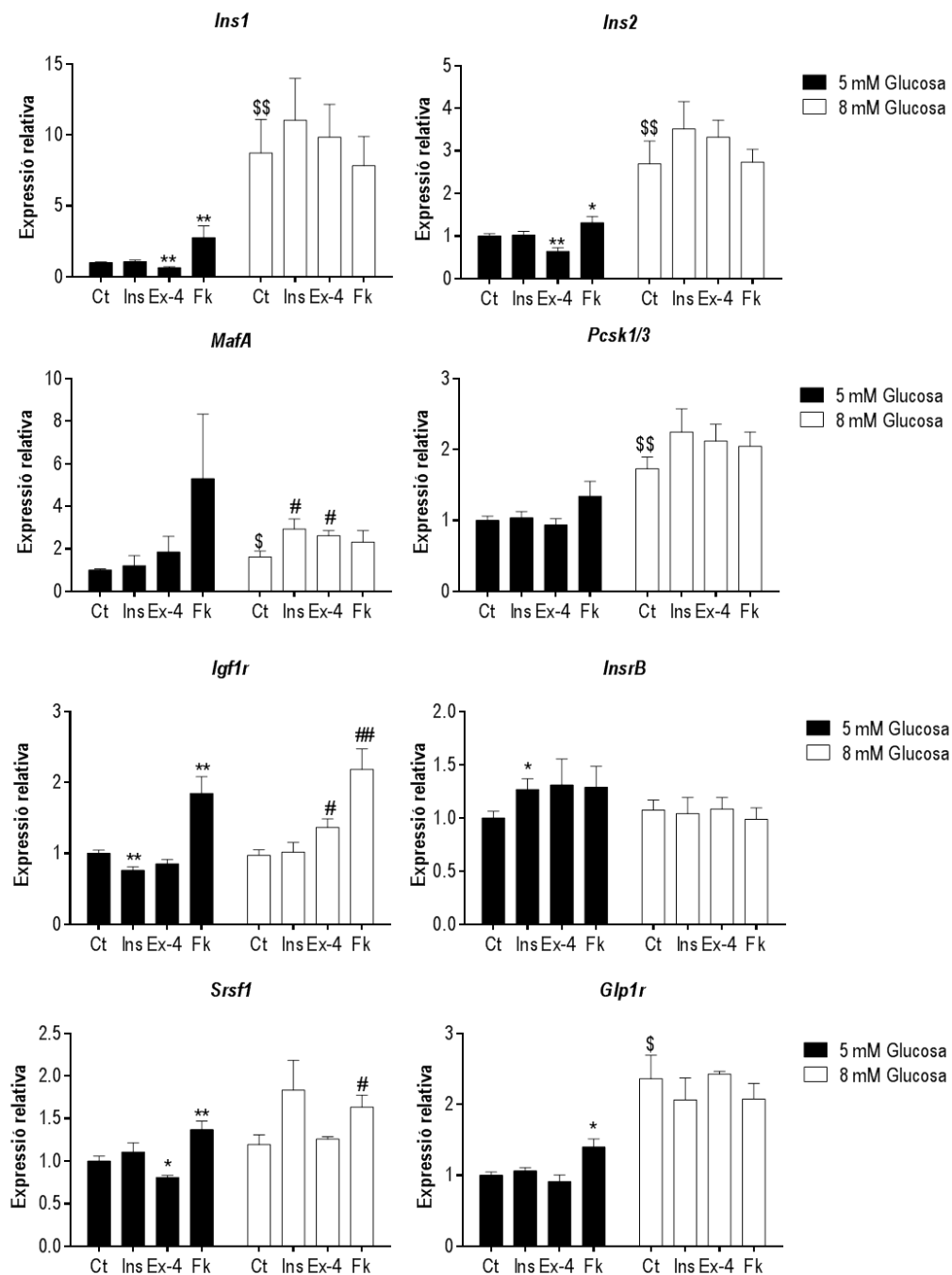


Figura 55. A Regulació dels nivells d'expressió dels principals gens alterats en els animals β -Gsq KO en resposta a AMPc i insulina en illots d'animals adults C57B6 estimulats durant 48 h amb insulina humana recombinant (10 nM), exendina-4 (200 nM) i forskolina (10 μ M) a 5 mM o 8 mM de glucosa amb 0.1% FBS. L'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. n=6-8. L'expressió està normalitzada en funció de l'expressió del gen de *Tbp*. Els valors representen mitjana \pm SEM de 3 experiments independents d'un grup de 12 animals. *#/\$ p<0.05; **##/\$\$ p<0.01; ***/###p<0.001 (* diferències entre condicions de 5 mM de glucosa / # diferències entre condicions de 8 mM de glucosa/ \$ diferències entre 5 mM i 8 mM de glucosa).

DISCUSSIÓ

La diabetis és una de les principals causes de mort en els països subdesenvolupats i les complicacions de salut que se'n deriven comporten enormes despeses econòmiques en l'àmbit de la sanitat. Tot i els avenços i les millores en el coneixement de la malaltia, els pacients afronten greus problemes de salut i complicacions associades. Una massa cel·lular β funcional insuficient és clau en el desenvolupament de la patologia. L'objectiu principal per la cura definitiva de la diabetis és la restitució d'aquesta massa β absent o insuficient per respondre a la demanda d'insulina i mantenir l'homeòstasi de la glucosa. Dins el camp de la medicina regenerativa s'han proposat diverses estratègies, que inclouen entre altres el reemplaçament de les cèl·lules β perdudes utilitzant cèl·lules diferenciades generades a partir de cèl·lules pluripotents *ex vivo*, la regeneració *in situ* a partir de progenitors pancreàtics o d'altres tipus cel·lulars i finalment la promoció de la proliferació d'aquelles cèl·lules β romanents. Considerant aquesta darrera aproximació, l'adquisició de nous coneixements enfocats a determinar els mecanismes que regulen la proliferació i expansió de la massa cel·lular β durant el desenvolupament embrionari i l'etapa postnatal temprana amb el posterior declivi en la capacitat replicativa de les cèl·lules β adultes, s'ha convertit en una àrea d'estudi important dins la recerca en diabetis. Durant els últims deu anys, s'han descobert un gran nombre de factors i vies de senyalització que regulen la proliferació de la cèl·lula β : no obstant, la majoria d'estudis s'han realitzat en models animals i no sempre s'ha aconseguit reproduir els resultats en cèl·lules β humanes. La identificació de nous mecanismes que formin part d'aquest procés seria de gran ajuda per el desenvolupament de teràpies de substitució i regeneració de cèl·lules β pel tractament de la diabetis.

Una de les vies a les quals se'ls ha donat un paper mitogènic en la cèl·lula β és la intervinguda pels GPCR- $G_{s\alpha}$, concretament la que és activada per incretines i que és dependent dels nivells del segon missatger AMPc. Els animals deficients per $G_{s\alpha}$, activadora de l'AdC, tan en cèl·lula β ¹⁴³ com en el pàncrees total¹⁴⁴ presenten hiperglucèmia, intolerància a la glucosa i una massa cel·lular β insuficient en l'edat adulta, que es correlaciona amb una disminució en la taxa de proliferació i un augment en els nivells d'apoptosi. Per altra banda, la subunitat inhibidora de l'AdC, $G_{i\alpha}$, també s'ha descrit com a moduladora de la proliferació en resposta principalment al receptor Adra2a (receptor adrenèrgic alfa 2) presentant el model genoanul·lat per $G_{i\alpha}$ un efecte contrari al de $G_{s\alpha}$ sobre la massa cel·lular β ¹⁴⁵. Aquestes evidències descrites en models animals transgènics suggereixen que les alteracions en la senyalització dels receptors acoblats a aquestes proteïnes G que senyalitzen via AMPc podrien contribuir a la reducció del nombre de cèl·lules β observada en pacients amb DM2. De la mateixa manera, la inhibició de la senyalització $G_{i\alpha}$ o l'activació de la senyalització $G_{s\alpha}$ podrien ser opcions terapèutiques per tal d'expandir el nombre de cèl·lules β en els pacients diabètics.

Tenint en consideració les publicacions prèvies existents, en aquesta tesi hem volgut aprofundir en el paper de l'AMPc en l'expansió de la massa cel·lular β durant l'etapa postnatal temprana. Per això, hem emprat un model animal en el qual hem eliminat la subunitat $G_{s\alpha}$ a la cèl·lula β pancreàtica, el ratolí β - $G_{s\alpha}$ KO. Aquest model es diferencia del generat pel laboratori de Weinstein en el fet que el transgènic portador de la recombinasa Cre és un *knockin* que expressa Cre al locus *Ins1* permetent la delecció específica en cèl·lula β i no en neurones²⁰⁴. És important destacar que els dos models previs presentaven deficiències addicionals en el creixement postnatal de l'animal que els autors relacionen amb uns nivells més baixos d'Igf1 circulant en el model condicional de cèl·lula β i amb una possible malabsorció alimentària deguda a funció exocrina deficient en el cas del condicional de pàncrees. En el nostre model hem confirmat que la delecció de $G_{s\alpha}$ provoca el desenvolupament d'hiperglucèmia, intolerància a la glucosa, una secreció d'insulina deficient i una massa cel·lular β reduïda respecte als controls. Totes aquestes alteracions s'observen sense canvis evidents en el creixement de l'animal, descartant així que els defectes en l'homeòstasi de la glucosa puguin ser secundaris a defectes no autònomo-cel·lulars que afecten cèl·lules no β . D'altra banda, hem pogut demostrar que els defectes en

massa cel·lular β es desenvolupen poc després del naixement, durant el període de lactància, que en el ratolí és quan es produeix una gran expansió de les cèl·lules β en coordinació amb el creixement del pàncrees i de l'organisme sencer. En els models deficients tan per Gs α com per Gai previs ja s'havia esmentat que el fenotip de massa β pancreàtica es desenvolupava durant les primeres etapes de la vida postnatal. Malgrat això, aquest període no s'ha estudiat en detall, en particular el de la senyalització intervinguda pels GPCR-Gs quedant per identificar els determinants moleculars que puguin ser causa dels defectes observats.

