Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

GLI EFFETTI DEGLI AGONISTI DEL RECETTORE DEL GLP-1 NEL TESSUTO ADIPOSO

Giulia Cantini, PhD

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche "Mario Serio"
Università Di Firenze

LE INCRETINE

Cellule L (ileum)

GLP-1

H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E

7 10 15 20 25

G R G K V L W A I F

37 35 30

Cellule K (jejunum)

GIP

Y A E G T F I S D Y S I A M D K I

K Q A L L W N V F D Q Q H

G

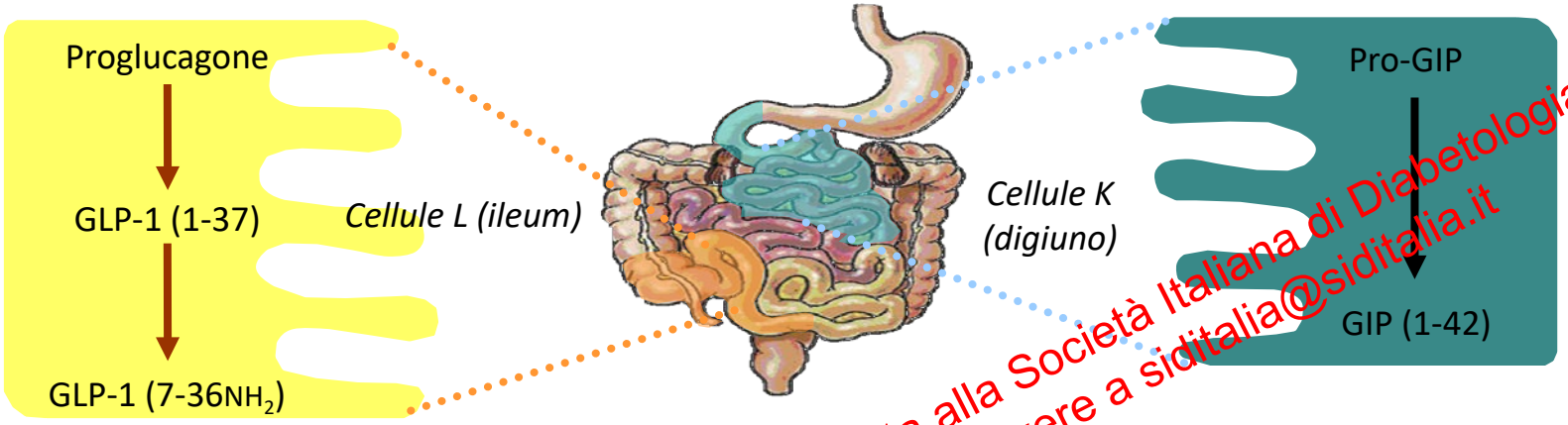
K K N D W K H N I T Q

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

L'EFFETTO INCRETINICO

GLP-1

GIP



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

pancreas

Rilascio glucosio-mediato di INSULINA

Secrezione di GLUCAGONE

Incorporazione di glucosio nel muscolo

Gluconeogenesi epatica

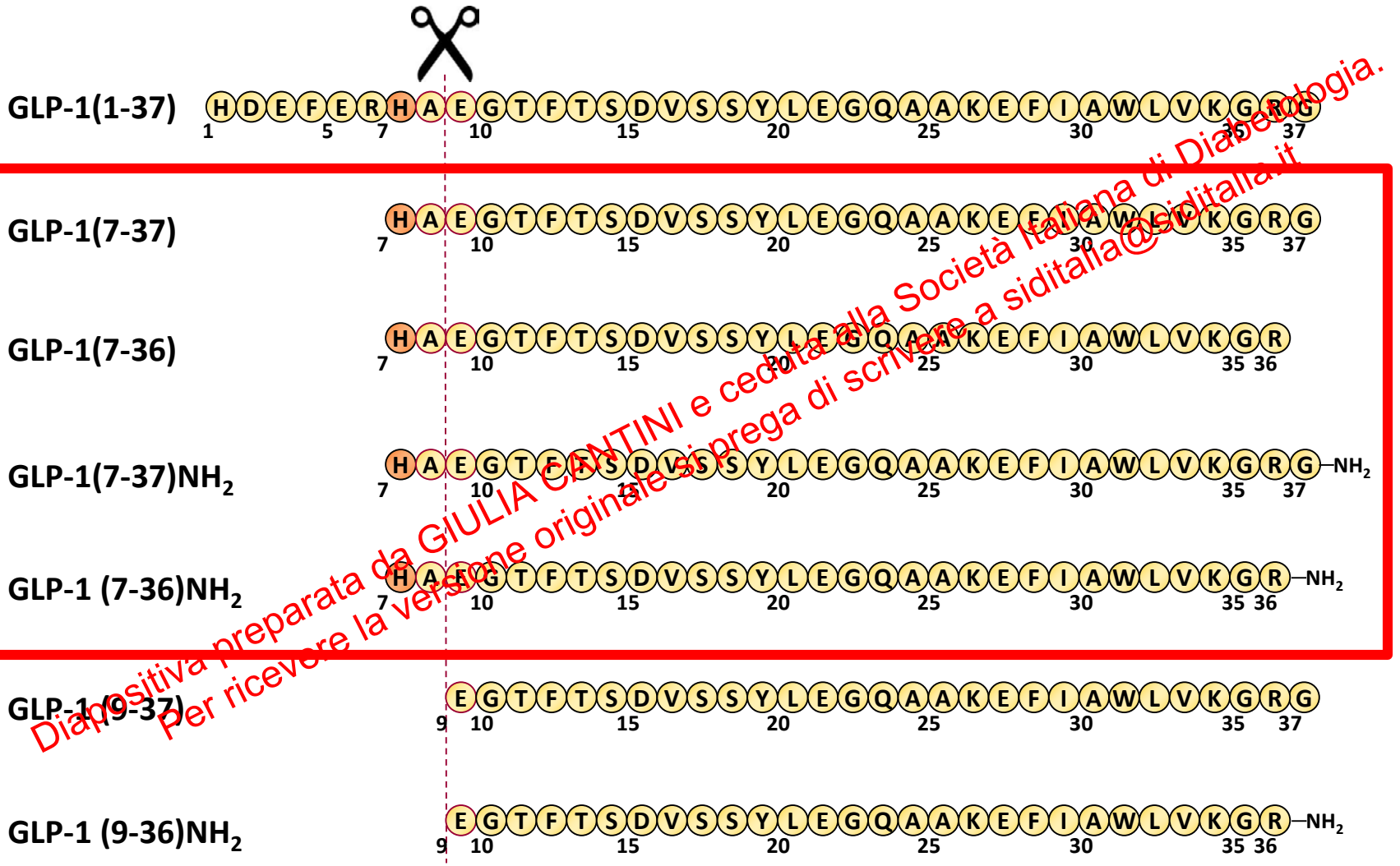
Svuotamento gastrico

MIGLIOR CONTROLLO GLICEMICO

GIP=glucose-dependent insulinotropic peptide; GLP-1=glucagon-like peptide-1

Drucker DJ. *Diabetes Care.* 2003; 26: 2929–2940.

LE DIVERSE FORME DI GLP-1



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Cantini G, Mannucci E, Luconi M. Trends in Endocrinology & Metabolism, 27:427-38, 2016.

GLUCAGON-LIKE PROTEIN 1

GLP-1 (7-36)

Emivita: 1.5-5 min

Sito di inattivazione proteolitica da parte della DPP4

GLP-1 (9-36)

Bassa affinità per il recettore del GLP-1 → **INATTIVO ?**

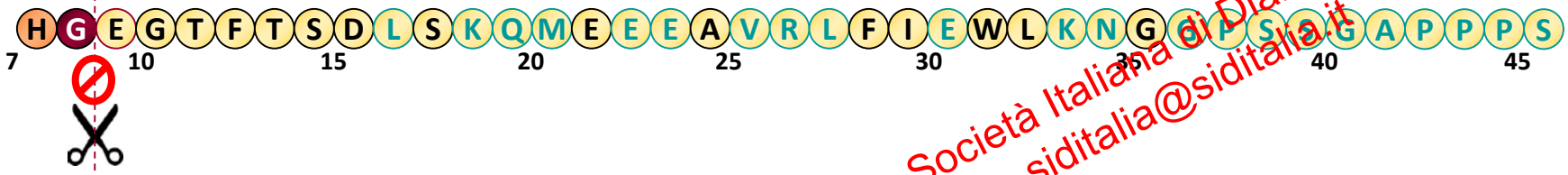
Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

I PRIMI ANALOGHI DI GLP-1

EXENATIDE

» emivita: 4-6 h s.i.

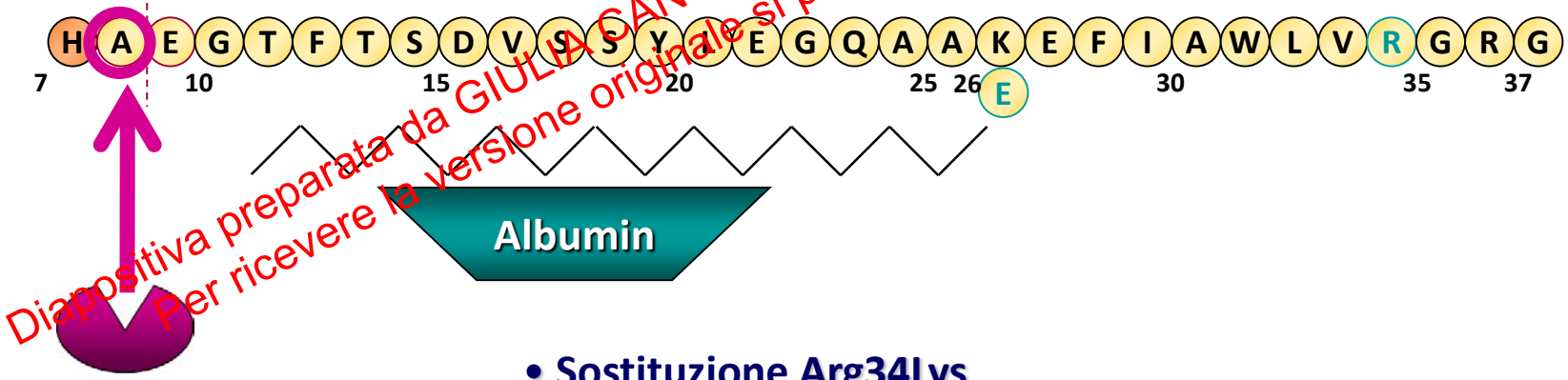
» maggiore affinità rispetto al GLP-1 (IC_{50}= 6nM vs IC_{50} >500nM)



LIRAGLUTIDE

» emivita: 10-14 h *s.i.*

» analogo del GLP-1 parzialmente DPP-4-resistente

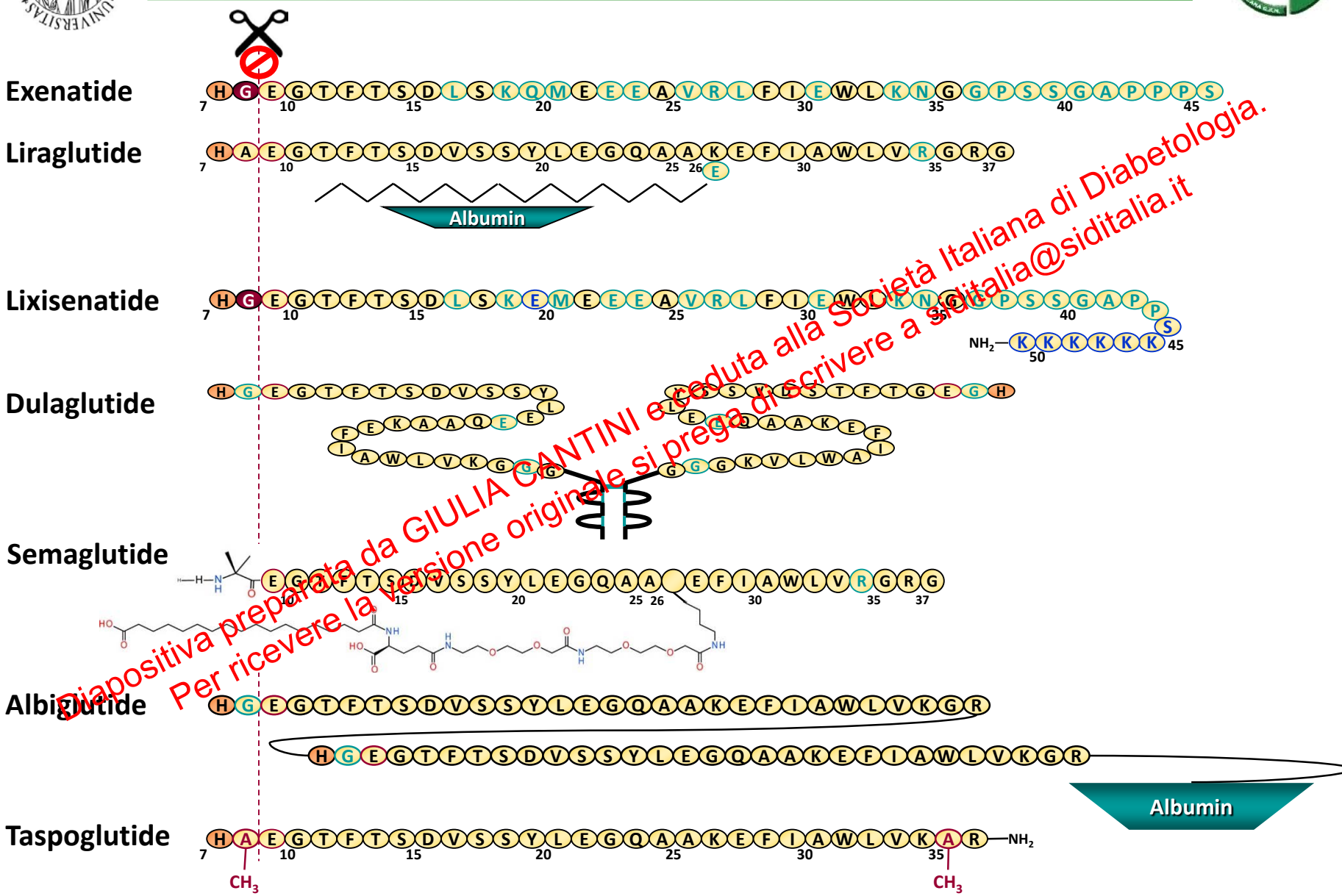


Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Sito di inattivazione proteolitica da parte della DPP4