Una pregunta clau és quin és el lligand o lligands endògens de la senyalització intervinguda per Gs α /AMPc responsable de l'expansió de la cèl·lula β durant l'etapa postnatal. Uns dels candidats obvis són les hormones incretines. De fet, hem observat una reducció molt significativa de l'expressió dels seus receptors en illots joves del nostre model animal. No obstant, els animals transgènics deficients per Glp1r o Gpr o bé els dos de manera simultània no exhibeixen defectes en l'establiment de la massa cel·lular β , aleshores tot i que els illots deficients per Gs α presentin una reducció des de p7 en els nivells d'expressió de *Glp1r*, és poc probable que el defecte en l'expansió β sigui conseqüència del defecte en aquests receptors o almenys que es tracti d'un efecte directe. Una altra observació important que hem fet en el model animal β -Gs α KO, és que els illots de p28 controls no responen adequadament a exendina-4 quant a l'augment dels nivells d'AMPc, fet que suggereix que la senyalització d'aquesta incretina, almenys via Gs α -AdC/AMPc, encara no és funcional en illots d'animals joves i per tant és poc probable que participi en l'expansió cel·lular β durant aquesta etapa. A part dels receptors d'insulina hi ha altres receptors expressats en la cèl·lula β i que actuen a través de GPCR-Gs com són PACAP, VIPR2, B2r, P2Y, Gal1r o bé el receptor cannabinoide 119 (Gpr119), el qual també es mostra disminuït a nivell gènic en el nostre model animal, i que per tant també podrien estar involucrats en el defecte de l'expansió de la massa β . La generació de models animals transgènics amb deleccions combinades en cèl·lula β dels diferents receptors que actuen a través de GPCR-Gs permetria adquirir més coneixement sobre la seva implicació en l'expansió i establiment de la massa cel·lular β en l'organisme. De fet, estudis recents demostren que l'agonista de Gpr119 promou la replicació de la cèl·lula β tan *in vitro* com *in vivo* ^{218,219}. Existeix controvèrsia sobre si realment les incretines tenen un efecte directe en la regulació de la massa cel·lular β o bé si el seu efecte queda aïllat en la millora de la secreció d'insulina. No obstant en rates diabètiques *db/db* ¹³⁸ i en rates zucker obeses *fa/fa* ²²⁰ s'ha demostrat que l'exendina-4 promou la inducció de la replicació i la neogènesi de la cèl·lula β donant lloc a un augment en la massa cel·lular β . De fet, en humans també s'ha demostrat que el tractament amb l'anàleg estructural de Glp1 promou un augment en la proliferació i supervivència de la cèl·lula β però no es coneix el mecanisme molecular específic ni les vies de senyalització que ho regulen ^{221,222}.

Molts dels efectes observats de les incretines atribuïts sobre cèl·lula β *in vitro* estan relacionats amb la millora de la supervivència cel·lular, és a dir, amb la inhibició de l'apoptosi dependent de citoquines ^{22,101,111,223-225}. No obstant, en els animals β -Gs α KO no hem observat cap augment en els nivells de mort cel·lular en el nostre model animal estudiat fins a les 8 setmanes d'edat, indicant que una reducció del 50% de *Glp1r* no és suficient per afectar la supervivència de la cèl·lula β jove. Cal esmentar que els animals KO de cèl·lula β adults del grup del Weinstein presentaven una reducció en els nivells de proliferació i un augment de l'apoptosi de la cèl·lula β . Mentre que en edats joves aquests autors mencionen com a dades no mostrades que no hi ha un augment de mort cel·lular, com observem en els nostres resultats. Per tant, no podem descartar que la mort cel·lular sigui conseqüència de la hiperglucèmia i les alteracions metabòliques d'aquests animals.

La menor expressió de Glp1r en illots d'animals β -Gs α KO podria indicar que els nivells d'AMPc regulen l'expressió d'aquest receptor. De fet, els nostres resultats d'illots control en cultiu mostren una regulació

positiva de *Glp1r* per forskolina (activadora de l'AdC) i de manera rellevant per glucosa. No obstant, curiosament el nostre model animal desenvolupa hiperglucèmia des de la primera setmana de vida exhibint una davallada de *Glp1r* des d'aquesta mateixa edat, indicant que els nivells elevats de glucosa no són suficients per mantenir l'expressió d'aquest receptor i que el bloqueig de la via $Gs\alpha$ /cAMP juga un paper prominent. Els nostres resultats estan en línia amb la literatura on s'ha demostrat una disminució en els nivells d'expressió gènica dels dos receptors d'incretines *Glp1r* i *Gipr* en illots de rates diabètiques (Px) i de ratolins diabètics obesos db/db ²⁰⁹. En el mateix sentit, estudis previs demostren que cèl·lules β de rosegadors crònicament exposades a concentracions elevades de glucosa (16.7-25 mM) exhibeixen una alteració en la senyalització de *Glp1r* portant a una menor secreció de insulina, una reducció en l'activitat de PKA i com a conseqüència una reducció en la fosforilació del factor de transcripció Creb. A més també mostren un defecte en la resposta a través d'AMPc degut a un increment en l'expressió del repressor d'AMPc i AdC anomenat ICER i una disminució en la internalització de *Glp1r* des de la membrana plasmàtica ²⁰⁷.

Durant l'etapa de la lactància no només hi ha un augment del nombre de cèl·lules β sinó que aquestes maduren funcionalment i adquireixen la capacitat de secretar insulina en resposta a la glucosa. Aquest període també es caracteritza per l'augment de l'expressió de marcadors de diferenciació claus com la pròpia insulina, les convertases encarregades de processar la insulina o els factors de transcripció Pdx1 i Mafa (Dr. Mir, dades no mostrades). En el nostre model animal hem vist que els illots exhibeixen una disminució en els nivells de l'expressió gènica de molts d'aquests gens i una baixada del contingut d'insulina des d'una etapa postnatal molt temprana. Dels factors de transcripció estudiats, *Mafa* està clarament disminuït a p7 juntament amb *Ins1* i *Pcsk1/3*. En la literatura està descrit que aquest factor de transcripció regula el gen de la *insulina* així com la maduració de la pròpia cèl·lula β . Aleshores, la pèrdua en els nivells d'expressió de *Mafa* en les cèl·lules β dels illots del nostre model animal podria estar indicant la falta de maduració de la cèl·lula ja que estudis de desdiferenciació cel·lular en el model transgènic *IKO* (deficient per FoxO1 en cèl·lula β) mostren com el principal marcador d'identitat que es perd és *Mafa* en la cèl·lula β ²²⁶. Tot i així, altres factors de transcripció com NeuroD1 o bé marcadors de cèl·lula β com *Gck* no mostren alteracions en els illots β - $Gs\alpha$ KO indicant que l'absència de $Gs\alpha$ no impedeix completament la diferenciació de les cèl·lules β . De fet els animals KO per *Mafa* en cèl·lula β exhibeixen una reducció del 50% en els nivells d'expressió de *Ins1* sense canvis en els nivells d'expressió d'altres gens d'identitat i maduració de la cèl·lula β ²²⁷. Els nostres resultats d'estimulacions de 48 h en illots control adults coincideixen amb estudis previs demostrant que els nivells gènics de *Mafa* venen regulats per glucosa ^{41,228,229} així com també per la via de senyalització de les incretines a través del factor de transcripció Creb ²³⁰. Les nostres dades mostren que, a més a més del fet ja conegut que *Mafa* regula directament el gen de la *insulina* unint-se al seu promotor, la insulina també regula l'expressió gènica d'aquest factor de transcripció, revelant un possible mecanisme de retroalimentació positiva entre aquests dos gens. Cal tenir present que l'existència de la connexió entre la via de senyalització Gs /AMPc i la d'insulina fa difícil poder discernir entre els efectes de cada una d'elles per separat, entendre quins canvis són conseqüència directa de la disminució en els nivells de l'AMPc i quins per la deficiència en la via de la insulina tan a nivell de receptor com a nivell de lligand i senyalització. En base als nostres resultats, proposem que el defecte en la via de la insulina en els illots β - $Gs\alpha$ KO encara empitjora més els nivells de *Mafa* el qual és clau per la maduració de la cèl·lula β .

En els nostres resultats es mostra com l'eliminació de $Gs\alpha$ a la cèl·lula β provoca alteracions de l'expressió de components de la via d'Igf1/Insulina. Estudis previs han demostrat que l'AMPc regula l'expressió de *Igf1r* i de *Irs2* en cèl·lula β ^{22,115}, establint l'existència d'una connexió entre les dues senyalitzacions. Hem observat que els illots KO per $Gs\alpha$ presenten, a part d'aquest dos gens, una disminució dels nivells d'insulina (ligand) i del receptor de la insulina, juntament amb un augment del

regulador negatiu de la via de la insulina, Ptp1b¹⁷². Corroborant aquests canvis d'expressió gènica, l'activació dels principals mediadors de la via de senyalització com són Akt i S6 es troben disminuïts a nivell basal i Akt no es fosforila quan els illots β -Gs α KO s'estimulen de manera aguda amb insulina. Aquests resultats posen de relleu la connexió entre aquestes dos vies de transducció de senyal a la cèl·lula β . Així doncs, les deficiències en la via de senyalització d'Igf1/Insulina dels animals β -Gs α KO podria ser un contribuïdor important en el defecte en l'expansió de massa β d'aquest model. Des de temps enrere, se sap que la cascada Irs2/PI3K/Akt juga un paper crític en la regulació de la proliferació i massa de la cèl·lula β tan *in vivo* com *in vitro*^{174,191,231}. La deleció individual de Insr o Igf1r en cèl·lula β no produeix defectes en la massa cel·lular β evidents en l'etapa postnatal temprana, però la deficiència combinada dels dos receptors sí que altera l'expansió β abans del deslletament^{142,173,213,232}. Aquestes dades coincideixen amb els resultats obtinguts en el nostre model animal β -Gs α KO on veiem disminució dels dos receptors des d'una etapa postnatal temprana. Malgrat això, és interessant mencionar que la resposta mitogènica *in vitro* a Igf1 resta intacta mentre que la d'insulina es troba bloquejada en les cèl·lules deficientes per Gs α . Per entendre aquests resultats és important tenir en compte que la insulina, a més d'unir-se al receptor Insr amb elevada afinitat, també es pot unir a Igf1r i els receptors híbrids (Insr/Igf1r) però amb menys afinitat, mentre que en el cas d'Igf1 s'uneix al seu propi receptor o bé als híbrids. Aquesta unió creuada dels lligands als diferents receptors per les diferents afinitats, podria explicar en part els nostres resultats.

Tal i com ja hem comentat anteriorment, el gen *Insr1* i la convertasa *Pcsk1/3* es troben alterats en els illots β -Gs α KO de p7. D'acord amb aquestes dades, hem vist que el contingut de proinsulina de l'illot i els nivells circulants de la prohormona està augmentat en KO. Per tant als nivells baixos d'insulina madura s'hi ha d'afegir una processament ineficient de la mateixa. La proinsulina, tot i no ser madura també pot activar la senyalització de la via de la insulina però els efectes de proliferació i migració de la cèl·lula β esdevenen més febles que els que indueix la pròpia insulina ja que presenta menys afinitat pel receptor en comparació amb la hormona madura. Aleshores, aquest fet podria contribuir també a una activació més moderada de la via de transducció de senyal i per tant, la inducció de la proliferació de la cèl·lula β no es promouria en el mateix grau que en un estat fisiològic.

Per altra banda, la regulació de les isoformes del Insr ve donada pels factors de splicing com *Srsf1*, *Srsf3* o *Mbn1* que promouen l'inclusió de l'exó 11 a nivell gènic, o *Celf1* que l'inclou^{156,159}. Aquestes dades lliguen amb els resultats obtinguts en el nostre treball on els animals β -Gs α KO presenten uns nivells d'expressió de *Srsf1* menors i un augment en *Celf1* en comparació amb el grup control. No obstant, es coneix poc sobre els diferents factors que determinen l'expressió de cada isoforma de manera teixit-específic així com la funció de cada isoforma en la cèl·lula β . L'ús de primers que amplifiquen el receptor complet o bé només fins l'exó 11 (Insr-B), ens ha permès detectar que des de p7, els animals β -Gs α KO exhibeixen nivells significativament menors de Insr i més dramàticament de Insr-B que correlaciona amb un augment del quocient Insr-A/Insr-B en comparació amb el grup control. La connexió d'aquesta observació amb la disminució de la proliferació no és clara si tenim en compte que publicacions prèvies suggereixen que Insr-A, però no Insr-B, confereix una capacitat proliferativa augmentada a la cèl·lula β en situacions de disponibilitat de glucosa en resposta a Igf1 i mTORC1 com a via principal reguladora d'aquest procés¹⁶³. De totes maneres, hem vist que els nivells de proteïna total del receptor de la insulina en illots frescos aïllats KO es troben reduïts el 50%, fet que podria indicar que el contingut total en Insr-A també és més baix en KO que en controls. Per altra banda, els resultats de Malakar et al. mostren que Insr-B exhibeix un paper protector cèl·lula β , mentre que l'expressió de Insr-A sensibilitza a les cèl·lules a induir una mort programada o apoptosi. Està clar que calen més investigacions destinades a determinar quins són els papers fisiològics de cada isoforma. Malakar et al també mostren que la insulina indueix l'inclusió de l'exó 11, promovent *InsrB*, a través de l'augment en l'expressió del factor de splicing *Srsf1*

seguint una senyalització dependent de Ras-Mapk/Erk, tan en illots humans com en illots de ratolí ¹⁵⁷. Els nostres resultats d'estimulació durant 48 h confirmen la regulació de *InsrB* per insulina, mentre que en el cas de *Srsf1* s'observa una nova regulació no descrita prèviament a través de l'augment en els nivells d'AMPC induïts per forskolina en les dues condicions de glucosa. Per tant, és plausible que els canvis d'expressió de *Srf1* siguin conseqüència directa del bloqueig de la via del cAMP en illots β -Gsa KO.

Un tema de debat sostingut en les investigacions sobre la senyalització autocrina d'insulina a la cèl·lula β és el discerniment dels papers de la glucosa i de la insulina per separat ja que ambdós molècules es coregulen. Tenint en compte que la glucosa regula l'expressió de la *insulina*²²⁹ tot i que no es coneixen els mecanismes, en els nostres resultats els ratolins exhibeixen hiperglucèmia però per altra banda presenten una alteració en la senyalització de la insulina. A més, també hem pogut observar que la glucosa determina d'alguna manera la resposta dels illots a forskolina ja que a 8 mM hi ha regulacions que es perden. Per altra banda es coneix que la glucosa actua com a potent estimulador de la replicació de la cèl·lula β tan en rosegadors com en humans a través de diferents mecanismes que activen gens específics de proliferació ¹⁰³. Alguns d'aquests mecanismes funcionen a través de l'activació de mTOR o bé per la fosforilació de quinases com PKA o Erk1/2 les quals promouran la fosforilació del factor de transcripció Creb. Tot i aquestes evidències, de nou, el desenvolupament de la hiperglucèmia tempra en els animals β -Gsa KO no sembla ser suficient com per traduir-se en un augment en els nivells de replicació de la cèl·lula β , segurament degut a la forta alteració exhibida en la via de la insulina en aquests animals. Aquests resultats suggereixen que la insulina és igual o fins hi tot més important que la glucosa en la regulació de la proliferació de la cèl·lula β .

Un experiment que no ha estat possible realitzar en aquest model és el de rescat del fenotip de massa β en KO mitjançant l'activació de la via de la insulina. L'administració d'insulina en cries (p0-p7) podria recuperar els defectes que desenvolupen els ratolins. No obstant l'edat dels animals és una limitació tècnica important pel disseny experimental en termes de vies d'administració, dosis i resposta a molècules. Trobar una concentració d'insulina que fos suficient per induir un defecte beneficiós als animals però limitada per tal d'evitar hipoglucèmies complica la realització d'aquesta aproximació. D'altra banda, el tractament amb insulina més enllà de les dues setmanes d'edat en els animals β -Gsa KO no tindria massa sentit ja que la majoria dels defectes que observem ja s'haurien desenvolupat i per tant no podríem prevenir el fenotip. A més, si els defectes que observem en la senyalització per insulina fossin únicament conseqüència secundària de la inhibició de la via, aquesta estratègia podria donar resultats positius però cal tenir en compte que en els animals β -Gsa KO a més d'estar alterada la senyalització i el lligand, també ho està el receptor d'insulina i per tant, és possible que l'administració de la hormona exògena no fos efectiva tal i com hem observat en illots *in vitro* on l'estimulació aguda amb insulina humana recombinant no augmenta els nivells de fosforilació del receptor.

Com alternativa a aquesta aproximació, també es podria promoure l'activació de la via mitjançant la modulació de l'activitat de components intracel·lulars, com és la fosfatasa reguladora negativa de la via de la insulina: Ptp1b. Ens vam plantejar el creuament de ratolins β -Gsa KO amb ratolins Ptp1b^{-/-} sistèmics com a estratègia per promoure l'activació de la via de senyalització (Ptp1b és un inhibidor de la via) de la insulina *downstream* del seu receptor. No obstant, no vam aconseguir obtenir cap animal doble KO. El fet que els dos gens, *Gnas* i *Ptp1n*, es troben situats en el mateix cromosoma 2 podria ser responsable d'aquest resultat. Una altra opció podria ser estimular directament el mediador Akt. En els últims anys s'han volgut desenvolupar moltes estratègies encaminades a potenciar l'activitat d'Akt per tal de poder promoure i induir la proliferació de la cèl·lula β , no obstant, una de les principals limitacions d'aquesta aproximació com a diana terapèutica de la diabetis és el seu potencial de transformació oncogènica. Sota la senyalització d'Akt es troba el complex TSC/mTORC1, un altre candidat important per tal de modular l'expansió de la cèl·lula β ja que integra senyals de factors de creixement i nutrients, indueix creixement

controlat i rarament s'ha associat amb signes de malignitat. Les evidències actuals donen suport al concepte que mTORC1 és trobat actiu en situacions de demanda de insulina i juga un paper rellevant en l'expansió de la massa cel·lular β i en la proliferació induïda per Akt i la resistència a la insulina. La major part de coneixement sobre aquest complex en cèl·lula β es basa en experiments *in vitro* utilitzant línies cel·lulars o illots aïllats tractats amb rapamicina, l'inhibidor de la seva senyalització^{233,234}. La recerca destinada a determinar els mecanismes específics a través dels quals mTORC1 regula de manera controlada la proliferació de la cèl·lula β i la seva massa aportaria nou coneixement per tal de desenvolupar noves estratègies farmacològiques destinades a promoure de manera controlada i selectiva la proliferació de la cèl·lula β sense alterar el risc de transformacions oncogèniques. Els descobriments de molècules i components que modulin aquesta senyalització podrien ser utilitzats en experiments translacionals per tal de tractar la diabetis expandint la massa cel·lular β *in vivo*. En la mateixa línia, la manipulació farmacològica d'aquesta senyalització també podria ser utilitzada per augmentar el pool d'illots aptes pel transplantament i d'aquesta manera millorar la seva eficiència. Tenint en compte aquests coneixements, una bona aproximació per tal de restituir la funcionalitat d'Akt i intentar prevenir el desenvolupament d'hiperglucèmia i els defectes fenotípics observats dels animals β -Gs α KO.