- Sostituzione Arg34Lys
- Lys26 con acido glutamico + 16-C free-fatty-acid

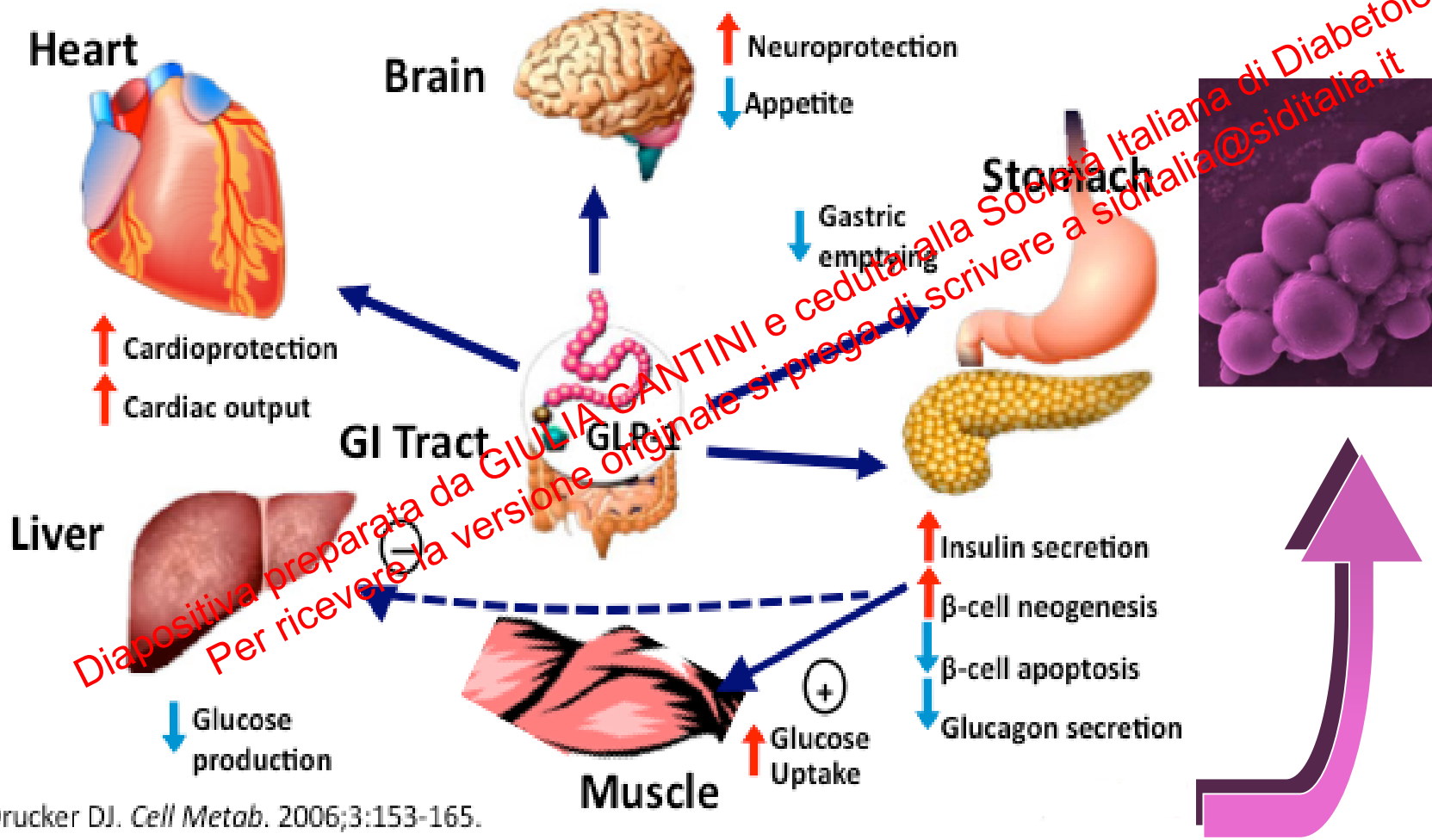
GLI AGONISTI DEL GLP-1R



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

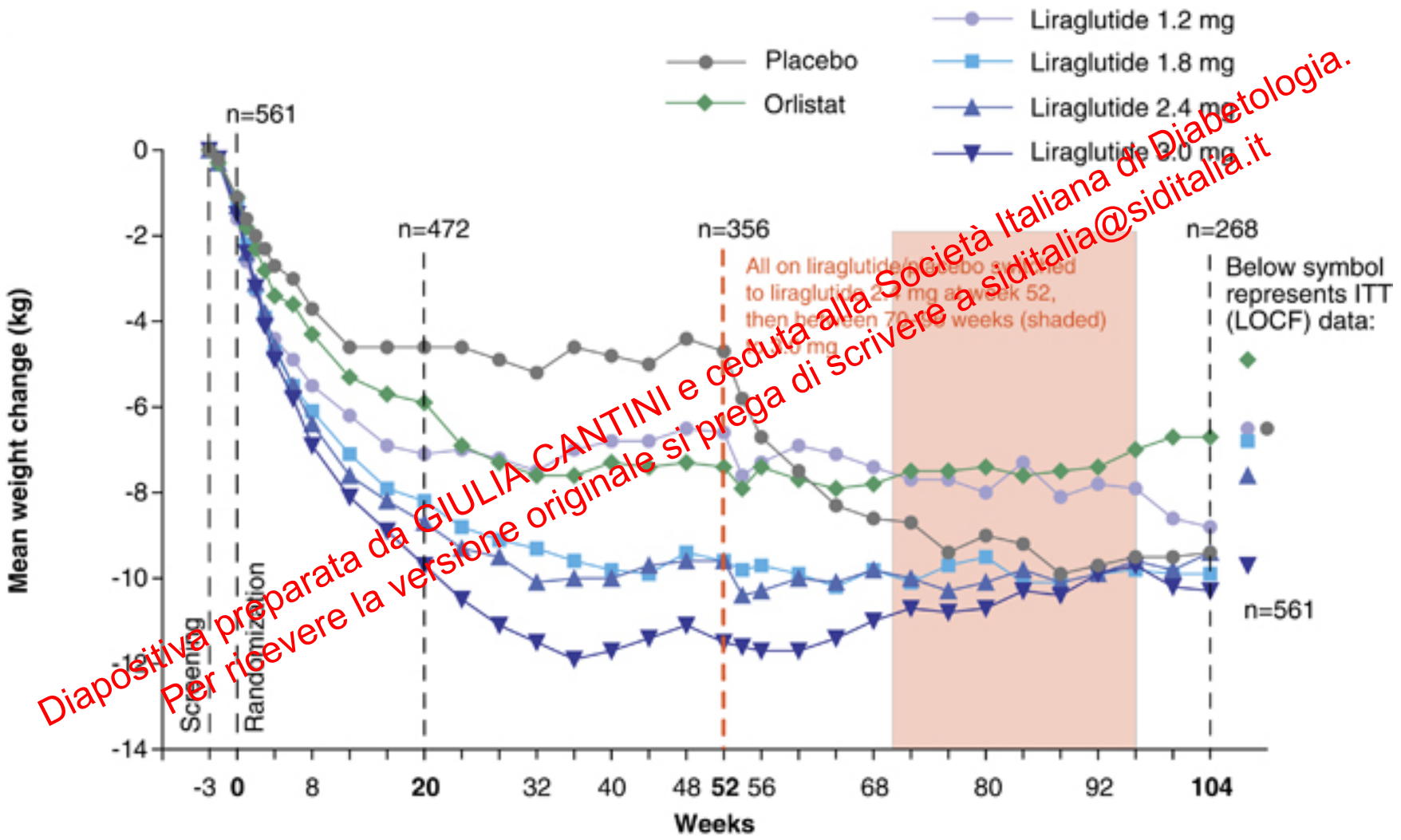
Cantini G, Mannucci E, Luconi M. Trends in Endocrinology & Metabolism, 27:427-38, 2016.

AZIONI EXTRA-PANCREATICHE DEI GLP-1RA



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

LIRAGLUTIDE E OBESITA'



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Astrup A et Al. Int J Obesity 201; 36:843-854

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812 JULY 2, 2015 VOL. 373 NO. 1

A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management

Xavier Pi-Sunyer, M.D., Arne Astrup, M.D., D.M.Sc., Ken Fujioka, M.D., Frank Greenway, M.D., Alfredo Halpern, M.D., Michel Krempf, M.D., Ph.D., David C.W. Lau, M.D., Ph.D., Carel W. le Roux, F.R.C.P., Ph.D., Rafael Violante Ortiz, M.D., Christine Bjørn Jensen, M.D., Ph.D., and John P.H. Wilding, M.D., for the SCALE Obesity and Prediabetes NN8022-1839 Study Group*

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

FDA ha approvato LIRAGLUTIDE 3.0 mg NEL TRATTAMENTO DELL'OBESITA'

Indicazioni:

- **pazienti > 30 Kg/m²**
- **pazienti 27-30 Kg/m² con almeno una complicanza legata al peso (dislipidemia, pre-diabete/DM2, ipertensione, OSAS).**

Svuotamento gastrico/senso di sazietà?

Azione centrale sul senso di appetito?

Effetto diretto sul tessuto adiposo?

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

LETTERATURA

Regulation of Adipocyte Formation by GLP-1/GLP-1R Signaling*[S]

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287, NO. 9, pp. 6421–6430, February 24, 2012
© 2012 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Published in the U.S.A.

Received for publication, October 5, 2011, and in revised form, December 18, 2011 Published, JBC Papers in Press, December 29, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.310144

Tenagne Delessa Challa[‡], Nigel Beaton[‡], Myrtha Arnold[‡], Gottfried Rudofsky[§], Wolfgang Langhans[‡], and Christian Wolfrum[‡1]

Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, directly induces adiponectin expression through protein kinase A pathway and prevents inflammatory adipokine expression

Biochemical and Biophysical Research Communications 390 (2009) 613–618

Le Thi Kim Chung[a,1], Toshio Hosaka[b,1,*], Masaki Yoshida[a], Nagakatsu Harada[a], Hiroshi Sakaue[a], Tohru Sakai[b], Yutaka Nakaya[a]

ANG[2],

Signaling and biological effects of glucagon-like peptide 1 on the differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow

C. Sanz,[1,2]* P.
[1]Departmen B
Biomedic en Re
Investigacione B
Madrid and [5]Ser

Novel Signal Transduction and Peptide Specificity of Glucagon-Like Peptide Receptor in 3T3-L1 Adipocytes

JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 172:275–283 (1997)

CHAHRZAD MONTROSE-RAFIZADEH,[1]* HUAN YANG,[1] YIHONG WANG,[1] JESSE ROTH,[2] MARSHALL H. MONTROSE,[3] AND LISA G. ADAMS[1]

Effects of glucag
activity, glucose t
adipocytes from r

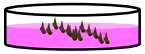
Verónica Sancho, María V Trigo, Nieves González, Isabel Valverde, Willy J Malaisse[1] and María L Villanueva-Peñacarrillo

Journal of Molecular Endocrinology (2005) **35**, 27–38

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

BIOPSIE DI TESSUTO ADIPOSO DI SOGGETTI OBESI

Disgregazione meccanica



Digestione enzimatica

Recupero pellet cellulare per centrifugazione

Filtrazione

FRAZIONE STROMALE VASCOLARE (SVF)

Piastratura

ADIPOSE STEM CELLS (ASC)

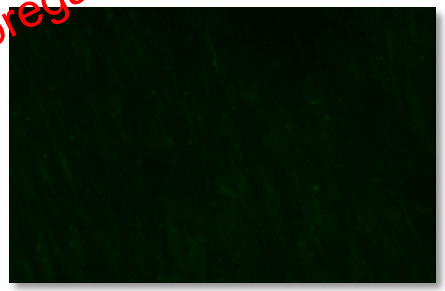
The FASEB Journal • Research Communication

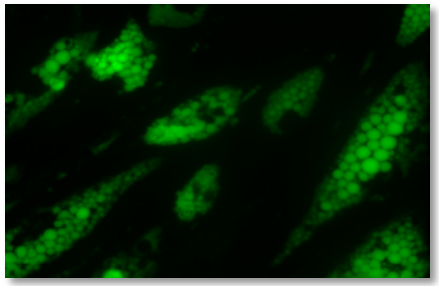
Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue

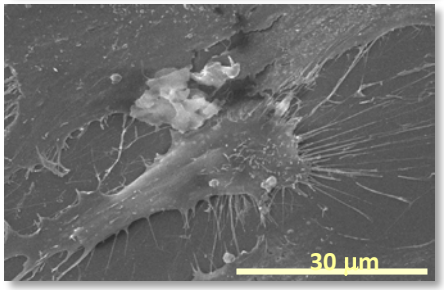
Silvana Baglioni,* Michela Francalanci,* Roberta Squecco,† Adriana Lombardi,* Giulia Cantini,* Roberta Angeli,† Stefania Gelmini,* Daniele Guasti,§ Susanna Benvenuti,* Francesco Annunziato,† Daniele Bani,§ Francesco Liotta,† Fabio Francini,‡ Giuliano Perigli,‖ Mario Serio,* and Michaela Luconi*,1

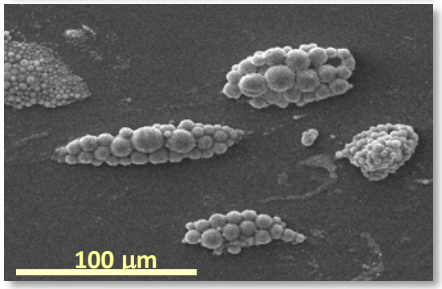
CASISTICA	ETA'	BMI (kg/m²)
13 pazienti: 5 maschi 8 femmine	55±16 (31-80)	39,4±9 (23-53,6)