RESUM

- Els animals β -Gsa KO presenten hiperglucèmia des de p7 i hipoinsulinèmia des de p28.
- Els animals β -Gsa KO són intolerants a la glucosa administrada per via intraperitoneal i oral a p28. Aquesta intolerància es manté en l'edat adulta.
- Els animals β -Gsa KO no presenten alteracions en la sensibilitat perifèrica a la insulina.
- Els animals β -Gsa KO presenten una secreció d'insulina en resposta a glucosa *in vivo* insuficient. Els illots d'animals β -Gsa KO adults no presenten una resposta insulino-secretora a la glucosa *in vitro*.
- Els animals β -Gsa KO presenten un defecte en l'expansió postnatal de les cèl·lules β que es fa evident a les 4 setmanes de vida amb una reducció significativa de l'àrea fraccional β i de la massa cel·lular β . Aquesta alteració va lligada a una disminució en la taxa de proliferació de la cèl·lula β postnatal sense signes evidents d'apoptosi.
- Els illots dels animals β -Gsa KO presenten múltiples alteracions en la via de senyalització Gs-cAMP que inclouen:
 - Nivells basals d'AMPc negligibles.
 - Expressió gènica reduïda dels receptors d'incertines i components de la via de senyalització AMPc/PKA (*Glp1r*, *Gipr*, *Gcgr*, *Prkarb1*, *Prkaca1*, *Creb3*).
 - Activació reduïda de l'efector Creb.
 - Menor expressió gènica de les principals dianes de Creb: *Ccna2*, *Mafa*, *Irs2* i *Igf1r*.
- Els illots dels animals β -Gsa KO presenten múltiples alteracions en la via de senyalització d'Igf1/Insulina que inclouen:
 - Expressió gènica de *Ins1* i contingut d'insulina de l'illot molt reduïts.
 - Expressió gènica reduïda *Pcsk1/3* i *Pcsk2*, acompanyat d'un increment de proinsulina en l'illot i circulant.
 - Expressió gènica i nivells proteics reduïts de *Insr* a la cèl·lula β .
 - Alteració en la distribució de les isoformes de l'*Insr*: A i B. Expressió reduïda del factor de splicing *Srsf* i augment dels nivells d'expressió de *Celf1*.
 - Activació reduïda dels mediadors Akt i S6.
- Els illots β -Gsa KO presenten un defecte en la resposta proliferativa a la insulina *in vitro*, però mantenen la resposta a Igf1.
- L'activació sinèrgica de les vies de senyalització Gs/AMPc/PKA i la via de la insulina és indispensable per induir la proliferació de dels illots β -Gsa KO en un estat fisiològic.

CONCLUSIONS

- En base als resultats obtinguts es demostra l'existència d'una intercomunicació entre la via de senyalització de Gs-AMPC i la via d'Igf1/insulina en illots murins postnatsals.
- El defecte observat en la via Igf1/Insulina podria ser directament responsable del defecte exhibit en l'expansió i establiment de la massa cel·lular β durant l'etapa postnatal temprana en el model animal β -Gsa KO.

BIBLIOGRAFIA

1. Franks, P. W. & McCarthy, M. I. Exposing the exposures responsible for type 2 diabetes and obesity. *Science* (80-.). **354**, 69–73 (2016).
2. Prentki, M. & Nolan, C. J. Islet beta-cell failure in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* **116**, 1802–1812 (2006).
3. Todd, J. A. Etiology of Type 1 Diabetes. *Immunity* **32**, 457–467 (2010).
4. Van Belle, T. L., Coppieters, K. T. & Von Herrath, M. G. Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiol. Rev.* **91**, (2011).
5. Wagner, D. H. Overlooked Mechanisms in Type 1 Diabetes Etiology: How Unique Costimulatory Molecules Contribute to Diabetogenesis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **8**, 208 (2017).
6. (NCD-RisC), N. R. F. C. *Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. The Lancet* **387**, (Elsevier, 2016).
7. Organization, W. H. *GLOBAL REPORT ON DIABETES WHO. ISBN 978*, (2016).
8. Baron, M. *et al.* A Single-Cell Transcriptomic Map of the Human and Mouse Pancreas Reveals Inter- and Intra-cell Population Structure. *Cell Syst.* **3**, 346–360 (2016).
9. Dorrell, C. *et al.* Human islets contain four distinct subtypes of β cells. *Nat. Commun.* **7**, 1–9 (2016).
10. Tyrberg, B., Ustinov, J., Otonkoski, T. & Andersson, A. Stimulated endocrine cell proliferation and differentiation in transplanted human pancreatic islets: effects of the ob gene and compensatory growth of the implantation organ. *Diabetes* **50**, 301–7 (2001).
11. Georgia, S. *et al.* Cyclin D2 is essential for the compensatory beta-cell hyperplastic response to insulin resistance in rodents. *Diabetes* **59**, 987–996 (2010).
12. Krishnamurthy, J. *et al.* p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* **443**, 453–457 (2006).
13. Manuscript, A. & Dna, P. NIH Public Access. *Cell* **11**, 973–979 (2010).
14. Porat, S. *et al.* Control of pancreatic β cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab.* **13**, 440–449 (2011).
15. Aguayo-Mazzucato, C. *et al.* β Cell Aging Markers Have Heterogeneous Distribution and Are Induced by Insulin Resistance. *Cell Metab.* **25**, 898–910.e5 (2017).
16. Pandol, S. J. The exocrine pancreas. (2010).
17. Bouwens, L. & Pipeleers, D. G. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. *Diabetologia* **41**, 629–633 (1998).
18. Prado, C. L., Pugh-Bernard, A. E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B. & Sussel, L. Ghrelin cells replace insulin-producing cells in two mouse models of pancreas development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2924–2929 (2004).
19. Wierup, N., Yang, S., Mcevilly, R. J., Mulder, H. & Sundler, F. Ghrelin Is Expressed in a Novel Endocrine Cell Type in Developing Rat Islets and Inhibits Insulin Secretion from INS-1 (832 / 13) Cells. **52**, 301–310 (2004).
20. Arrojo e Drigo, R. *et al.* New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. *Diabetologia* **58**, 2218–2228 (2015).

21. Wang, P. *et al.* Diabetes mellitus—advances and challenges in human β -cell proliferation. *Nat. Rev. Endocrinol.* (2015). doi:10.1038/nrendo.2015.9
22. Cornu, M. & Thorens, B. GLP-1 protects β -cells against apoptosis by enhancing the activity of an IGF-2/IGF1-receptor autocrine loop. *Islets* **1**, 280–282 (2009).
23. Traub, S. *et al.* Pancreatic α Cell-Derived Glucagon-Related Peptides Are Required for β Cell Adaptation and Glucose Homeostasis. *Cell Rep.* **18**, 3192–3203 (2017).
24. Chambers, A. P. *et al.* The Role of Pancreatic Preproglucagon in Glucose Homeostasis in Mice. *Cell Metab.* **25**, 927–934.e3 (2017).
25. Habener, J. F. & Stanojevic, V. Pancreas and Not Gut Mediates the GLP-1-Induced Glucoincretin Effect. *Cell Metab.* **25**, 757–758 (2017).
26. Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B. & Want, L. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectr.* **17**, 183–190 (2004).
27. Jones, B. J., Tan, T. & Bloom, S. Minireview: Glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinology* **153**, 1049–1054 (2012).
28. Rizza, R. a., Cryer, P. E. & Gerich, J. E. Role of Glucagon, Catecholamines, and Growth Hormone in Human Glucose Counterregulation. *J. Clin. Invest.* **64**, 62–71 (1979).
29. Medical, I. & Commentaries, P. Banting Lecture 1981 Macro- and Micro-Domains in the Endocrine Pancreas. **31**, (2000).
30. Melloul, D., Ben-Neriah, Y. & Cerasi, E. Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3865–3869 (1993).
31. Macfarlane, W. M. *et al.* Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular Ca^{2+} . *Diabetes* **49**, 418–423 (2000).
32. Elrick, L. J. & Docherty, K. Phosphorylation-Dependent Nucleocytoplasmic Shuttling of Pancreatic Duodenal Homeobox-1. *Diabetes* **50**, 2244–2252 (2001).
33. Andrali, S. S., Sampley, M. L., Vanderford, N. L. & Özcan, S. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β -cells. *Biochem. J.* **415**, 1–10 (2008).
34. Ohneda, K., Ee, H. & German, M. Regulation of insulin gene transcription. **11**, 227–233 (2000).
35. Lawrence, M., Shao, C., Duan, L., McGlynn, K. & Cobb, M. H. The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. *Acta Physiol.* **192**, 11–17 (2008).
36. Petersen, H. V., Jensen, J. N., Stein, R. & Serup, P. Glucose induced MAPK signalling influences NeuroD1-mediated activation and nuclear localization. *FEBS Lett.* **528**, 241–245 (2002).
37. Kataoka, K. *et al.* MafA is a glucose-regulated and pancreatic β -cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 49903–49910 (2002).
38. Olbrot, M., Rud, J., Moss, L. G. & Sharma, A. Identification of β -cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 6737–6742 (2002).
39. Zhang, C. *et al.* MafA Is a Key Regulator of Glucose-Stimulated Insulin Secretion MafA Is a Key Regulator of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4969–76 (2005).
40. Matsuoka, T. -a. *et al.* The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific

- expression of insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2930–2933 (2004).
41. Vanderford, N. L., Andrali, S. S. & Özcan, S. Glucose induces MafA expression in pancreatic beta cell lines via the hexosamine biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 1577–1584 (2007).
 42. Khoo, S. & Cobb, M. H. Activation of mitogen-activating protein kinase by glucose is not required for insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5599–5604 (1997).
 43. Han, S. -i., Aramata, S., Yasuda, K. & Kataoka, K. MafA Stability in Pancreatic Cells Is Regulated by Glucose and Is Dependent on Its Constitutive Phosphorylation at Multiple Sites by Glycogen Synthase Kinase 3. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6593–6605 (2007).
 44. Heit, J. J. *et al.* Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* **443**, 345–349 (2006).
 45. Heit, J. J. Calcineurin/NFAT signaling in the β -cell: From diabetes to new therapeutics. *BioEssays* **29**, 1011–1021 (2007).
 46. Melloul, D., Marshak, S. & Cerasi, E. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* **45**, 309–326 (2002).
 47. Davidson, H. W. (Pro)Insulin processing: a historical perspective. *Cell Biochem. Biophys.* **40**, 143–58 (2004).
 48. Klimek, A. M. *et al.* Impaired proinsulin processing is a characteristic of transplanted islets. *Am. J. Transplant.* **9**, 2119–2125 (2009).
 49. Eckert, D. M. & Kim, P. S. Mechanisms of Viral Membrane Fusion and Its Inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 777–810 (2001).
 50. Prentki, M., Matschinsky, F. M. M. & Madiraju, S. R. M. R. M. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab.* **18**, 162–185 (2013).
 51. Kalwat, M. A. & Cobb, M. H. Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the β cell. *Pharmacol. Ther.* **179**, 17–30 (2017).
 52. Oya, M., Suzuki, H., Watanabe, Y., Sato, M. & Tsuboi, T. Amino acid taste receptor regulates insulin secretion in pancreatic β -cell line MIN6 cells. *Genes to Cells* **16**, 608–616 (2011).
 53. Butler, P. C., Meier, J. J., Butler, A. E. & Bhushan, A. The replication of β cells in normal physiology, in disease and for therapy. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **3**, 758–768 (2007).
 54. Georgia, S. & Bhushan, A. β cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal β cell mass. *J. Clin. Invest.* **114**, 963–968 (2004).
 55. Saisho, Y. *et al.* Beta-Cell Mass and Turnover in Humans: Effects of obesity and aging. *Diabetes Care* **36**, 111–117 (2013).
 56. Teta, M., Long, S. Y., Wartschow, L. M., Rankin, M. M. & Kushner, J. A. Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* **54**, 2557–67 (2005).
 57. Bonner-Weir, S., Aguayo-Mazzucato, C. & Weir, G. C. Dynamic development of the pancreas from birth to adulthood. *Ups. J. Med. Sci.* **121**, 155–158 (2016).
 58. Hellerström, C. & Swenne, I. Functional maturation and proliferation of foetal pancreatic β -cells. *Diabetes* **40**, 89–93 (1991).
 59. Blum, B. *et al.* Functional beta-cell maturation is marked by an increased glucose threshold and by expression of urocortin 3. *Nat. Biotechnol.* **30**, 261–264 (2012).

60. Freinkel, N. *et al.* Differential effects of age versus glycaemic stimulation on the maturation of insulin stimulus-secretion coupling during culture of fetal rat islets. *Diabetes* **33**, 1028–1038 (1984).
61. Guo, L. *et al.* PDX1 in ducts is not required for postnatal formation of β -cells but is necessary for their subsequent maturation. *Diabetes* **62**, 3459–3468 (2013).
62. Aguayo-Mazzucato, C. *et al.* Mafk expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. *Diabetologia* **54**, 583–593 (2011).
63. Montanya, E., Nacher, V., Biarnés, M. & Soler, J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* **49**, 1341–6 (2000).
64. Suzuki, A., Nakauchi, H. & Taniguchi, H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* **53**, 2143–2152 (2004).
65. Baeyens, L., Hindi, S., Sorenson, R. L. & German, M. S. β -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes. Obes. Metab.* **18 Suppl 1**, 63–70 (2016).
66. Linnemann, A. K., Baan, M. & Davis, D. B. Pancreatic Beta-Cell Proliferation in Obesity. *Adv. Nutr.* 278–288 (2014). doi:10.3945/an.113.005488.278
67. Salpeter, S. J. *et al.* Systemic regulation of the age-related decline of pancreatic beta-cell replication. *Diabetes* **62**, 2843–2848 (2013).
68. Gershengorn, M. C. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* (80-.). **306**, 2261–2264 (2004).
69. Balducci, Stefano, Sacchetti, Massimo, Haxhi, Jonida, Orlando, Giorgio, D'Errico, Valeria, Fallucca, Sara, Menini, Stefano, Pugliese, G. Physical Exercise as therapy for type II diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **32**, 13–23 (2014).
70. Szabat, M. *et al.* Reduced Insulin Production Relieves Endoplasmic Reticulum Stress and Induces β Cell Proliferation. *Cell Metab.* **23**, 179–193 (2016).
71. Bader, E. *et al.* Identification of proliferative and mature β -cells in the islets of Langerhans. *Nature* **535**, 430–434 (2016).
72. van der Meulen, T. *et al.* Virgin Beta Cells Persist throughout Life at a Neogenic Niche within Pancreatic Islets. *Cell Metab.* **25**, 911–926.e6 (2017).
73. Parnaud, G. *et al.* Proliferation of sorted human and rat beta cells. *Diabetologia* **51**, 91–100 (2008).
74. Bernal-Mizrachi, E. *et al.* Human β -cell proliferation and intracellular signaling part 2: Still driving in the dark without a road map. *Diabetes* **63**, 819–831 (2014).
75. Stewart, A. F. *et al.* Human β -Cell proliferation and intracellular signaling: Part 3. *Diabetes* **64**, 1872–1885 (2015).
76. Rieck, S. & Kaestner, K. H. Expansion of beta cell mass in response to pregnancy. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 151–158 (2013).
77. Finegood, D. T., Scaglia, L. & Bonner-Weir, S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* **44**, 249–56 (1995).
78. Butler, A. E. *et al.* Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia* **53**, 2167–2176 (2010).

79. Butler, A. E. *et al.* Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 102–110 (2003).
80. Pick, A. *et al.* Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* **47**, 358–364 (1998).
81. Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C. M. & Permutt, M. A. Islet β cell expression of constitutively active Akt1/PKB α induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J. Clin. Invest.* **108**, 1631–1638 (2001).
82. Lakshminpathi, J. *et al.* PKC- ζ is essential for pancreatic beta cell replication during insulin resistance by regulating mTOR and cyclin-D2. *Diabetes* (2016). doi:10.2337/db15-1398
83. Vasavada, R. C. *et al.* Protein Kinase C- Activation Markedly Enhances β -Cell Proliferation: An Essential Role in Growth Factor Mediated β -Cell Mitogenesis. *Diabetes* **56**, 2732–2743 (2007).
84. Velazquez-Garcia, S. *et al.* Activation of Protein Kinase C- in Pancreatic β -Cells In Vivo Improves Glucose Tolerance and Induces β -Cell Expansion via mTOR Activation. *Diabetes* **60**, 2546–2559 (2011).
85. Xie, J. *et al.* Exendin-4 stimulates islet cell replication via the IGF1 receptor activation of mTORC1/s6k1. *J. Mol. Endocrinol.* **53**, 105–115 (2014).
86. Pende, M. *et al.* S6K1-/-/S6K2-/- Mice Exhibit Preinatal Lethality and Rapamycin-Sensitive 5' - Terminal Oligopyrimidine mRNA Translation and Reveal a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent S6 Kinase Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3112–3124 (2004).
87. Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R. M., Sempoux, C. & Henquin, J. C. Pancreatic β -cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, Obes. Metab.* **10**, 32–42 (2008).
88. Marrif, H. I. & Al-Sunousi, S. I. Pancreatic β Cell Mass Death. *Front. Pharmacol.* **7**, 83 (2016).
89. Cinti, F. *et al.* Evidence of β -Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 1044–1054 (2016).
90. Kim-Muller, J. Y. *et al.* Metabolic inflexibility impairs insulin secretion and results in MODY-like diabetes in triple FoxO-deficient mice. *Cell Metab.* **20**, 593–602 (2014).
91. Butler, A. E. *et al.* β -Cell Deficit in Obese Type 2 Diabetes, a Minor Role of β -Cell Dedifferentiation and Degranulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 523–532 (2016).
92. Kulkarni, R. N., Mizrachi, E. B., Ocana, A. G. & Stewart, A. F. Human β -cell proliferation and intracellular signaling: Driving in the dark without a road map. *Diabetes* **61**, 2205–2213 (2012).
93. Li, Q. & Lai, Z.-C. Recent progress in studies of factors that elicit pancreatic β -cell expansion. *Protein Cell* **6**, 81–87 (2014).
94. Prasad, K. *et al.* A synopsis of factors regulating beta cell development and beta cell mass. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 3623–3637 (2016).
95. Cozar-Castellano, I. *et al.* Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic β -cell. *Endocr. Rev.* **27**, 356–370 (2006).
96. Fiaschi-Taesch, N. *et al.* Survey of the human pancreatic beta-cell G1/S proteome reveals a potential therapeutic role for cdk-6 and cyclin D1 in enhancing human beta-cell replication and function in vivo. *Diabetes* **58**, 882–93 (2009).
97. Kim, S. Y. *et al.* Loss of Cyclin-dependent Kinase 2 in the Pancreas Links Primary β -Cell Dysfunction to Progressive Depletion of β -Cell Mass and Diabetes. *J. Biol. Chem.* **292**, 3841–3853

(2017).