ASCs → ADIPOCITI









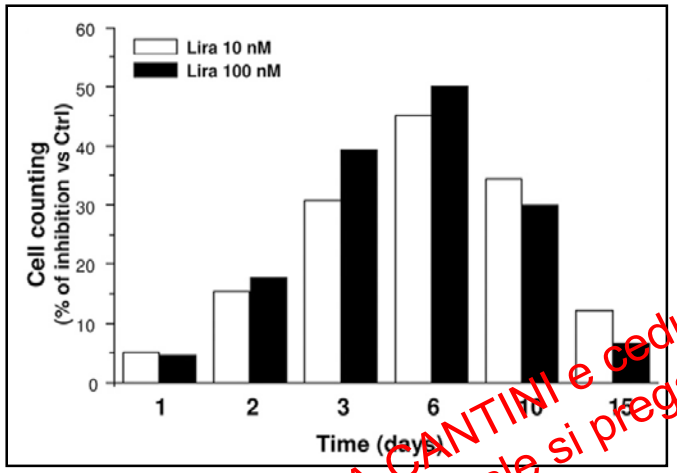
ADIPOGENESI *IN VITRO* => DIM COCKTAIL

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

EFFETTO BIOLOGICI DEL LIRAGLUTIDE

Riduzione della vitalità cellulare

CONTA CELLULARE



Max Inhib: -45%

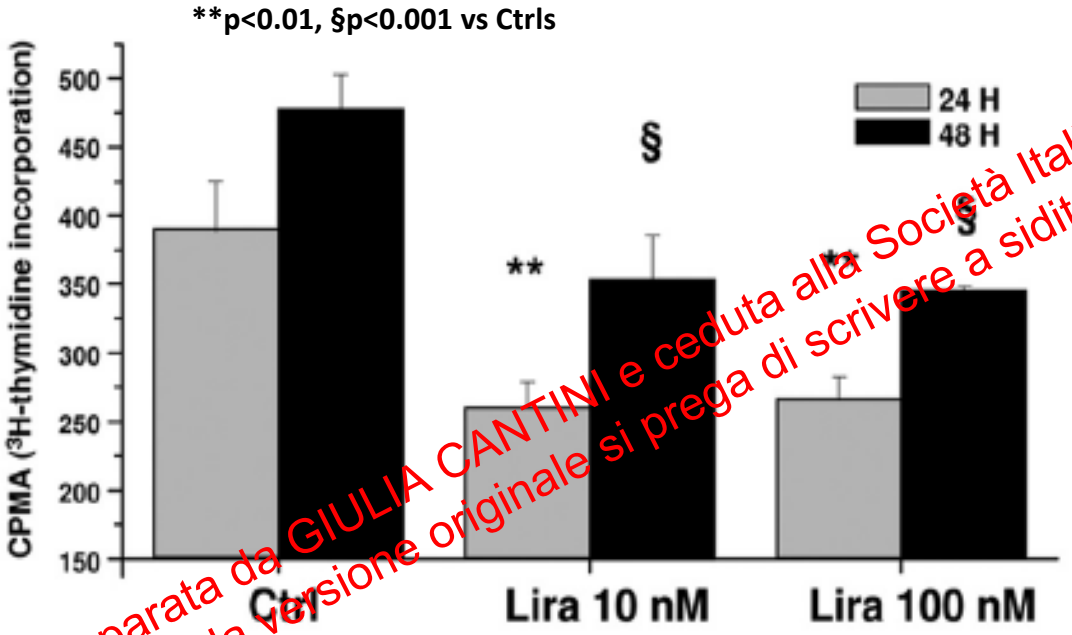
*p<0.05, **p<0.01, §p<0.001 vs Ctrls

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

EFFETTO BIOLOGICI DEL LIRAGLUTIDE

Riduzione della proliferazione cellulare

Incorporazione timidina triziata



	% inibizione Lira 10 nM	*% inibizione Lira 100 nM*
24h	33%	31%
48 h	26%	28%

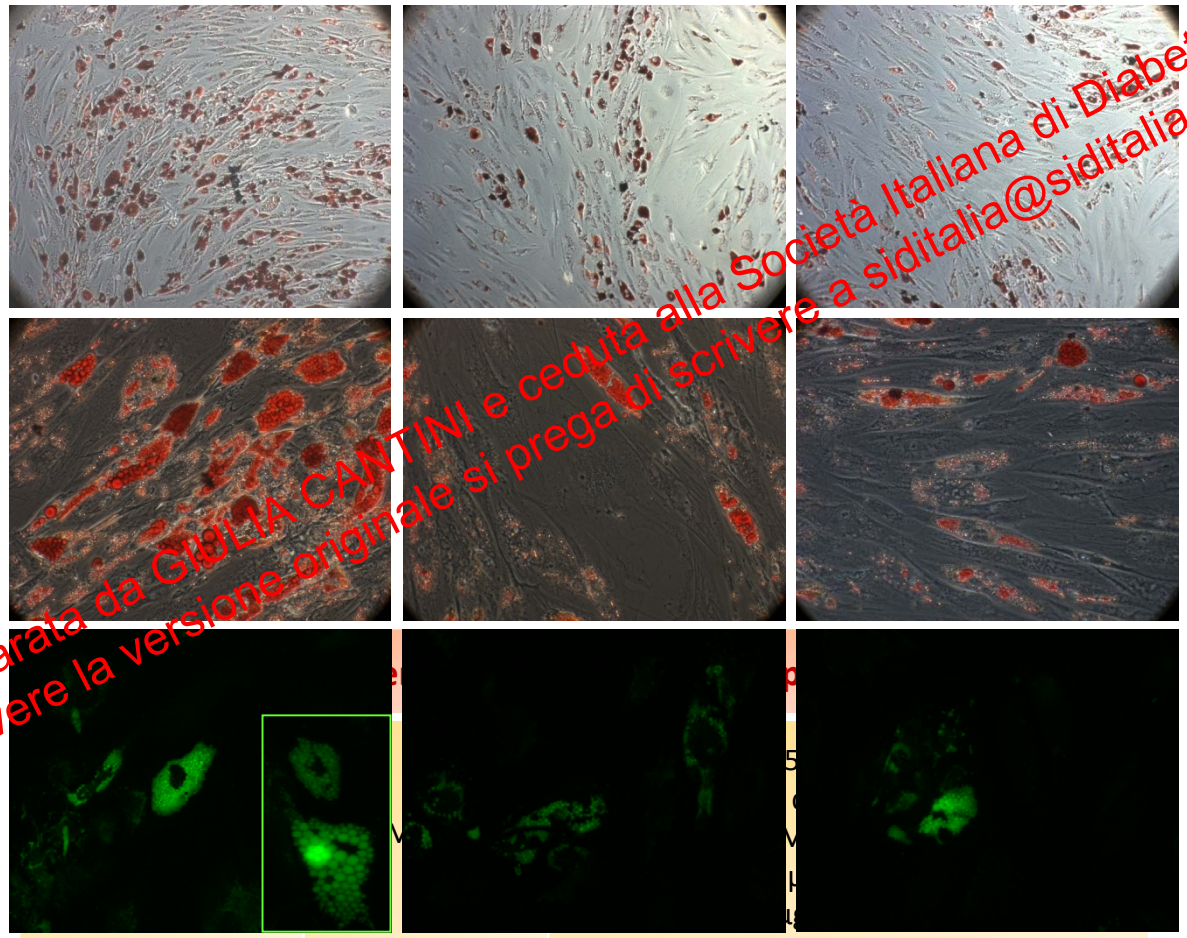
Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

LIRAGLUTIDE INIBISCE IL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE *IN VITRO*

+Lira 10 nM | +Lira 100 nM

colorazione ORO

Adiponed



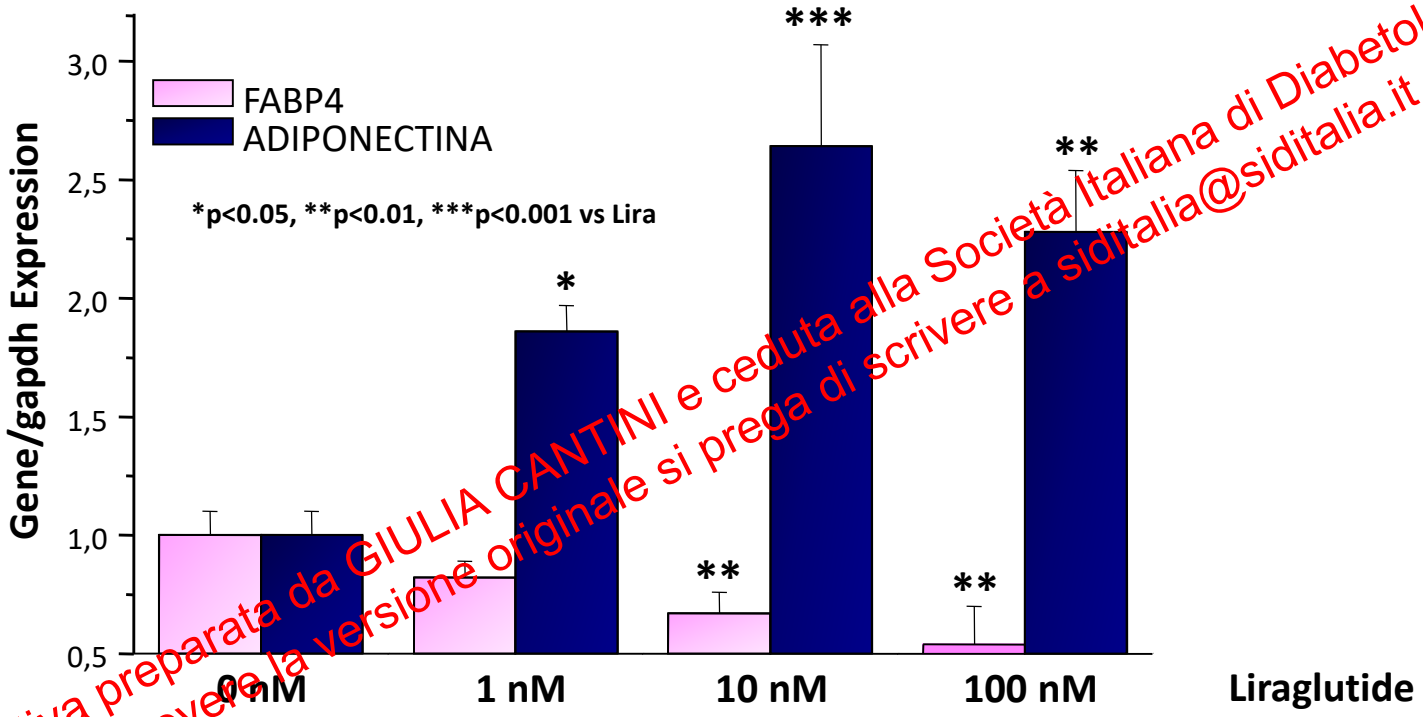
Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Ridotto accumulo gocce	**-20%**	**-18%**

Cantini, Di Franco et al, Mol Cell Endocrinol 2015

EFFETTO BIOLOGICI DEL LIRAGLUTIDE

Riduzione del differenziamento cellulare



FABP4	-28%	-33%	-46%
APN	+86%	+164%	+128%

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Cantini, Di Franco et al, Mol Cell Endocrinol 2015

CONCLUSIONI I

LIRAGLUTIDE AGISCE DIRETTAMENTE SULLA CELLULA STAMINALE ADIPOSA:

INIBIZIONE DELLA CAPACITA' PROLIFERATIVA

RIDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO

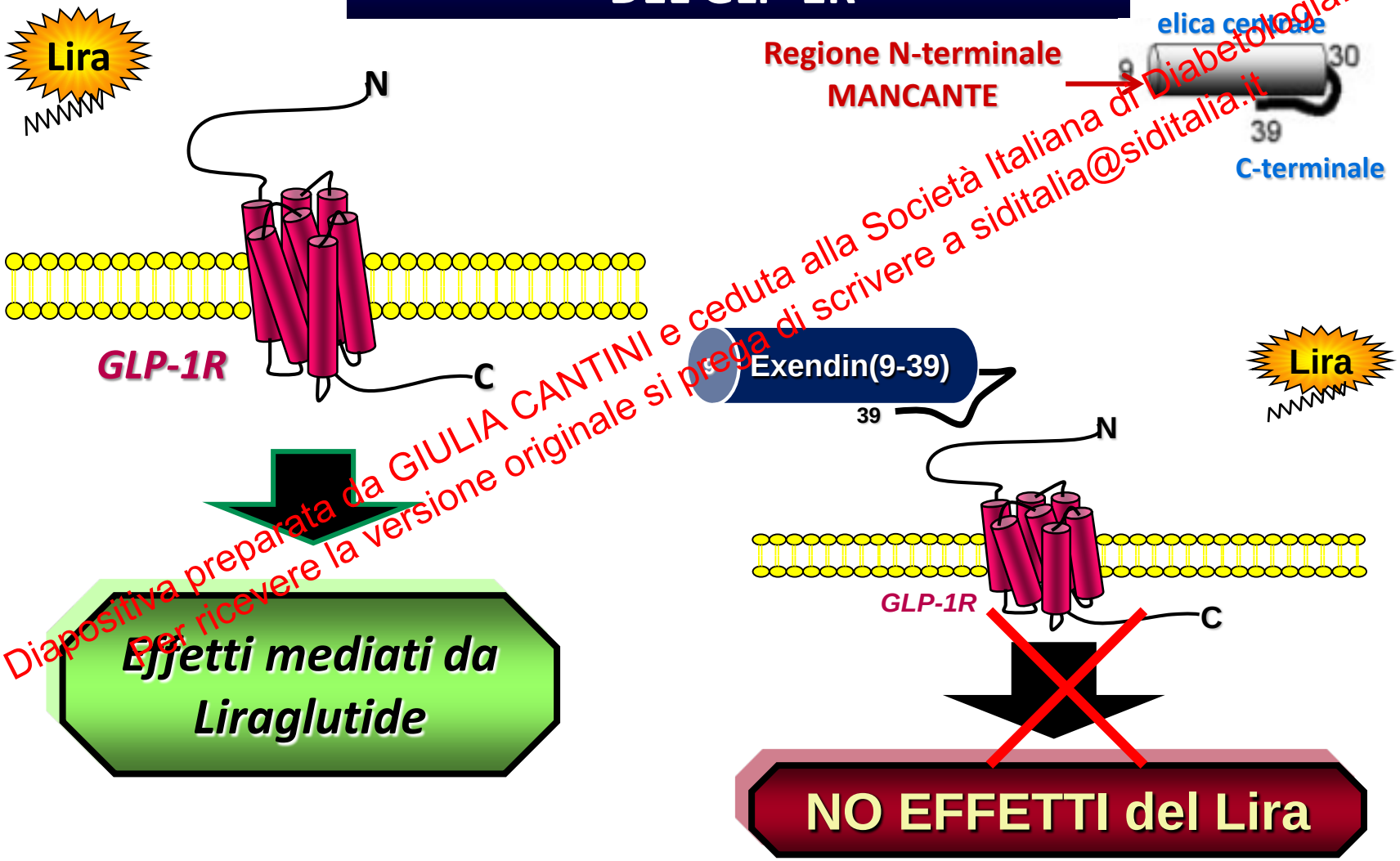
RIMODELLAMENTO ADIPOCITARIO

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Liraglutide migliora la qualità degli adipociti ottenuti in vitro