98. Moritani, M. *et al.* Hypoplasia of endocrine and exocrine pancreas in homozygous transgenic TGF- β 1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **229**, 175–184 (2005).
99. Avrahami, D. *et al.* Targeting the cell cycle inhibitor p57 Kip2 promotes adult human β cell replication. *J. Clin. Invest.* **124**, 670–674 (2014).
100. Smith, E. P. *et al.* The role of β cell glucagon-like peptide-1 signaling in glucose regulation and response to diabetes drugs. *Cell Metab.* **19**, 1050–1057 (2014).
101. Perfetti, R. & Hui, H. The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells. *Horm. Metab. Res.* **36**, 804–810 (2004).
102. Stoffers, D. A., Desai, B. M., DeLeon, D. D. & Simmons, R. A. Neonatal exendin-4 prevents the development of diabetes in the intrauterine growth retarded rat. *Diabetes* **52**, 734–740 (2003).
103. Garcia-ocaña, A. & Alonso, L. C. Glucose Mediated Regulation of Beta Cell Proliferation. *Endocrinology* 55–65 (2010).
104. Goodyer, W. R. *et al.* NIH Public Access. **23**, 21–34 (2013).
105. Metukuri, M. R. *et al.* ChREBP mediates glucose-stimulated pancreatic β -cell proliferation. *Diabetes* **61**, 2004–2015 (2012).
106. Rulifson, I. C. *et al.* Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6247–52 (2007).
107. Dhawan, S., Dirice, E., Kulkarni, R. N. & Bhushan, A. Inhibition of TGF-beta signaling promotes human pancreatic beta cell replication. *Diabetes* (2016). doi:10.2337/db15-1331
108. Sunahara, R. K. Isoforms of Mammalian Adenylyl Cyclase: Multiplicities of Signaling. *Mol. Interv.* **2**, 168–184 (2002).
109. Houslay, M. D. & Adams, D. R. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem. J.* **370**, 1–18 (2003).
110. Cornu, M. *et al.* Glucagon-Like Peptide-1 Protects beta-cells against apoptosis by increasing the activity of an Igf-2/Igf-1 receptor autocrine loop. *Diabetes* **58**, 1816–1825 (2009).
111. Quoyer, J. *et al.* GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating bad through a β -arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 1989–2002 (2010).
112. Dumaz, N. & Marais, R. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways: Based on the Anniversary Prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J.* **272**, 3491–3504 (2005).
113. Song, W. J. *et al.* Snapin mediates incretin action and augments glucose-dependent insulin secretion. *Cell Metab.* **13**, 308–319 (2011).
114. Kirschner, L. S., Yin, Z., Jones, G. N. & Mahoney, E. Mouse models of altered protein kinase A signaling. *Endocr. Relat. Cancer* **16**, 773–793 (2009).
115. Jhala, U. S. *et al.* cAMP promotes pancreatic β -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2 service cAMP promotes pancreatic β -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. 1575–1580 (2003). doi:10.1101/gad.1097103

116. Blanchet, E. *et al.* Feedback Inhibition of CREB Signaling Promotes Beta Cell Dysfunction in Insulin Resistance. *Cell Rep.* **10**, (2015).
117. Song, W. J. *et al.* Exendin-4 stimulation of cyclin A2 in β -cell proliferation. *Diabetes* **57**, 2371–2381 (2008).
118. Mayr, B. & Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 599–609 (2001).
119. Kim, S.-J., Nian, C., Widenmaier, S. & McIntosh, C. H. S. Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide-Mediated Up-Regulation of β -Cell Antiapoptotic Bcl-2 Gene Expression Is Coordinated by Cyclic AMP (cAMP) Response Element Binding Protein (CREB) and cAMP-Responsive CREB Coactivator 2. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1644–1656 (2008).
120. Dalle, S., Burcelin, R. & Gourdy, P. Specific actions of GLP-1 receptor agonists and DPP4 inhibitors for the treatment of pancreatic β -cell impairments in type 2 diabetes. *Cell. Signal.* **25**, 570–579 (2013).
121. Dalle, S., Quoyer, J., Varin, E. & Costes, S. Roles and regulation of the transcription factor CREB in pancreatic beta -cells. *Curr. Mol. Pharmacol.* **4**, 187–195 (2011).
122. Wong, W. & Scott, J. D. AKAP signalling complexes: Focal points in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 959–970 (2004).
123. MacKenzie, S. J. *et al.* Long PDE4 cAMP specific phosphodiesterases are activated by protein kinase A-mediated phosphorylation of a single serine residue in Upstream Conserved Region 1 (UCR1). *Br. J. Pharmacol.* **136**, 421–433 (2002).
124. Sonoda, N. *et al.* β -Arrestin-1 mediates glucagon-like peptide-1 signaling to insulin secretion in cultured pancreatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 6614–6619 (2008).
125. Ma, L. & Pei, G. Beta-Arrestin Signaling and Regulation of Transcription. *J. Cell Sci.* **120**, 213–218 (2007).
126. Lefkowitz, R. J. REVIEW Transduction of Receptor Signals. *Science (80-.)*. **512**, 512–518 (2005).
127. Doyle, M. E. & Egan, J. M. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol. Ther.* **113**, 546–593 (2007).
128. Holz, G. G. Epac: A New cAMP-Binding Protein in Support of Glucagon-like Peptide-1 Receptor-Mediated Signal Transduction in the Pancreatic β -Cell. *Diabetes* **53**, 5–13 (2004).
129. Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T. & Mei, F. Epac and PKA: A tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **40**, 651–662 (2008).
130. Yang, Y. & Gillis, K. D. A Highly Ca^{2+} -sensitive Pool of Granules Is Regulated by Glucose and Protein Kinases in Insulin-secreting INS-1 Cells. *J. Gen. Physiol.* **124**, 641–651 (2004).
131. Eliasson, L. *et al.* SUR1 Regulates PKA-independent cAMP-induced Granule Priming in Mouse Pancreatic B-cells. *J. Gen. Physiol.* **121**, 181–97 (2003).
132. Perfetti, R., Zhou, J., Doyle, M. E. & Egan, J. M. Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and increases endocrine cell mass in the pancreas of old , glucose-intolerant rats. *Endocrinology* **141**, 4600–4605 (2000).
133. Ally, S. & Salomon, D. S. transformation and transforming growth factor a production in Ki-ras-transformed rat fibroblasts. **242**, 363–367 (1989).
134. McKenzie, F. R. & Pouyssegur, J. cAMP-mediated growth inhibition in fibroblasts is not mediated

- via mitogen-activated protein (MAP) kinase (ERK) inhibition. *J. Biol. Chem.* **271**, 13476–13483 (1996).
135. Grewal, S. S. *et al.* Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap-1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 34433–34441 (2000).
 136. Buscà, R. *et al.* Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO J.* **19**, 2900–2910 (2000).
 137. Kimura, T. *et al.* Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* **22**, 631–656 (2001).
 138. Xu, G., Stoffers, D. A., Habener, J. F. & Bonner-Weir, S. Exendin-4 stimulates both β -cell replication and neogenesis, resulting in increased β -cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* **48**, 2270–2276 (1999).
 139. Nie, Y. *et al.* Regulation of pancreatic PC1 and PC2 associated with increased glucagon-like peptide 1 in diabetic rats. *J. Clin. Invest.* **105**, 955–965 (2000).
 140. Tamura, K. *et al.* Liraglutide improves pancreatic beta cell mass and function in alloxan-induced diabetic mice. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).
 141. Campbell, J. E. *et al.* TCF1 links GIPR signaling to the control of beta cell function and survival. *Nat. Med.* **22**, 84–90 (2016).
 142. Hansotia, T. *et al.* Double Incretin Receptor Knockout (DIRKO) Mice Reveal an Essential Role for the Enteroinsular Axis in Transducing the Glucoregulatory Actions of DPP-IV Inhibitors. *Diabetes* **53**, 1326–1335 (2004).
 143. Xie, T., Chen, M., Zhang, Q.-H., Ma, Z. & Weinstein, L. S. Beta cell-specific deficiency of the stimulatory G protein alpha-subunit G α leads to reduced beta cell mass and insulin-deficient diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19601–19606 (2007).
 144. Xie, T., Chen, M. & Weinstein, L. S. Pancreas-specific G α deficiency has divergent effects on pancreatic α - and β -cell proliferation. *J. Endocrinol.* **206**, 261–269 (2010).
 145. Berger, M. *et al.* G $\alpha_{i/o}$ -coupled receptor signaling restricts pancreatic β -cell expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 2888–2893 (2015).
 146. Song, W. J., Mondal, P., Li, Y., Lee, S. E. & Hussain, M. A. Pancreatic b-cell response to increased metabolic demand and to pharmacologic secretagogues requires epac2a. *Diabetes* **62**, 2796–2807 (2013).
 147. Sonoda, N. *et al.* Beta-Arrestin-1 mediates glucagon-like peptide-1 signaling to insulin secretion in cultured pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6614–9 (2008).
 148. Zhu, L. *et al.* β -Arrestin-2 is an essential regulator of pancreatic β -cell function under physiological and pathophysiological conditions. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
 149. Shin, S. *et al.* CREB mediates the insulinotropic and anti-apoptotic effects of GLP-1 signaling in adult mouse β -cells. *Mol. Metab.* **3**, 803–812 (2014).
 150. Receptors, I. *et al.* Distinct and Overlapping Functions of Insulin and. **22**, 818–835 (2014).
 151. LeRoith, D. & Roberts, C. T. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* **195**, 127–137 (2003).
 152. Broughton, S. & Partridge, L. Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and aging.