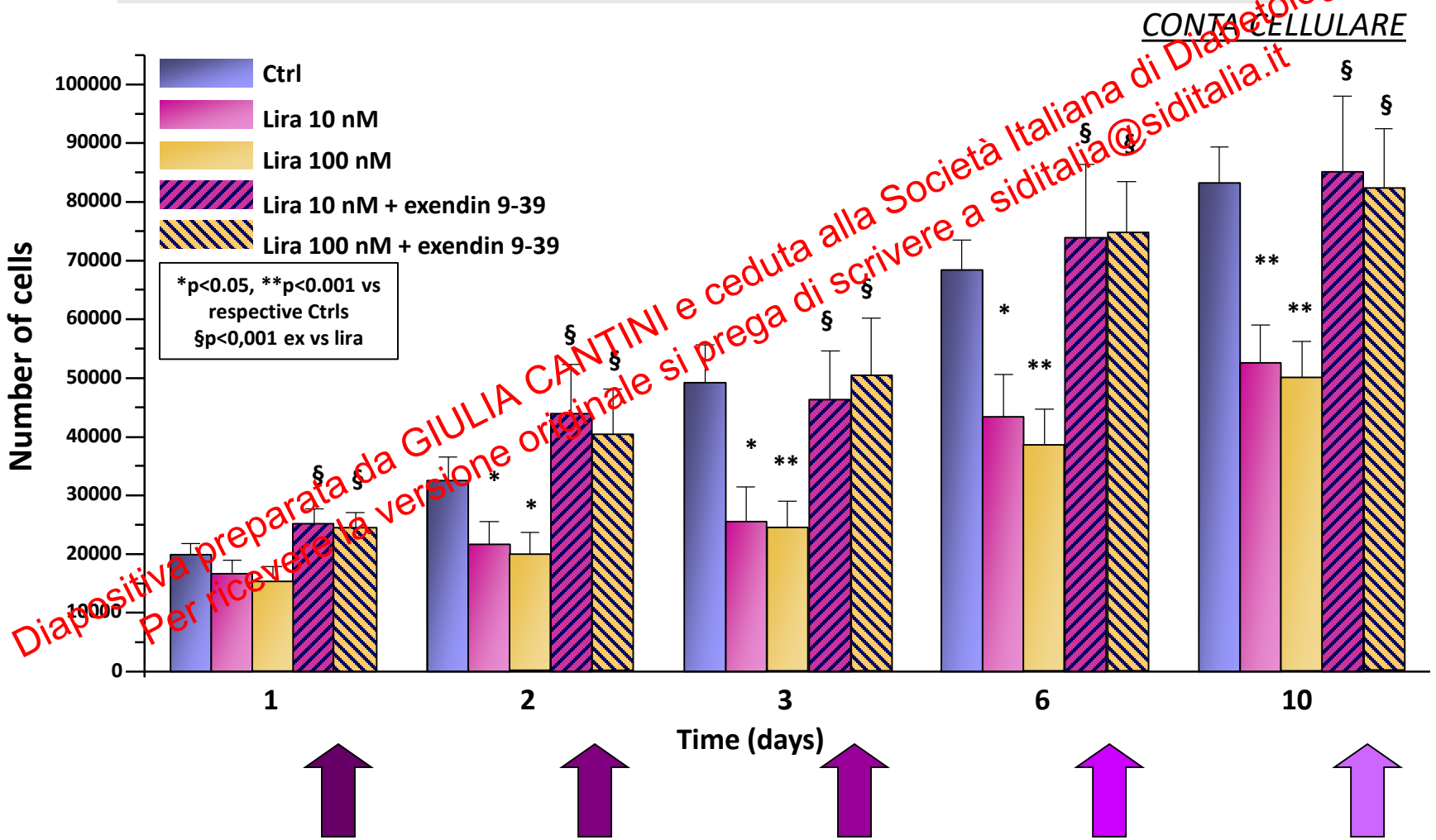
E IL MECCANISMO?

Exendin-4 (9-39) => ANTAGONISTA DEL GLP-1R



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

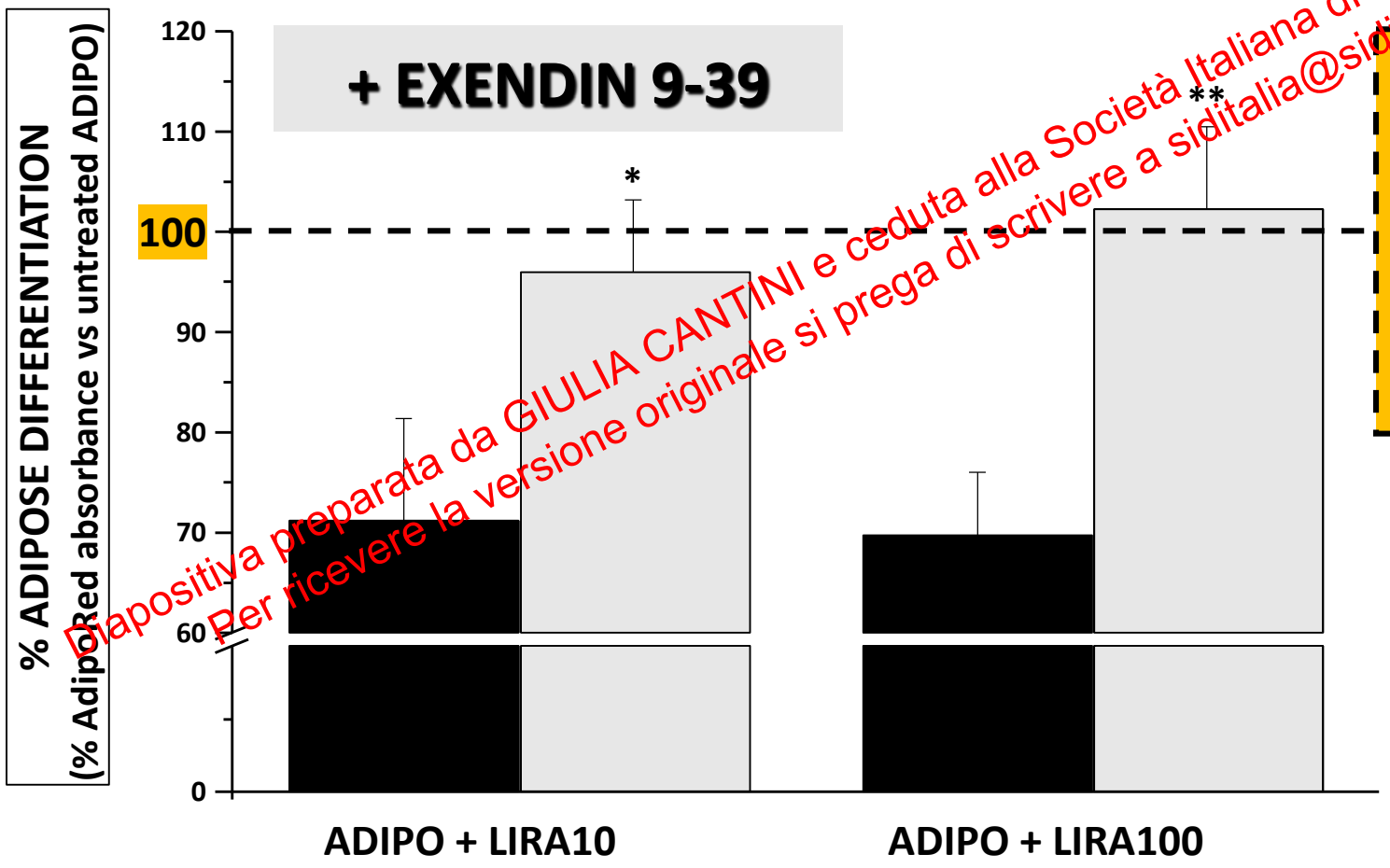
EXENDIN 9-39 REVERTE L'EFFETTO INIBITORIO DEL LIRAGLUTIDE SULLA CAPACITA' PROLIFERATIVA DELLE S-ASC



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Cantini, Di Franco et al, Mol Cell Endocrinol 2015

EXENDIN 9-39 REVERTE L'AZIONE INIBITORIA DEL LIRAGLUTIDE SUL DIFFERENZIAMENTO ADIPOCITARIO *IN VITRO*



S-ADIPO INDOTTE *IN VITRO*

↓

MEDIUM ADIPOGENICO

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Cantini, Di Franco et al, Mol Cell Endocrinol 2015

CONCLUSIONI II

LIRAGLUTIDE AGISCE SU:

1. **RIDUZIONE DELLA CAPACITA' PROLIFERATIVA**
2. **RIDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO**

L'EFFETTO INIBITORIO del LIRAGLUTIDE SULLA PROLIFERAZIONE e SUL DIFFERENZIAMENTO delle S-ASC viene REVERTITO in presenza di EXENDIN (9-39)

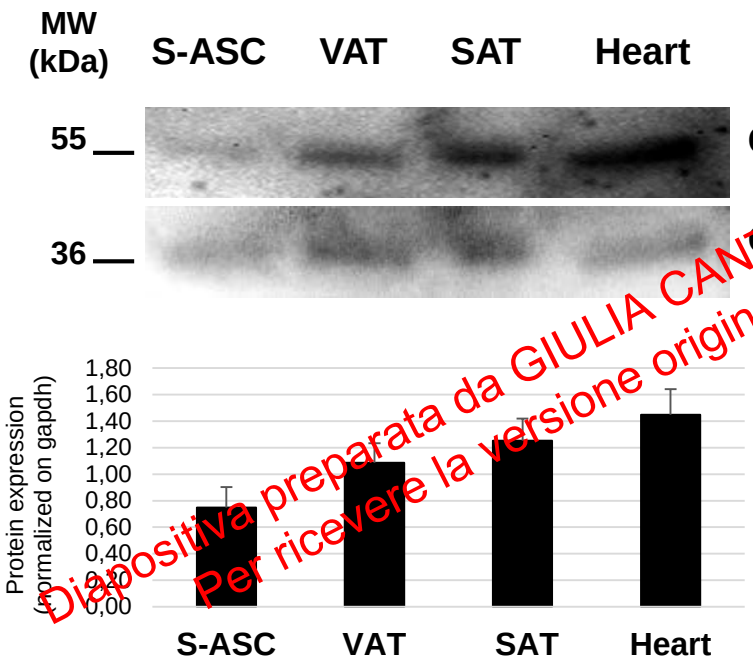
Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Meccanismo di azione del Liraglutide è mediato dal GLP-1R

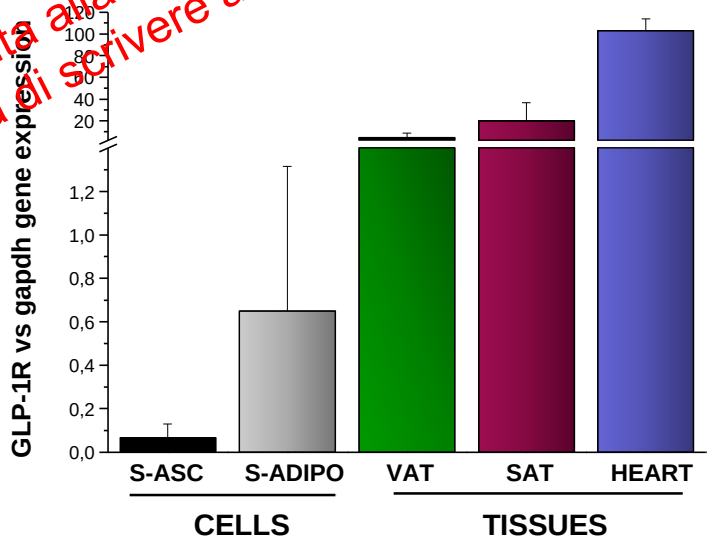
ESPRESSIONE DEL GLP-1R NEL TESSUTO ADIPOSO

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Western Blot



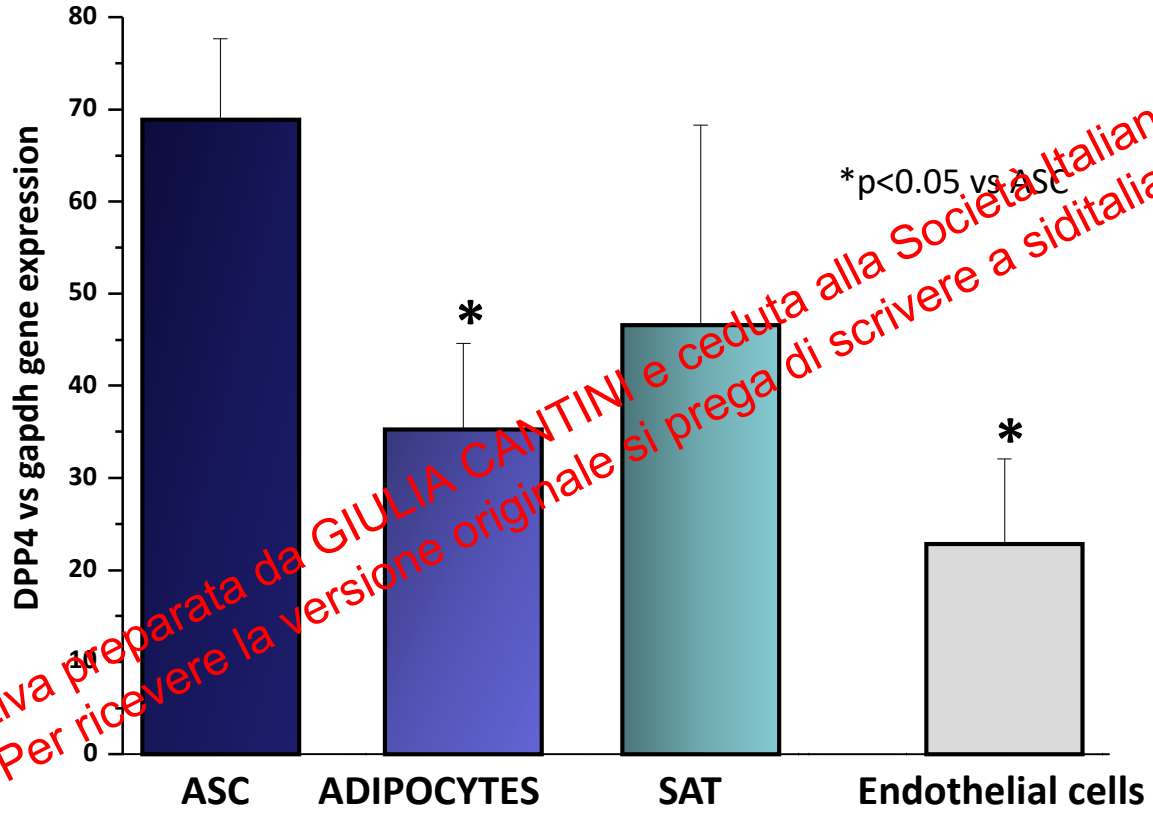
Quantitative Real Time-RT-PCR



Unpublished data

LE ASC ESPRIMONO LA DPP4

Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP4) quantitative real time gene expression