- Biochem. J.* **418**, 1–12 (2009).
153. Pollak, M. Insulin, insulin-like growth factors and neoplasia. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **22**, 625–638 (2008).
 154. Boucher, J., Kleinridders, A. & Kahn, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2014** **6**, a009191 (2014).
 155. Kim, W. *et al.* Cannabinoids inhibit insulin receptor signaling in pancreatic β -cells. *Diabetes* **60**, 1198–1209 (2011).
 156. Sen, S., Talukdar, I. & Webster, N. J. G. SRp20 and CUG-BP1 Modulate Insulin Receptor Exon 11 Alternative Splicing. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 871–880 (2009).
 157. Malakar, P. *et al.* Insulin receptor alternative splicing is regulated by insulin signaling and modulates beta cell survival. *Sci. Rep.* **6**, 1–14 (2016).
 158. Moller, D. E., Yokota, A., Caro, J. F. & Flier, J. S. Tissue-Specific Expression of Two Alternatively Spliced Insulin Receptor mRNAs in Man. *Mol. Endocrinol.* **3**, 1263–1269 (1989).
 159. Belfiore, A. *et al.* Insulin receptor isoforms in physiology and disease: An updated view. *Endocr. Rev.* **38**, 1–84 (2017).
 160. Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L. & Vigneri, R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.* **30**, 586–623 (2009).
 161. Frasca, F. *et al.* Insulin Receptor Isoform A, a Newly Recognized, High-Affinity Insulin-Like Growth Factor II Receptor in Fetal and Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3278–3288 (1999).
 162. Guillen, C., Navarro, P., Robledo, M., Valverde, A. M. & Benito, M. Differential mitogenic signaling in insulin receptor-deficient fetal pancreatic β -cells. *Endocrinology* **147**, 1959–1968 (2006).
 163. Escribano, O. *et al.* Insulin receptor isoform A confers a higher proliferative capability to pancreatic beta cells enabling glucose availability and IGF-I signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* **409**, 82–91 (2015).
 164. Leibiger, B. *et al.* Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic β cells. *Mol. Cell* **7**, 559–570 (2001).
 165. Savkur, R. S. *et al.* Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 1309–13 (2004).
 166. Horwitz, D. L., Starr, J. I., Mako, M. E., Blackard, W. G. & Rubenstein, A. H. Proinsulin, insulin and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood. *J. Clin. Invest.* **55**, 1278–1283 (1975).
 167. Malaguamera, R. *et al.* Proinsulin binds with high affinity the insulin receptor isoform a and predominantly activates the mitogenic pathway. *Endocrinology* **153**, 2152–2163 (2012).
 168. Pollak, M. The insulin receptor/insulin-like growth factor receptor family as a therapeutic target in oncology. *Clin. Cancer Res.* **18**, 40–50 (2012).
 169. Pierre, A. & Froment, P. The Insulin-like Growth Factor Axis in Cell Cycle Progression. 740–750 (2003).
 170. Samani, A. A., Yakar, S., LeRoith, D. & Brodt, P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: Overview and recent insights. *Endocr. Rev.* **28**, 20–47 (2007).

171. Gallagher, E. J. & LeRoith, D. The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 610–618 (2010).
172. Fernandez-Ruiz, R., Vieira, E., Garcia-Roves, P. M. & Gomis, R. Protein tyrosine phosphatase-1B modulates pancreatic β -cell mass. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
173. Kulkarni, R. N. *et al.* Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic β cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* **96**, 329–339 (1999).
174. Okada, T. *et al.* Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8977–8982 (2007).
175. Kulkarni, R. N. *et al.* β -cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter β -cell mass. *Nat. Genet.* **31**, 111–115 (2002).
176. Leroux, L. *et al.* a Null Mutation for Ins1 or Ins2. 150–153 (2000).
177. Duvill  , B. *et al.* and Greater Vascularization Leading to β -Cell Hyperplasia in Mutant Mice Lacking Insulin. *Access* **143**, 1530–1537 (2002).
178. Otani, K. Reduced β -cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in IRKO mice. *AJP Endocrinol. Metab.* **286**, 41E–49 (2003).
179. Withers, D. J. *et al.* Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat. Genet.* **23**, 32–40 (1999).
180. Robertson, K. *et al.* A general and islet cell-enriched overexpression of IGF-I results in normal islet cell growth, hypoglycemia, and significant resistance to experimental diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E928–938 (2008).
181. Ueki, K. *et al.* Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic β cells causes overt diabetes. *Nat. Genet.* **38**, 583–588 (2006).
182. Withers, D. J. *et al.* Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **391**, 900–904 (1998).
183. Bernal-Mizrachi, E. *et al.* Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells. *J. Clin. Invest.* **114**, 928–36 (2004).
184. Tuttle, R. L. *et al.* Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat. Med.* **7**, 1133–1137 (2001).
185. Onengut-gumuscu, S., Buckner, J. H. & Concannon, P. Original Article. *October* **55**, 2883–2889 (2006).
186. Stiles, B. L. *et al.* Selective Deletion of Pten in Pancreatic β Cells Leads to Increased Islet Mass and Resistance to STZ-Induced Diabetes Selective Deletion of Pten in Pancreatic β Cells Leads to Increased Islet Mass and Resistance to STZ-Induced Diabetes †. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2772–2781 (2006).
187. Hashimoto, N. *et al.* Ablation of PDK1 in pancreatic β cells induces diabetes as a result of loss of β cell mass. *Nat. Genet.* **38**, 589–593 (2006).
188. Zha, J. & Lackner, M. R. Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2512–2517 (2010).
189. Buteau, J., Spatz, M. L. & Accili, D. Transcription factor FoxO1 mediates glucagon-like peptide-1

- effects on pancreatic β -cell mass. *Diabetes* **55**, 1190–1196 (2006).
190. Liu, Z., Tanabe, K., Bernal-Mizrachi, E. & Permutt, M. A. Mice with beta cell overexpression of glycogen synthase kinase-3 β have reduced beta cell mass and proliferation. *Diabetologia* **51**, 623–631 (2008).
 191. Blandino-Rosano, M. *et al.* mTORC1 signaling and regulation of pancreatic β -cell mass. *Cell Cycle* **11**, 1892–902 (2012).
 192. Ruvinsky, I. *et al.* Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* **19**, 2199–2211 (2005).
 193. Gu, Y., Lindner, J., Kumar, A., Yuan, W. & Magnuson, M. A. Rictor/mTORC2 is essential for maintaining a balance between β -cell proliferation and cell size. *Diabetes* **60**, 827–837 (2011).
 194. Huang, J. & Manning, B. D. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem. J.* **412**, 179–190 (2008).
 195. Yuan, T., Lupse, B., Maedler, K. & Ardestani, A. mTORC2 Signaling: A Path for Pancreatic β -Cell's growth and function. *J. Mol. Biol.* #pagerange# (2018). doi:10.1016/j.jmb.2018.02.013
 196. Chamberlain, C. E. *et al.* Menin determines K-RAS proliferative outputs in endocrine cells. *J. Clin. Invest.* **124**, 1–3 (2014).
 197. Cornu, M. *et al.* Glucagon-like peptide-1 increases β -cell glucose competence and proliferation by translational induction of insulin-like growth factor-1 receptor expression. *J. Biol. Chem.* **285**, 10538–10545 (2010).
 198. Lamont, B. J. *et al.* Pancreatic GLP-1 receptor activation is sufficient for incretin control of glucose metabolism in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 388–402 (2012).
 199. Liu, W., Chin-Chance, C., Lee, E. J. & Lowe Jr., W. L. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase contributes to insulin-like growth factor I-mediated inhibition of pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* **143**, 3802–3812 (2002).
 200. Wang, Q. & Jin, T. The role of insulin signaling in the development of β -cell dysfunction and diabetes. *Islets* **1**, 95–101 (2009).
 201. Liu, P., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. A Highly Efficient Recombineering-Based Method for Generating Conditional Knockout Mutations.
 202. Postic, C. *et al.* Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic b cell-specific gene knock-outs using cre recombinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 305–315 (1999).
 203. Chen, M. *et al.* Increased glucose tolerance and reduced adiposity in the absence of fasting hypoglycemia in mice with liver-specific Gsa deficiency. *J. Clin. Invest.* **115**, 3217–3227 (2005).
 204. Thorens, B. *et al.* Ins1 Cre knock-in mice for beta cell-specific gene recombination. *Diabetologia* **58**, 558–565 (2014).
 205. Lee, J. Y. *et al.* RIP-Cre revisited, evidence for impairments of pancreatic b-cell function. *J. Biol. Chem.* **281**, 2649–2653 (2006).
 206. Hay, C. W. & Docherty, K. Comparative analysis of insulin gene promoters: Implications for diabetes research. *Diabetes* **55**, 3201–3213 (2006).
 207. Rajan, S. *et al.* Chronic hyperglycemia downregulates GLP-1 receptor signaling in pancreatic β -cells via protein kinase A. *Mol. Metab.* **4**, 265–276 (2015).