Unpublished data

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

TESSUTO ADIPOSO E ASC INDUCONO UNA PRODUZIONE LOCALE DI GLP-1(9-36)

EFFETTO BIOLOGICI DEL GLP-1(9-36)

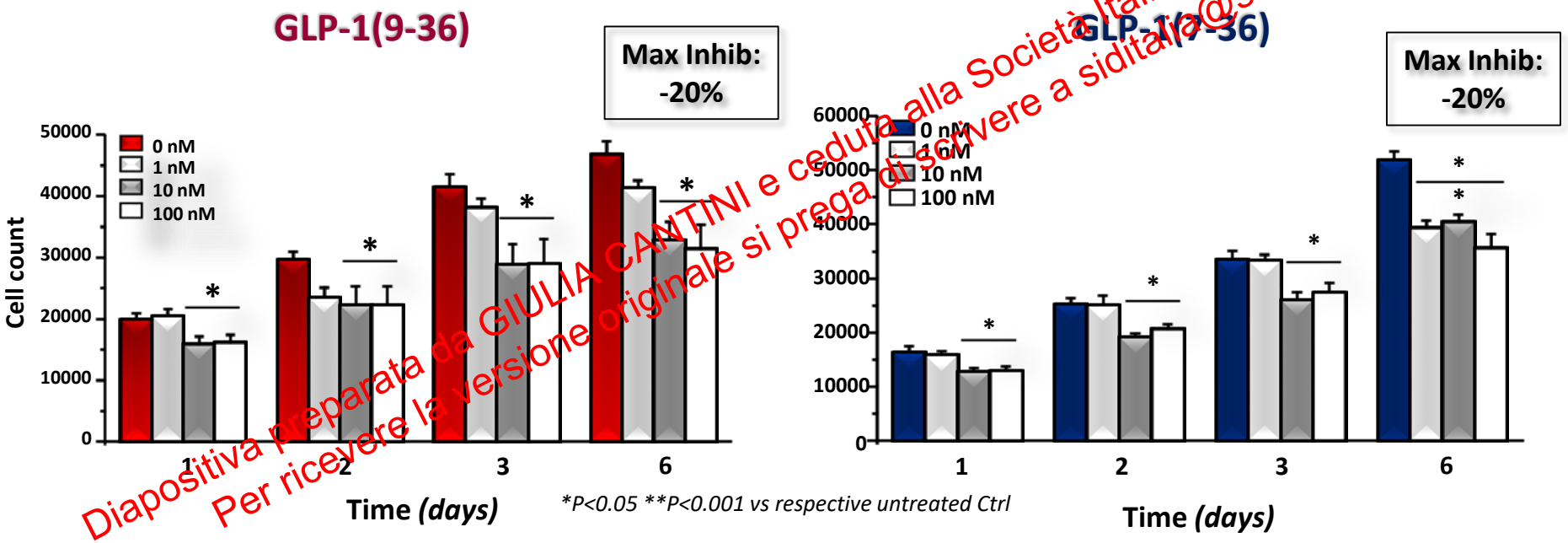
Riduzione della vitalità cellulare

Is cleaved glucagon-like peptide 1 really inactive? Effects of GLP-1(9-36) on human adipose stem cells

Giulia Cantini [a], Alessandra Di Franco [a], Edoardo Mannucci [a, b, **], Michaela Luconi [a, *]

[a] Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, Endocrinology Unit, University of Florence, Florence, Italy
[b] Diabetes Agency, Careggi Hospital, Florence, Italy

Molecular and Cellular Endocrinology 439 (2017) 10–15



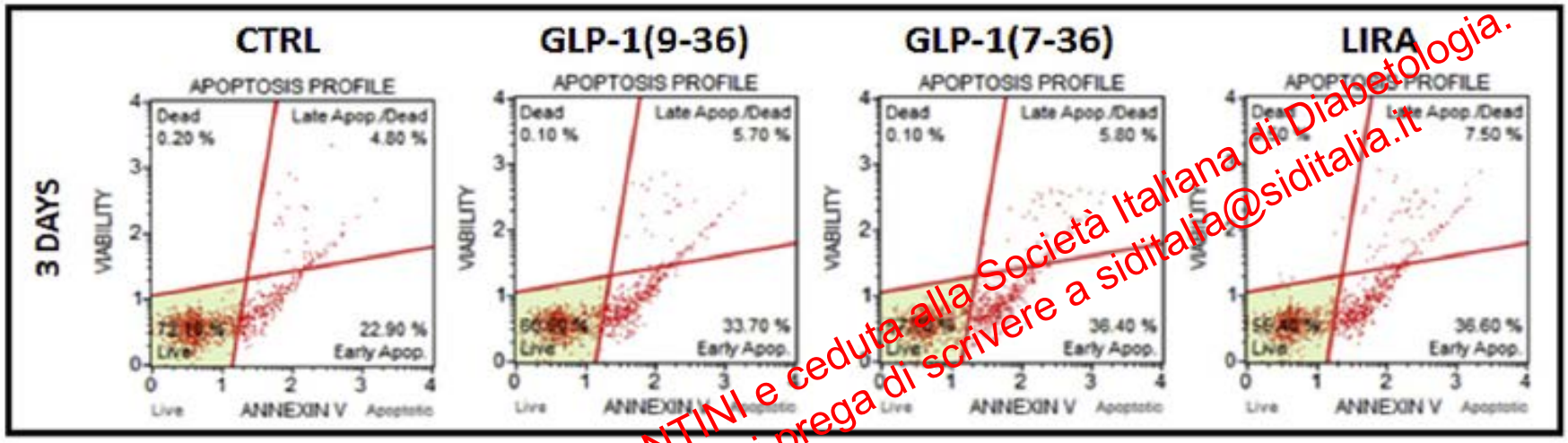
Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

GLP-1(9-36) E GLP-1 NATIVO

INIBISCONO LA PROLIFERAZIONE DELLE ASC

EFFETTO BIOLOGICI DEL GLP-1(9-36)

Attivazione dell'apoptosi cellulare



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Molecular and Cellular Endocrinology 439 (2017) 10–15

Contents lists available at ScienceDirect

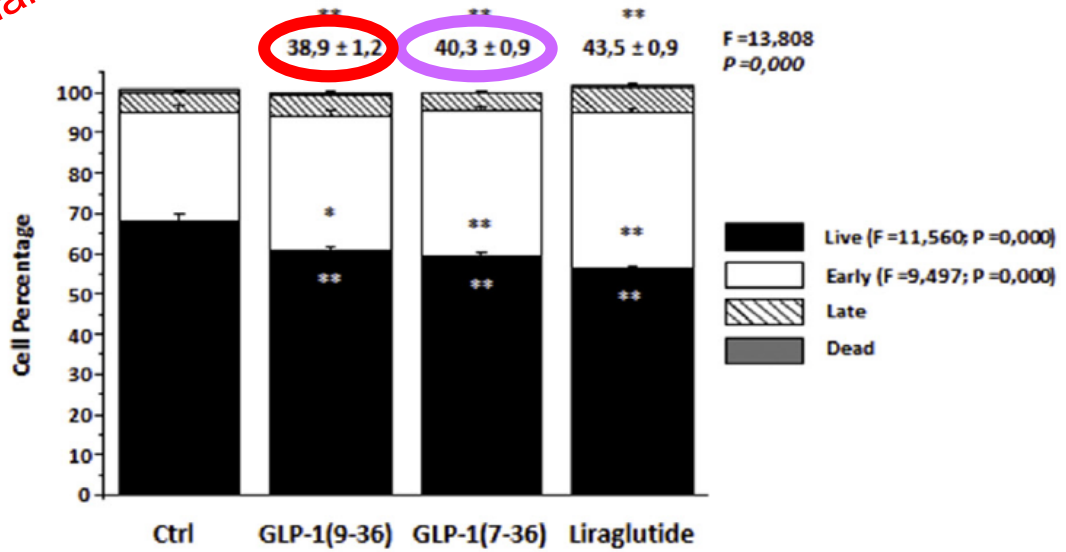
Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Is cleaved glucagon-like peptide 1 really inactive? Effects of GLP-1(9-36) on human adipose stem cells

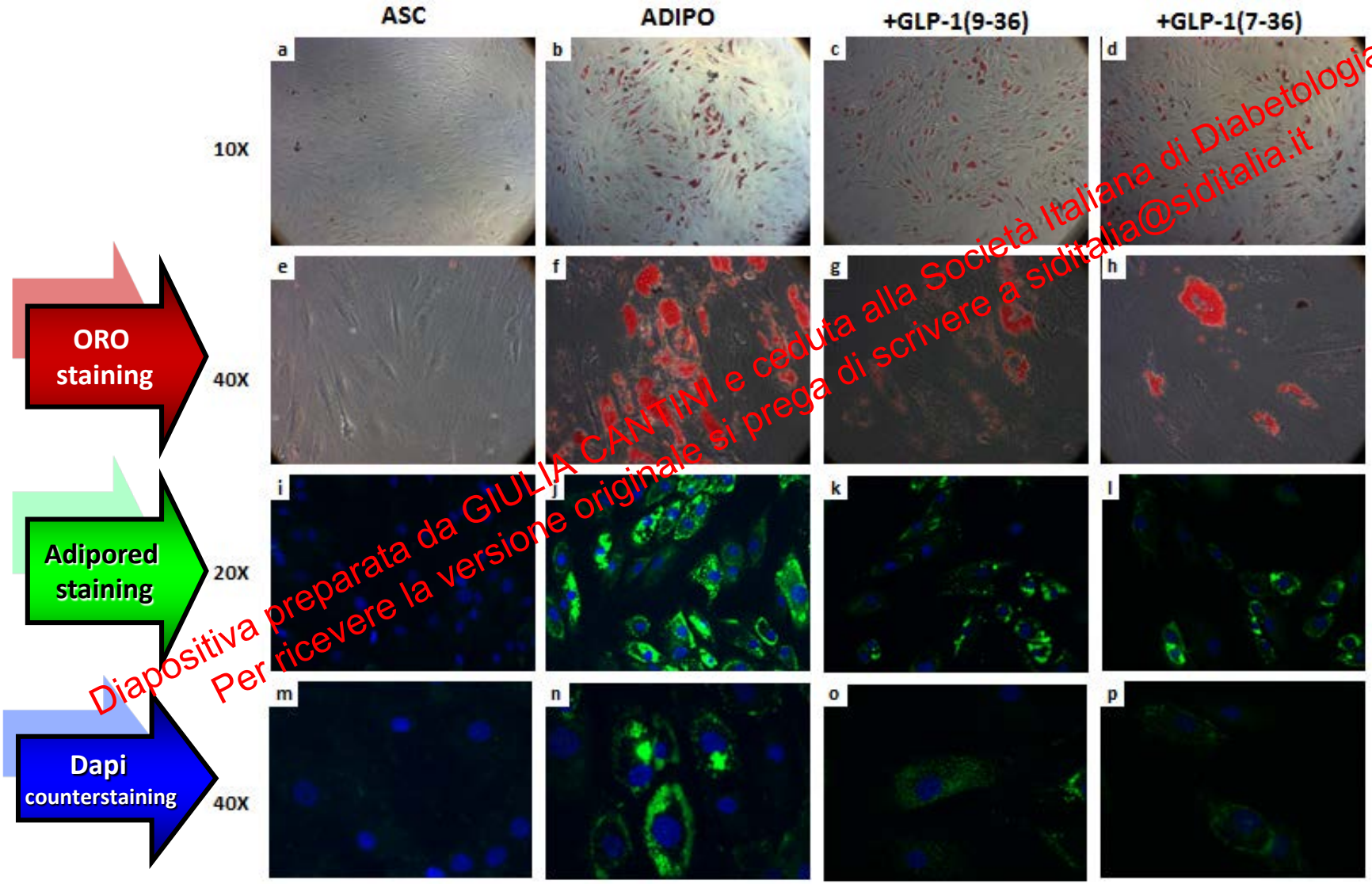
Giulia Cantini [a], Alessandra Di Franco [a], Edoardo Mannucci [a, b, **], Michaela Luconi [a, *]

[a] Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, Endocrinology Unit, University of Florence, Florence, Italy
[b] Diabetes Agency, Careggi Hospital, Florence, Italy



Cantini G, Di Franco A, Mannucci E, Luconi M,
Mol Cell Endocrinol 2017; 439:10-15