208. Abrahamsen, N. & Nishimura, E. Regulation of glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger ribonucleic acid expression in cultured rat pancreatic islets by glucose, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glucocorticoids. *Endocrinology* **136**, 1572–8 (1995).
209. Xu, G. *et al.* Original Article. *Diabetes* **56**, 1551–1558 (2007).
210. Chen, H. *et al.* PDGF signalling controls age-dependent proliferation in pancreatic β -cells. *Nature* **478**, 349–355 (2011).
211. Miettinen, P., Ormio, P., Hakonen, E., Banerjee, M. & Otonkoski, T. EGF receptor in pancreatic beta-cell mass regulation. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 280–5 (2008).
212. Oh, Y. S., Shin, S., Lee, Y. J., Kim, E. H. & Jun, H. S. Betacellulin-induced beta cell proliferation and regeneration is mediated by activation of ErbB-1 and ErbB-2 receptors. *PLoS One* **6**, (2011).
213. Okada, T. *et al.* Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8977–8982 (2007).
214. Wittenberg, A. D. *et al.* Phosphorylated ribosomal protein S6 is required for Akt-driven hyperplasia and malignant transformation, but not for hypertrophy, aneuploidy and hyperfunction of pancreatic β -cells. *PLoS One* **11**, (2016).
215. Visa, M. *et al.* Islet amyloid polypeptide exerts a novel autocrine action in β -cell signaling and proliferation. *FASEB J.* (2015). doi:10.1096/fj.15-270553
216. Poitout, V. *et al.* Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J. Nutr.* **136**, 873–6 (2006).
217. Doyle, M. E. & Egan, J. M. Mechanisms of Action of GLP-1 in the Pancreas. *Diabetes* **113**, 546–593 (2008).
218. Ansarullah *et al.* Activation of GPR119 Stimulates Human β -Cell Replication and Neogenesis in Humanized Mice with Functional Human Islets. *J. Diabetes Res.* **2016**, e1620821 (2016).
219. Gao, J. *et al.* Stimulating beta cell replication and improving islet graft function by GPR119 agonists. *Transpl. Int.* **24**, 1124–1134 (2011).
220. Gedulin, B. K. *et al.* Exenatide (exendin-4) improves insulin sensitivity and β -cell mass in insulin-resistant obese *fafa* Zucker rats independent of glycemia and body weight. *Endocrinology* **146**, 2069–2076 (2005).
221. Park, S. *et al.* Exendin-4 uses Irs2 signaling to mediate pancreatic β cell growth and function. *J. Biol. Chem.* **281**, 1159–1168 (2006).
222. Tian, L. *et al.* Comparison of exendin-4 on beta-cell replication in mouse and human islet grafts. *Transpl. Int.* **24**, 856–864 (2011).
223. Rondas, D., D'Hertog, W., Overbergh, L. & Mathieu, C. Glucagon-like peptide-1: Modulator of β -cell dysfunction and death. *Diabetes, Obes. Metab.* **15**, 185–192 (2013).
224. Li, L., El-Kholy, W., Rhodes, C. J. & Brubaker, P. L. Glucagon-like peptide-1 protects beta cells from cytokine-induced apoptosis and necrosis: Role of protein kinase B. *Diabetologia* **48**, 1339–1349 (2005).
225. Li, Y. *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates β cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 471–478 (2003).
226. Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V., Sussel, L. & Accili, D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a

- mechanism of diabetic β cell failure. *Cell* **150**, 1223–1234 (2012).
227. Nishimura, W., Takahashi, S. & Yasuda, K. MafA is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice. *Diabetologia* **58**, 566–574 (2014).
228. Vanderford, N. L. & Vanderford, N. L. Regulation of β -cell-specific and glucose-dependent MafA expression and its role in diabetes. *Diabetologia* **2014**, 1–4 (2014).
229. Iwaoka, R. & Kataoka, K. Glucose regulates MafA transcription factor abundance and insulin gene expression by inhibiting AMP-activated protein kinase in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* **293**, 3524–3534 (2018).
230. Blanchet, E. *et al.* Feedback inhibition of CREB signaling promotes beta cell dysfunction in insulin resistance. *Cell Rep.* **10**, 1149–57 (2015).
231. Beith, J. L., Alejandro, E. U. & Johnson, J. D. Insulin stimulates primary β -cell proliferation via Raf-1 kinase. *Endocrinology* **149**, 2251–2260 (2008).
232. Otani, K. *et al.* Reduced beta-cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in beta1RKO mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **286**, E41-9 (2004).
233. Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471–484 (2006).
234. Hengstschlager, M. *et al.* Tuberous sclerosis gene products in proliferation control. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **488**, 233–239 (2001).

ABREVIATURES

ADP	Adenosina difosfat
ADN	Àcid desoxiribonucleic
Akap 11	Proteïna quinasa-A d'ancoratge 11
Akap 12	Proteïna quinasa-A d'ancoratge 11
Akt/PKB	Proteïna quinasa B
AMPc	Adenosina monofosfat cíclic
AMPK	Proteïna quinasa activada per AMP
ATP	Adenosina trifosfat
AUC	Àrea sota la corba
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BrdU	Bromodeoxiuridina
β-Gsα KO	Ratolí deficient per Gsα en cèl·lula β
BSA	Albúmina de sèrum boví
CaMK	Proteïna quinasa dependent de calci/calmodulina
Ccna2	Ciclina A2
Ccnb1	Ciclina B1
Ccnd1	Ciclina D1
Ccnd2	Ciclina D2
Cdk	Quinasa dependent de ciclina
CDKI	Inhibidor de la quinasa dependent de ciclina
Cdkn1a	Inhibidor de la quinasa dependent de ciclina 1A
cDNA	ADN complementari
ChREBP	Proteïna d'unió a elements de resposta a carbohidrats
CoA	Coenzim A
Cre	Recombinasa causa recombinació
Creb	Element de resposta a l'AMP
Ct	Control
DICS	Cèl·lules d'illots dissociades
DMEM	Medi Dubbleco's Modified Eagle
DM1	Diabetis Mellitus 1
DM2	Diabetis Mellitus 2
DPP-4	Peptidasa dipeptidil-4
EDTA	Àcid etilediaminatetracètic
EGF	Factor de creixement epidèrmic
EGFR	Receptor del factor de creixement epidèrmic
eIF2	Subunitat del factor d'inici de la traducció 2
ELISA	Assaig d'immunoabsorbància enzimàtic

ER	Reticle endoplasmàtic
ErbB3	Receptor tirosina quinasa 3 d'Erb-b2
Erk	Quinasa regulada per senyals extracel·lulars
FACS	Selecció de cèl·lules activades per fluorescència
FBS	Sèrum boví fetal
FGF	Factor de creixement de fibroblasts
FoxM1	<i>Forkhead box protein M1</i>
FoxO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
Gcg	Glucagó
Gcgr	Receptor de glucagó
Gck	Glucocinasa
GH	Hormona del creixement
Ghrl	Ghrelina
Gα	Subunitat de la proteïna G alfa inhibidora
Gip	Polipèptid inhibidor gàstric
Gipr	Receptor del polipèptid inhibidor gàstric
Glp1	Pèptid similar al glucagó
Glp1r	Receptor del pèptid similar al glucagó
GLUT	Transportador de glucosa
GPCR	Receptor acoblat a proteïna G
Gsα	Subunitat de la proteïna G α estimuladora
GWAS	Estudi d'associació del genoma complet
HBKR	Tampó-Hepes amb solució Krebs-Ringer
HBSS	Solució de Hanks salina equilibrada
HRP	Peroxidasa <i>horseradish</i>
IAPP	Polipèptid amiloide de l'illot
Igf1	Factor de creixement de la insulina 1
Igf2	Factor de creixement de la insulina 2
Igf1r	Receptor del factor de creixement de la insulina 1
Igf2r	Receptor del factor de creixement de la insulina 1
IGF2BP2	Proteïna d'unió 2 al factor de creixement 2 de la insulina
INK4	Inhibidors de CDK4
Ins	Insulina
INS-1	Línia cel·lular β de rata
Ins1/Ins2	Insulina1/Insulina2
Insr	Receptor de la insulina
Insr-A	Receptor de la insulina A

Insr-B	Receptor de la insulina B
IpGTT	Test de tolerància a la glucosa intraperitoneal
Irs	Substrat del receptor de la insulina
Irs 1	Substrat del receptor de la insulina 1
Irs 2	Substrat del receptor de la insulina 2
ITT	Test de tolerància a la insulina
Ki67	Antigen Ki-67
KO	<i>Knock-out</i>
LoxP	Locus de X sobre P1
M	Molar
Mafa	<i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family protein A</i>
MAPK	Proteïna quinasa activada per mitògens
Mek	Quinasa MAPK/ERK
MODY	Diabetis en persones joves
mRNA	Missatger de l'RNA
mTOR	Diana sensible a rapamicina en mamífers
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótida fosfat
NeuroD1	Diferenciador neurogènic 1
NFAT	Factor nuclear de cèl·lules T activades
Ngn3	Neurogenina 3
Nkx6.1	Proteïna NK6 homebox 1
nM	Nanomolar
Opt	Tomografia de projecció òptica
p-Akt	Akt fosforilada
p-Creb	Creb fosforilat
p-Erk	Erk fosforilat
PBS	Solució salina tamponada amb fosfats
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
Pcsk1/3	Proteïna convertasa 1/3
Pcsk2	Proteïna convertasa 2
PDGF	Factor de creixement derivat de plaquetes
Pdgfra	Receptor del factor de creixement derivat de plaquetes A
Pdgfrb	Receptor del factor de creixement derivat de plaquetes B
PDK1	Isoenzim de la quinasa lipoamida 1 piruvat deshidrogenasa
Pdx1	Homeobox pancreàtic i duodenal 1
PFA	Paraformaldehid

p-Insr	Receptor de la insulina fosforilat
PI3K	Quinasa fosfatidilinositol-4,5-bifosfat
PKA	Proteïna quinasa A
PKC	Proteïna quinasa B
PP	Polipèptid pancreàtic
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
pRB	Proteïna del retinoblastoma
Prkaca1	Proteïna quinasa alfa de la subunitat catalítica activada per AMPc
Prkarb1	Proteïna quinasa alfa de la subunitat reguladora activada per AMPc
PTEN	Homòleg fosfatasa i tensina
PTP1B	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1</i>
PVDF	Difluorur de polivinilidè
Raf	Serina RAF proto-oncògen/treonina-proteïna quinasa
Ras	Proteïna del sarcoma de rata
Rassf1a	Membre de la família del domini d'associació 1
Rip	Promotor de la insulina de rata
RNA	Àcid ribonucleic
ROS	Espècies reactives d'oxigen
rpm	Revolucions per minut
RPMI	Institut Roswell Park Memorial
RT-PCR	Reacció de la polimerasa en cadena a temps real
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SEM	Error estàndard de la mitjana
TBP	Proteïna d'unió tata
TCEP	Tris (2-carboxietil) fosfina
TDLB	Tampó de lisis amb triple detergent
Tgfβ	Factor de creixement transformador beta
Tris	Tris(hidroximetil)aminometà
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end labeling
WB	Western blot
Wnt	<i>Wingless</i>
YFP	Proteïna fluorescent groga