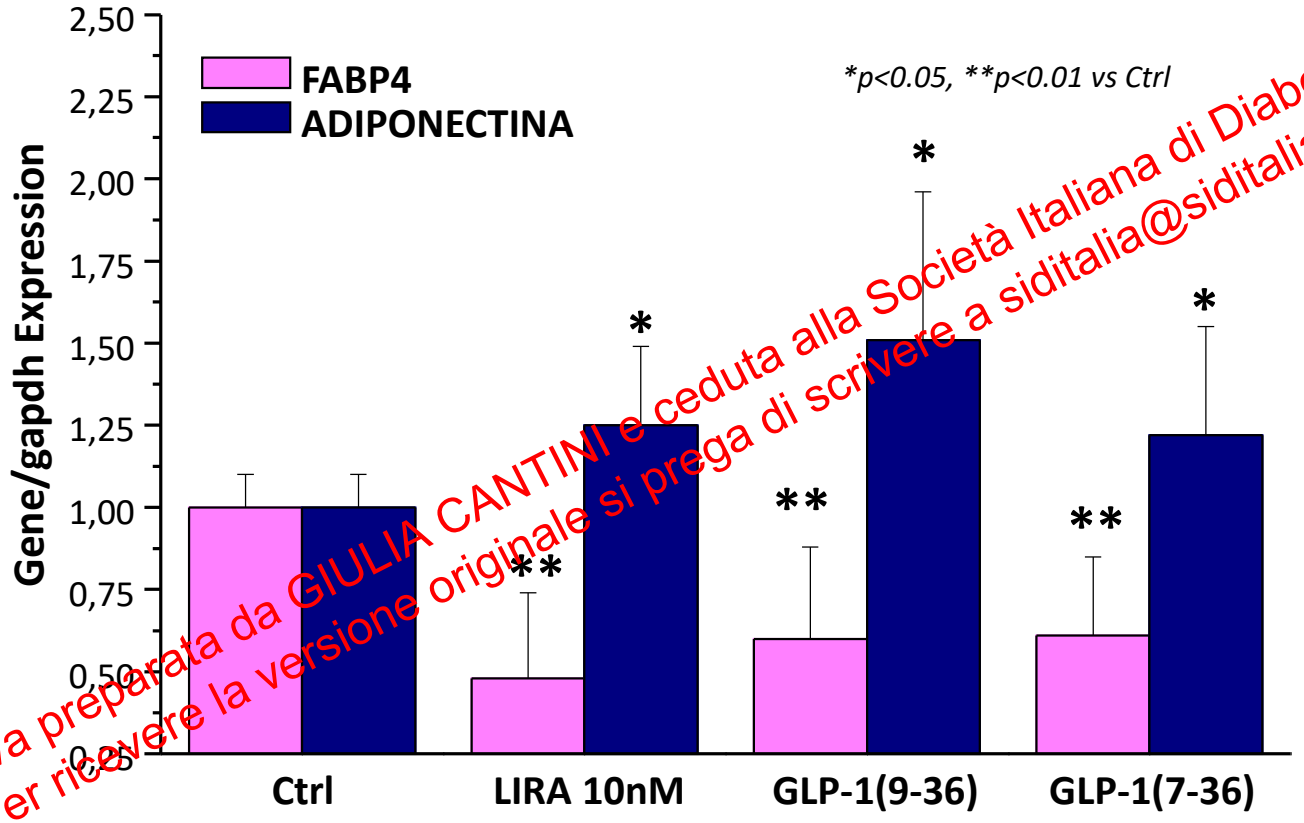
GLP-1(9-36) e GLP-1 nativo inibiscono Il differenziamento adipocitario



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Cantini G, Di Franco A, Mannucci E, Luconi M, *Mol Cell Endocrinol* 2017; 439:10-15

RIDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE DI GLP-1 E GLP-1RA



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Cantini G, Di Franco A, Mannucci E, Luconi M, *Mol Cell Endocrinol* 2017; 439:10-15

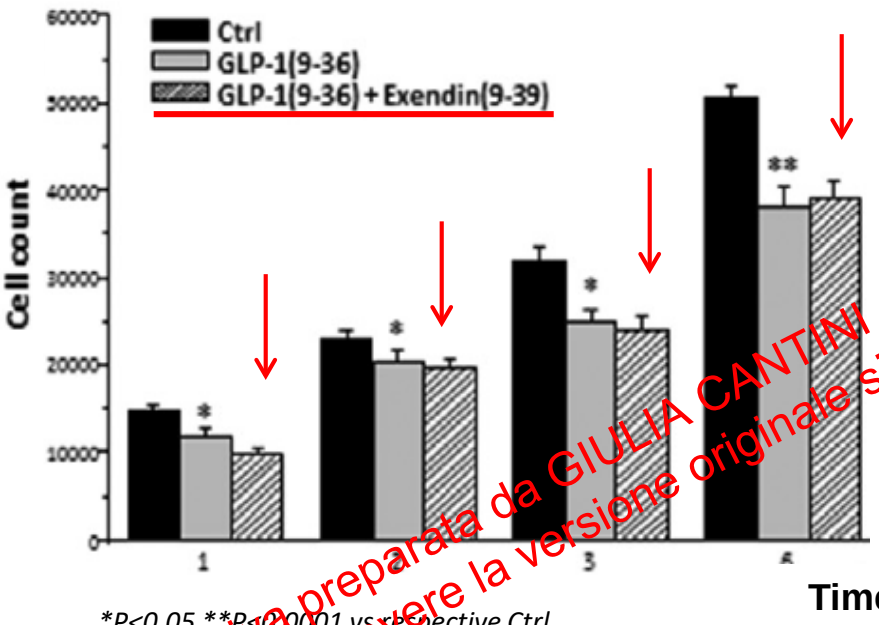
GLP-1 & GLP-1RA MIGLIORANO LA QUALITA' ADIPOCITARIA

MECCANISMO MEDIATO DAL RECETTORE DEL GLP-1?

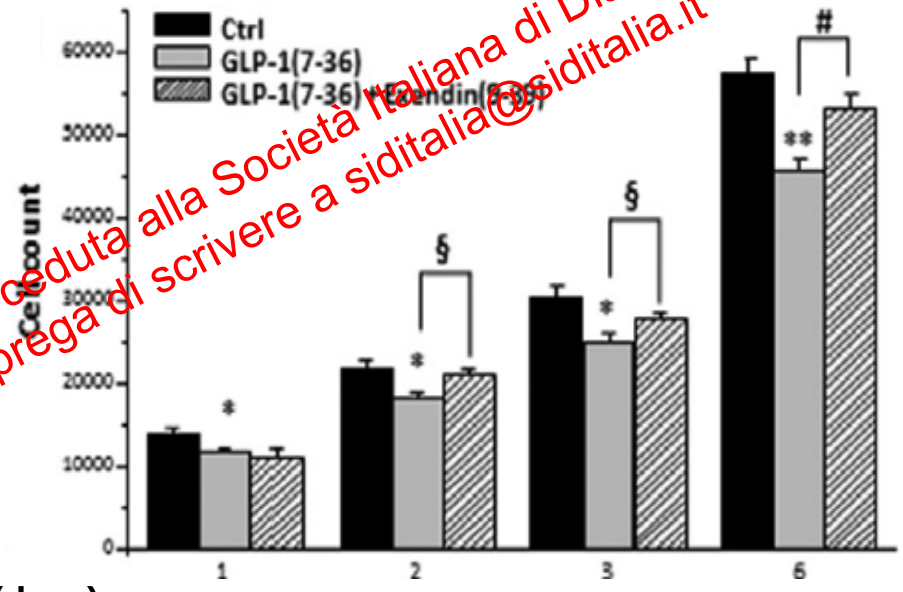
Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Ban et al, Circulation 2008	modello cardiaco	effetti cardioprotettivi del GLP-1 (9-36)
Ban et al, Endocrinology 2010	modello cardiaco	effetti cardioprotettivi del GLP-1 (9-36) in topi ko (Glp1r-/-)
Lavicka et al, Endocrinology 2012	modello cardiaco	Ruolo anti-apoptotico mediato da GLP-1 RECEPTORS in hCPC
Nuche-Berenguer et al,J C Physiol 2010	osteoblasti	Recettore funzionale per GLP-1 indipendente dal GLP-1 Receptor classico
Yang et al, J C Physiol 2005	Muscolo (L6 miotubi)	Effetto insulino-mimentico del GLP-1 indipendenti dal GLP-1R

Il blocco proliferativo indotto da GLP-1(9-36) non e' revertito in presenza di EXENDIN 9-39



*P<0.05 **P<0.0001 vs respective Ctrl



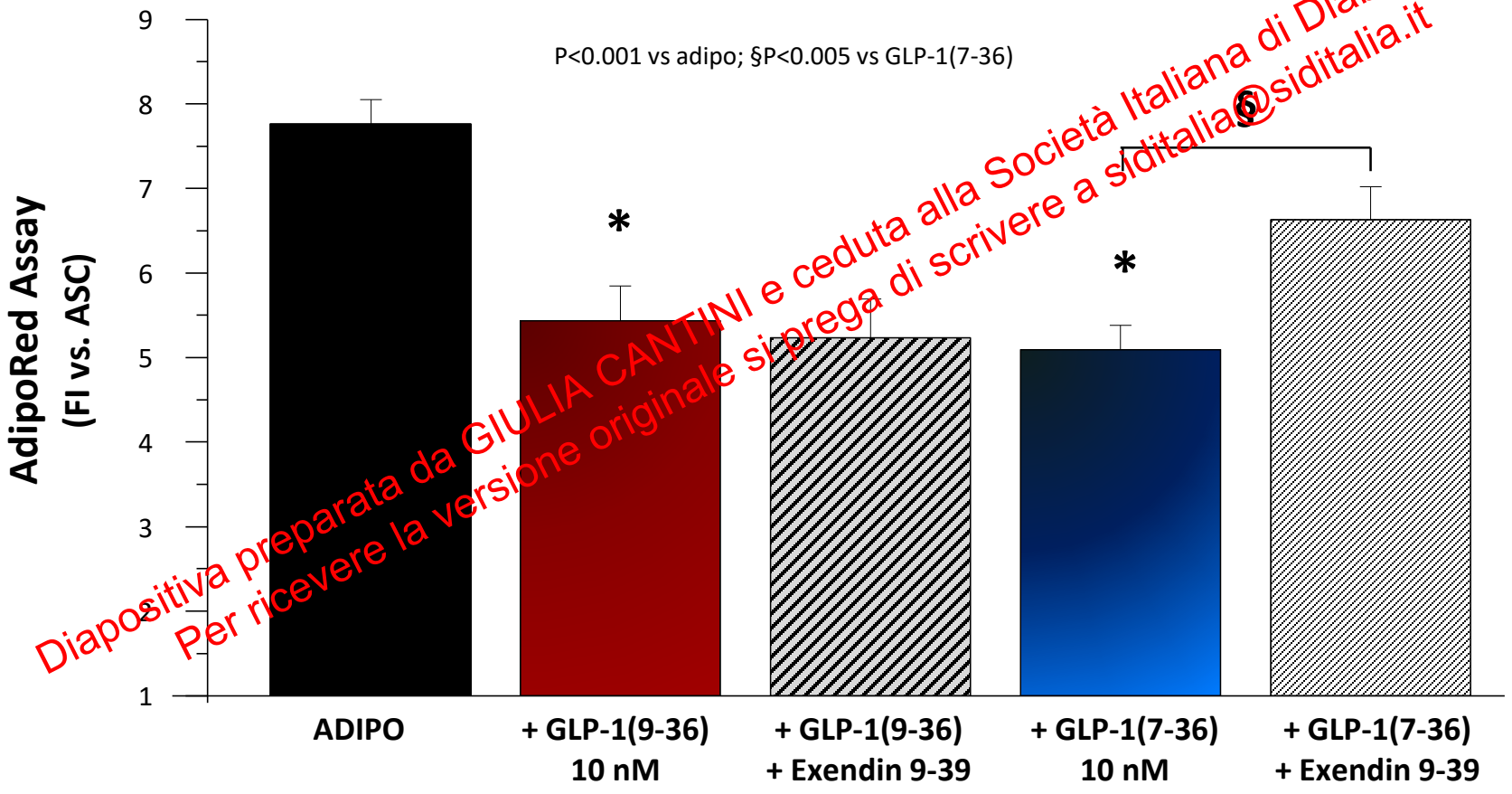
*P<0.05 **P<0.0001 vs Ctrl

§P<0.05 #P<0.001 vs GLP-1(7-36)

Cantini G, Di Franco A, Mannucci E, Luconi M, *Mol Cell Endocrinol* 2017; 439:10-15

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

L'INIBIZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO INDOTTA DA GLP1(9-36) NON E' REVERTITO DA EXENDIN 9-39



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Cantini G, Di Franco A, Mannucci E, Luconi M, *Mol Cell Endocrinol* 2017; 439:10-15

CONCLUSIONI III

GLP-1(9-36) AGISCE SU:

1. **RIDUZIONE DELLA CAPACITA' PROLIFERATIVA**
2. **RIDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO**

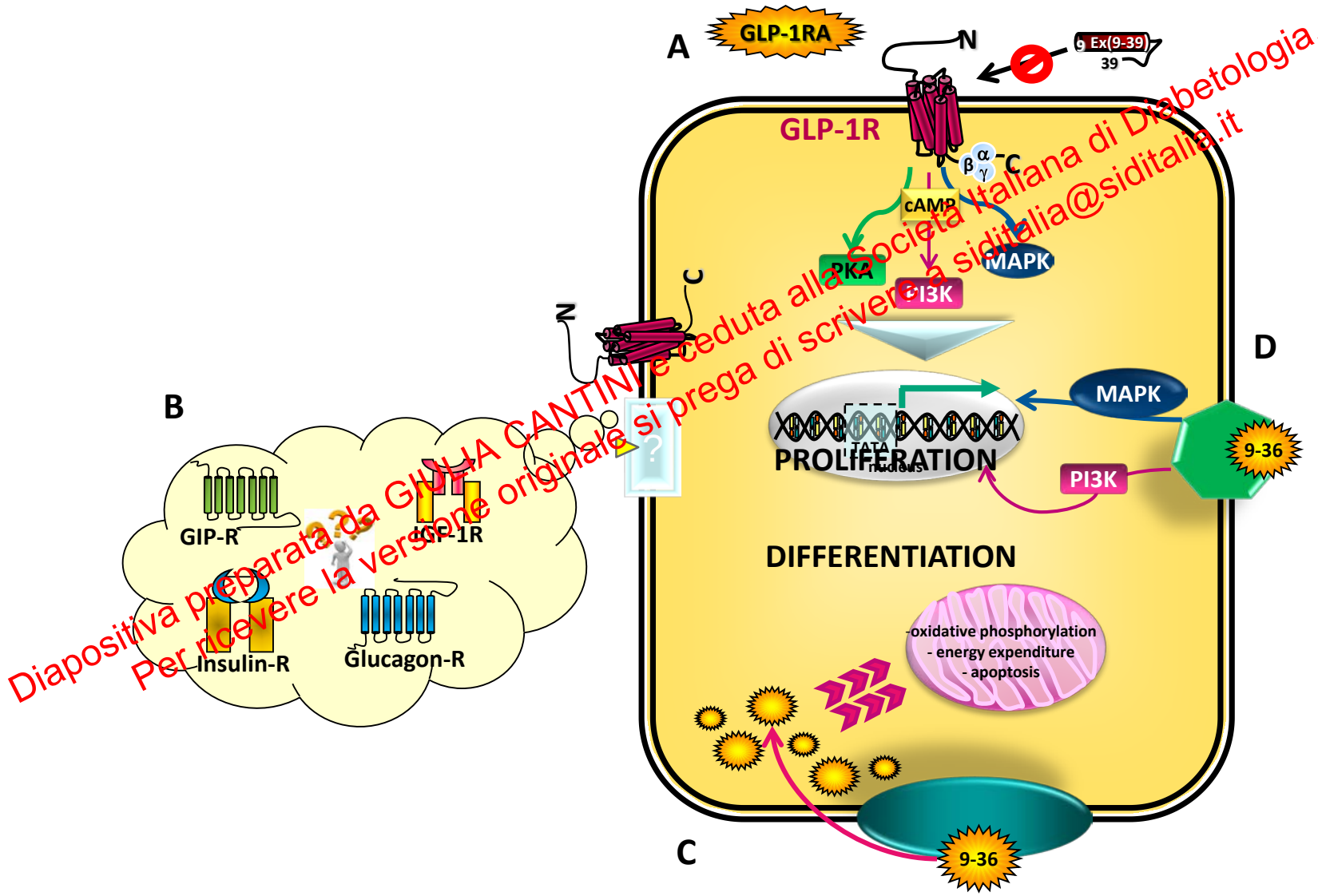
L'EFFETTO INIBITORIO del GLP-1(9-36) SULLA PROLIFERAZIONE e SUL DIFFERENZIAMENTO delle S-ASC

NON viene REVERTITO in presenza di EXENDIN (9-39)

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Meccanismo di azione del GLP-1(9-36) non è mediato dal GLP-1R

RECETTORI ALTERNATIVI & MECCANISMI?



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Cantini G, Mannucci E, Luconi M, *Trends Endo Metab* 2016; 27:427-438

ULTIME NOTIZIE

Rescue remedy

Life-saving treatments for diabetes could come from new work on solving receptor structures.

Most people know about mouth-to-mouth resuscitation and chest compressions, even if they have never had to put them into practice. Some could probably attempt the Heimlich manoeuvre. But how many have heard of glucagon rescue?

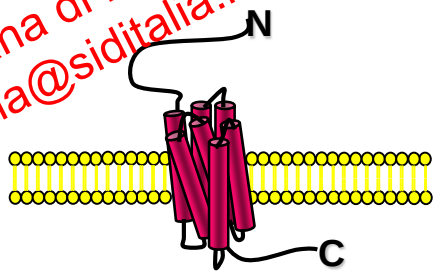
To a person with diabetes who has dangerously low blood sugar, a shot of the hormone glucagon delivered by someone else is their best chance of survival. Many carry a life-saving glucagon rescue kit. But it's difficult to use in a hurry. A powder must be mixed into solution, shaken and then delivered with a hypodermic syringe. Even people who are practised struggle. To those who are unfamiliar, the lengthy instructions can be enough to stop them from trying. If a pupil falls into a hypoglycaemic coma, teachers in some US schools have it written into their contracts that they are to call the emergency services instead.

So research that could lead to a better way to address hypoglycaemia and other complications of diabetes is an urgent pursuit. This week, *Nature* publishes four papers that describe such work. At first glance, the research might seem far removed from the medical front line. It's hardcore structural biology: solved crystal and cryo-electron microscopy (cryo-EM) structures of G-protein-coupled receptors. But the insights could improve glucagon rescue, and lead to other treatments for diabetes and obesity.

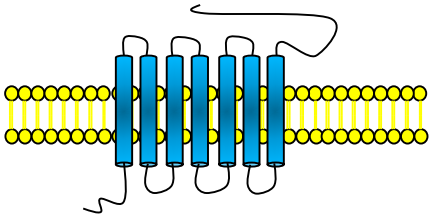
In the body, glucagon triggers the conversion of stored glycogen to glucose — the opposite effect to insulin. Stable synthetic insulin is

© 2017 Macmillan Publishers Limited,

GLP-1R



GCGR



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

doi:10.1038/nature22363

Structure of the full-length g class B G-protein-coupled re

Haonan Zhang[1,2*], Anna Qiao[1,2*], Dehua Yang[1,3*], Linlin Yang[4*], Antao Dai[1,3], Chris de Gra
Venkatasubramanian Dharmarajan[7], Hui Zhang[1,2], Gye Won Han[8], Thomas D. Grant[9], Ray
Garrett Nelson[11], Wei Liu[12], Yanhong Wu[1,2,13], Limin Ma[1], Xiaoqing Cai[1,3], Guangyao Lin[1,2,3
Yuhui Dong[15], Gaojie Song[16], Patrick R. Griffin[7], Jesper Lau[6], Vadim Cherezov[8], Huaiyu Yar
Raymond C. Stevens[13,16], Qiang Zhao[1,2,19,20], Hualiang Jiang[1,17,19], Ming-Wei Wang[1,3,13,21] &

The human glucagon receptor, GCGR, belongs to the class B G-protein-coupled re
in glucose homeostasis and the pathophysiology of type 2 diabetes. Here we report
length GCGR containing both the extracellular domain and transmembrane domai
two domains are connected by a 12-residue segment termed the stalk, which adopt
of forming an α-helix as observed in the previously solved structure of the GCGR
extracellular loop exhibits a β-hairpin conformation and interacts with the stalk to
Hydrogen–deuterium exchange, disulfide crosslinking and molecular dynamics st
first extracellular loop have critical roles in modulating peptide ligand binding and
into the full-length GCGR structure deepen our understanding of the signalling mecha
receptors.

doi:10.1038/nature22800

Crystal structure of the GLP-1 receptor bound to a peptide agonist

Ali Jazayeri[1*], Mathieu Rappas[1*], Alastair J. H. Brown[1*], James Kean[1], James C. Errey[1], Nathan Robertson[1], Cédric Fiez-Vandal[1], Stephen P. Andrews[1], Miles Congreve[1], Andrea Bortolato[1], Jonathan S. Mason[1], Asma M. Baig[1], Iryna Teobald[1], Andrew S. Doré[1], Malcolm Weir[1], Robert M. Cooke[1] & Fiona H. Marshall[1]

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) regulates glucose homeostasis through the control of insulin release from the pancreas. GLP-1 peptide agonists are efficacious drugs for the treatment of diabetes. To gain insight into the molecular mechanism of action of GLP-1 peptides, here we report the crystal structure of the full-length GLP-1 receptor bound to a truncated peptide agonist. The peptide agonist retains an α-helical conformation as it sits deep within the receptor-binding pocket. The arrangement of the transmembrane helices reveals hallmarks of an active conformation similar to that observed in

Cryo-EM structure of the receptor in complex with

Yan Zhang[1*], Bingfa Sun[2*], Dan Feng[2], Hongli Hu[1], Matthew Chu[2], Jianhui Qu[1], J
Tong Sun Kobilka[2], Brian K. Kobilka[2,3] & Georgios Skiniotis[1,2]

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is a hormone with essential roles in regulating
and appetite. GLP-1 effects are mediated through binding to the GLP-1 recep
receptor (GLP-1R) that signals primarily through the stimulatory G protein G
targets. However, our understanding of their mechanism of action is limit
activated and full-length receptors. Here we report the cryo-electron mic
GLP-1R–G_s complex at near atomic resolution. The peptide is clasped
transmembrane core of the receptor, and further stabilized by extracellu
transmembrane domain result in a sharp kink in the middle of transmemb
half outward to accommodate the α5-helix of the Ras-like domain of G_s. Th
for understanding class B GPCR activation through hormone binding.

doi:10.1038/nature22378

Human GLP-1 receptor transmembrane domain structure in complex with allosteric modulators

Gaojie Song[1], Dehua Yang[2*], Yuxia Wang[1*], Chris de Graaf[3*], Qingtong Zhou[1], Shanshan Jiang[4], Kaiwen Liu[1,5,6], Xiaoqing Cai[2], Antao Dai[2], Guangyao Lin[5], Dongsheng Liu[1], Fan Wu[1,5,6], Yiran Wu[1], Suwen Zhao[1,5], Li Ye[4], Gye Won Han[7], Jesper Lau[8], Beili Wu[5,6,9], Michael A. Hanson[10], Zhi-Jie Liu[1,5,11], Ming-Wei Wang[2,4,5] & Raymond C. Stevens[1,5]

The glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) and the glucagon receptor (GCGR) are members of the secretin-like class B family of G-protein-coupled receptors (GPCRs) and have opposing physiological roles in insulin release and glucose homeostasis[1]. The treatment of type 2 diabetes requires positive modulation of GLP-1R to inhibit glucagon secretion and stimulate insulin secretion in a glucose-dependent manner[2]. Here we report crystal structures of the human GLP-1R transmembrane domain in complex with two different negative allosteric modulators, PF-06372222 and NNC0640, at 2.7 and 3.0 Å resolution, respectively. The structures reveal a common binding pocket for negative allosteric modulators, present in both GLP-1R and GCGR[3] and located outside helices V–VII near the intracellular half of the receptor. The receptor is in an inactive conformation with compounds that restrict movement of the intracellular tip of helix VI, a movement that is generally associated with activation mechanisms in class A GPCRs[4–6]. Molecular modelling and mutagenesis studies indicate that agonist positive allosteric modulators target the same general region, but in a distinct sub-pocket at the interface between helices V and VI, which may facilitate the formation of an intracellular binding site that enhances G-protein coupling.

(I317$^{5.47b}$C–G361$^{6.50b}$C) (numbers in superscript refer to the Wootten numbering system for class B GPCRs[16]) that links the middle regions of helices V and VI and a GCGR mimicking mutation C347$^{6.36b}$F in the allosteric modulator binding pocket that stabilizes the interaction interface for NAMs (Methods and Extended Data Fig. 1). These NAMs were previously optimized for GCGR antagonism, but certain analogues were found to antagonize GLP-1R as well. The final modified construct yielded crystals that diffracted to 2.7 Å for PF-06372222 and 3.0 Å for NNC0640 (Fig. 1a, c and Extended Data Table 1).

The TMD architecture of GLP-1R is similar to that of GCGR, consistent with the similarity in their primary sequences (45% identical in the TMDs; Fig. 1b). GLP-1R preserves the conserved and functionally important[17] disulfide bond C226$^{3.29b}$–C296^{ECL2}, and contains most of the interhelical hydrogen bonds present in other class B structures[3,14,15] (Extended Data Fig. 2). Helix I of GLP-1R is 2.5 helical-turns shorter than the long stalk region found in the initial structure of the GCGR TMD (PDB code 4L6R)[15] (Fig. 1b). In an accompanying paper[18], the full-length structure of GCGR reveals a rearrangement of the stalk region with the N-terminal helix unwinding to form an extended β-sheet with two strands from the first extracellular loop (ECL1),

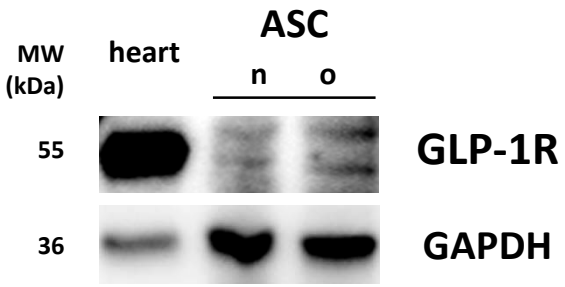
Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla società Italiana di Diabetologia. Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

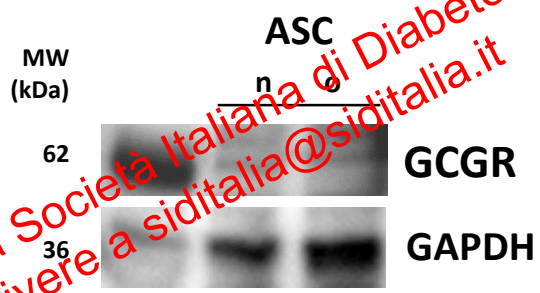
ESPRESSIONE DI GLP-1R & GCGR

GLP-1R

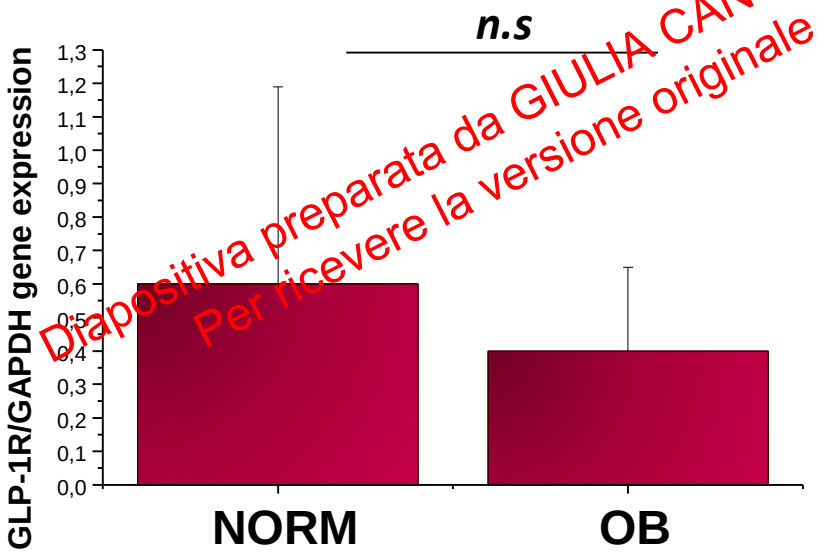
GCGR

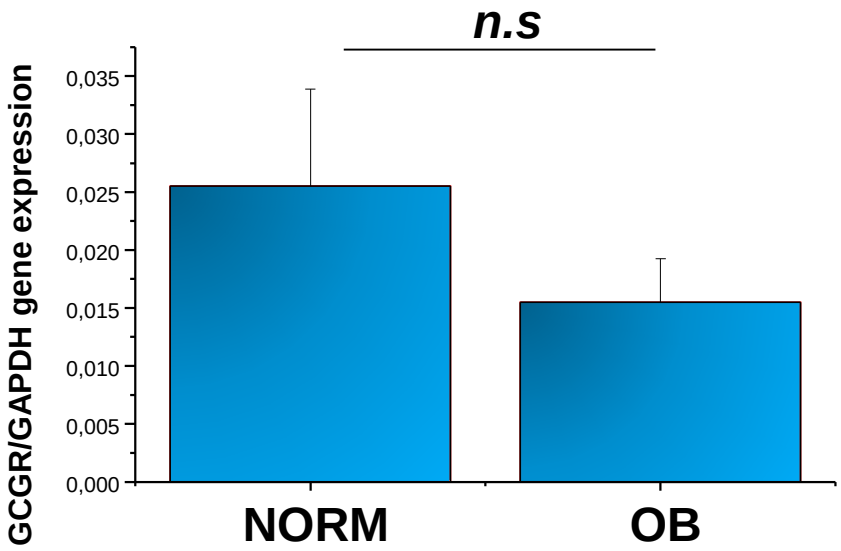
Western Blot:





TaqMan analysis:

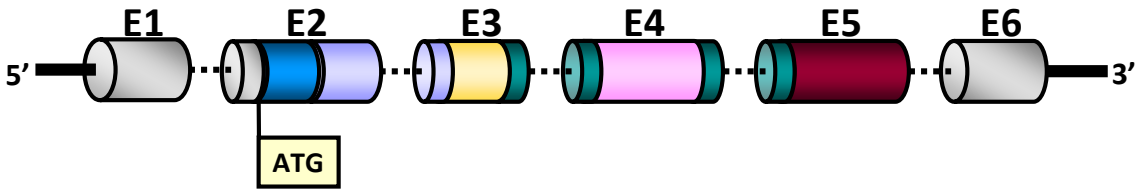




Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

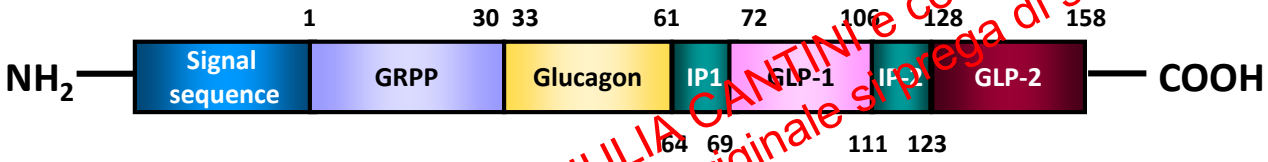
Unpublished data

PERCHE' IL GLUCAGONE?



Pre-proglucagon gene

mRNA



Proglucagon

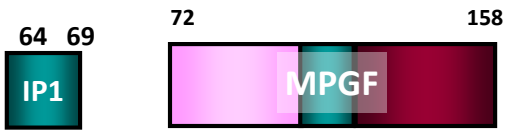
Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

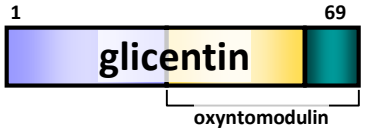
PANCREAS

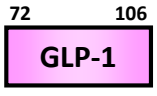
PC 2

PC 1/3

SNC
INTESTINO

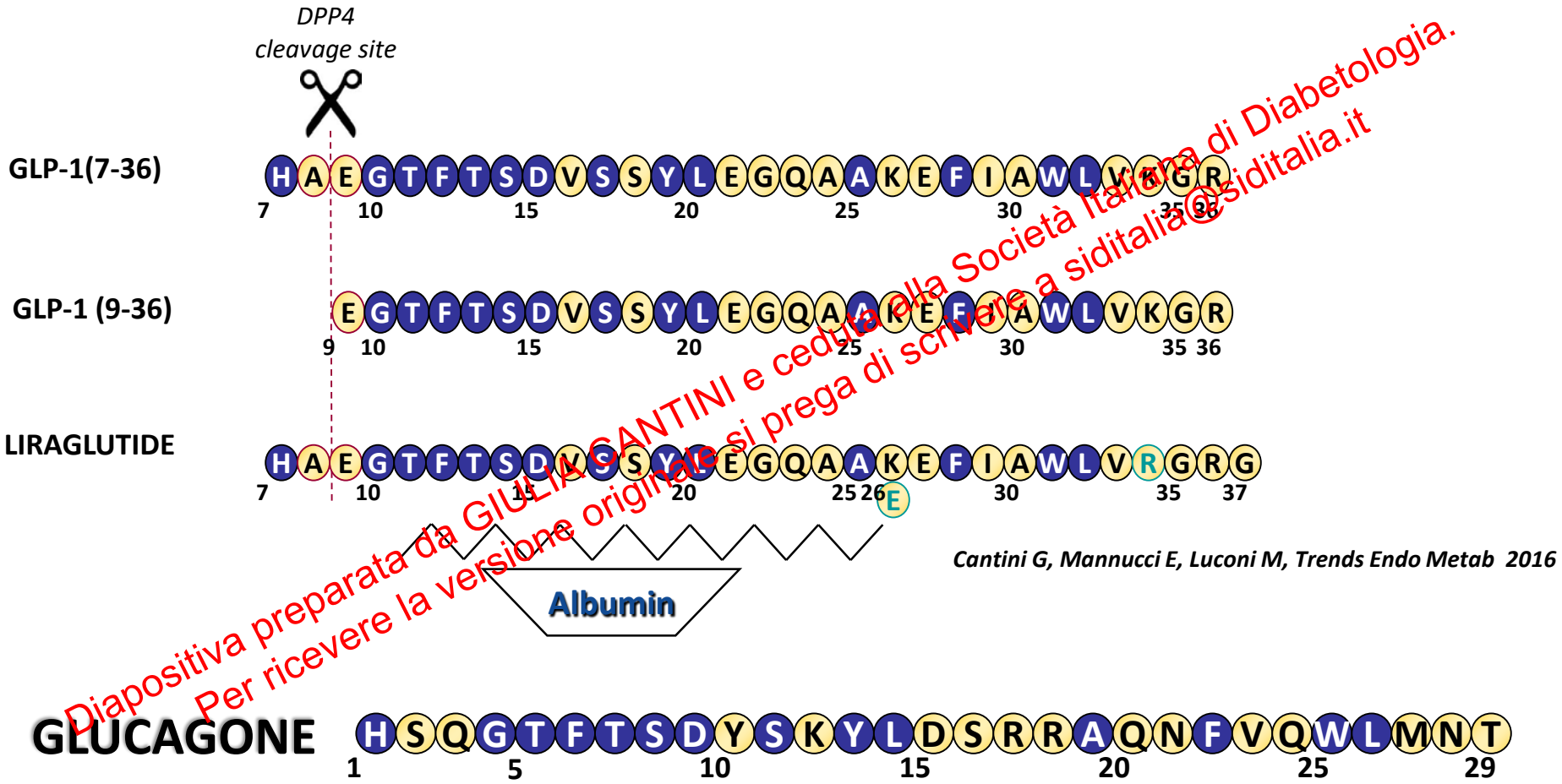






Cantini G, Mannucci E, Luconi M, *Trends Endo Metab* 2016; 27:427-438

INCRETINE & GLP-1RA



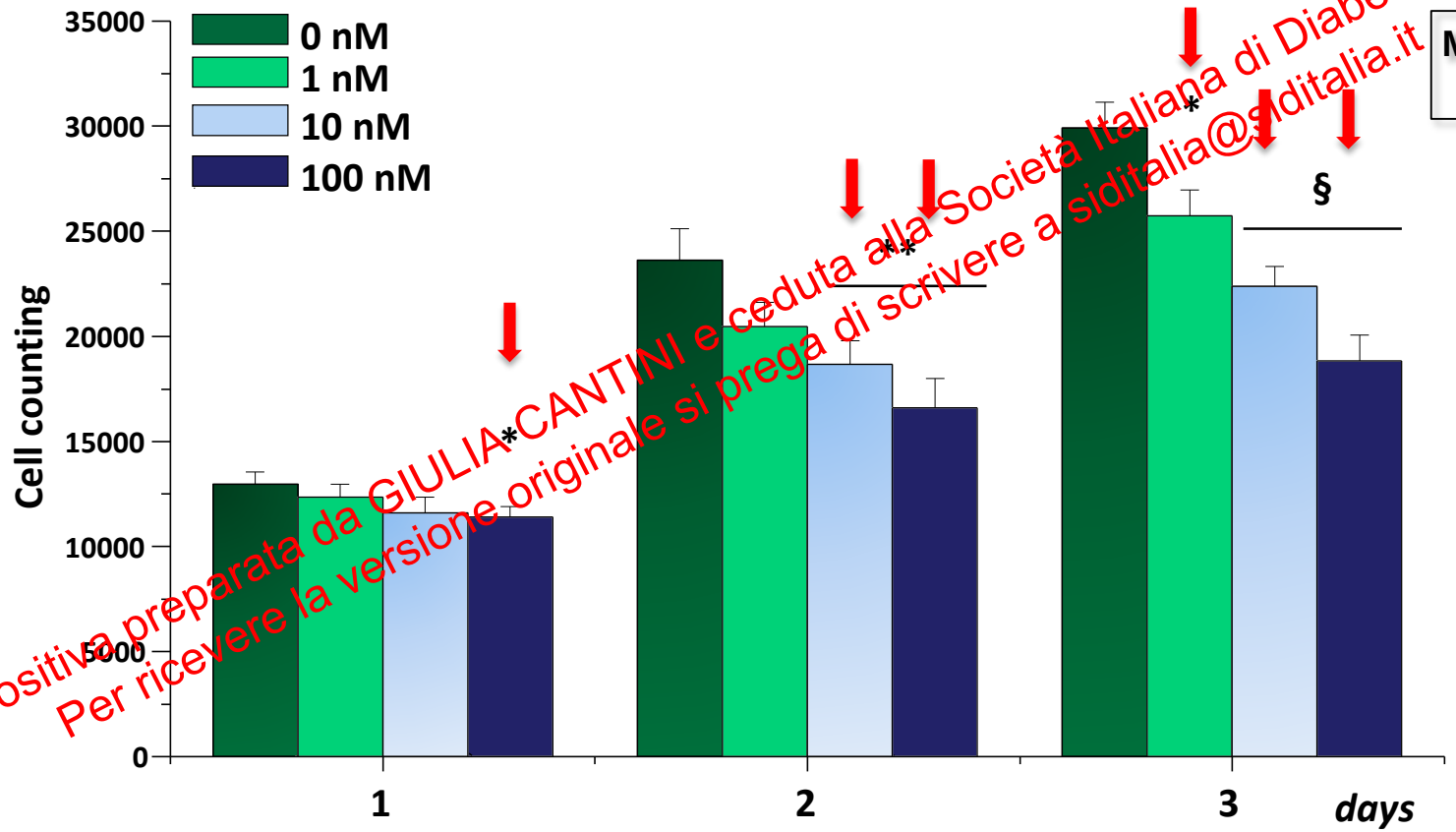
Cantini G, Mannucci E, Luconi M, Trends Endo Metab 2016

Diapositiva preparata da GIULIA SANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

GLUCAGONE INIBISCE LA PROLIFERAZIONE CELLULARE

CELL COUNT

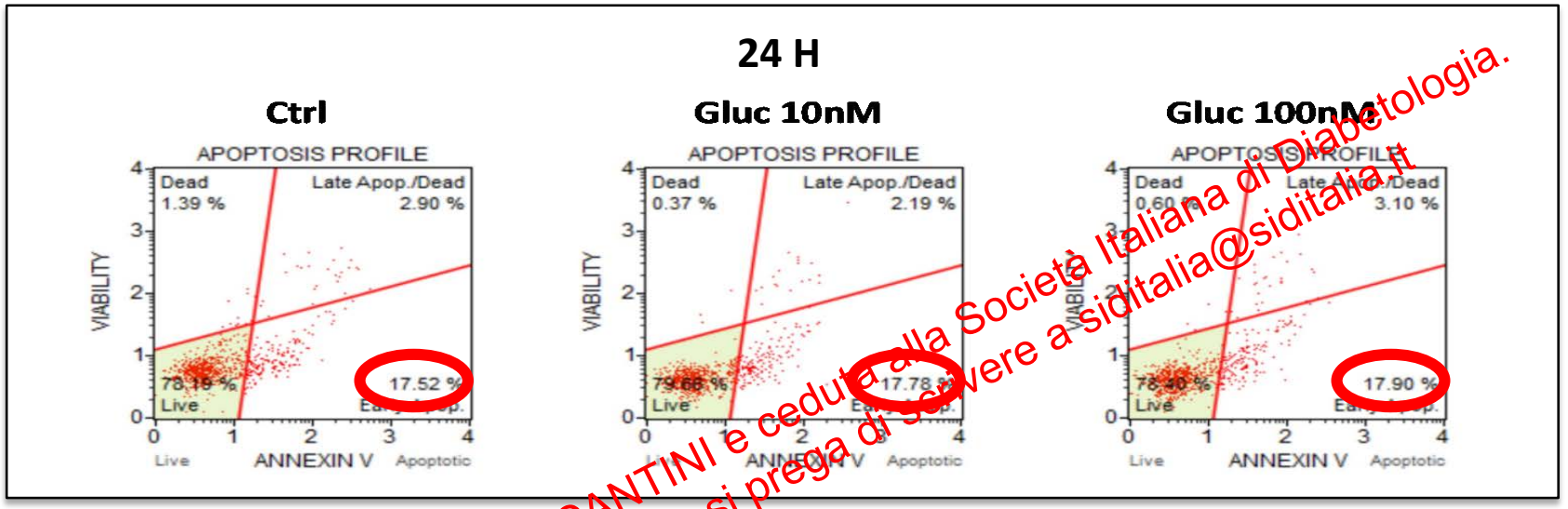
*P<0.05, **P<0.005, §P<0.001 vs. ctrl

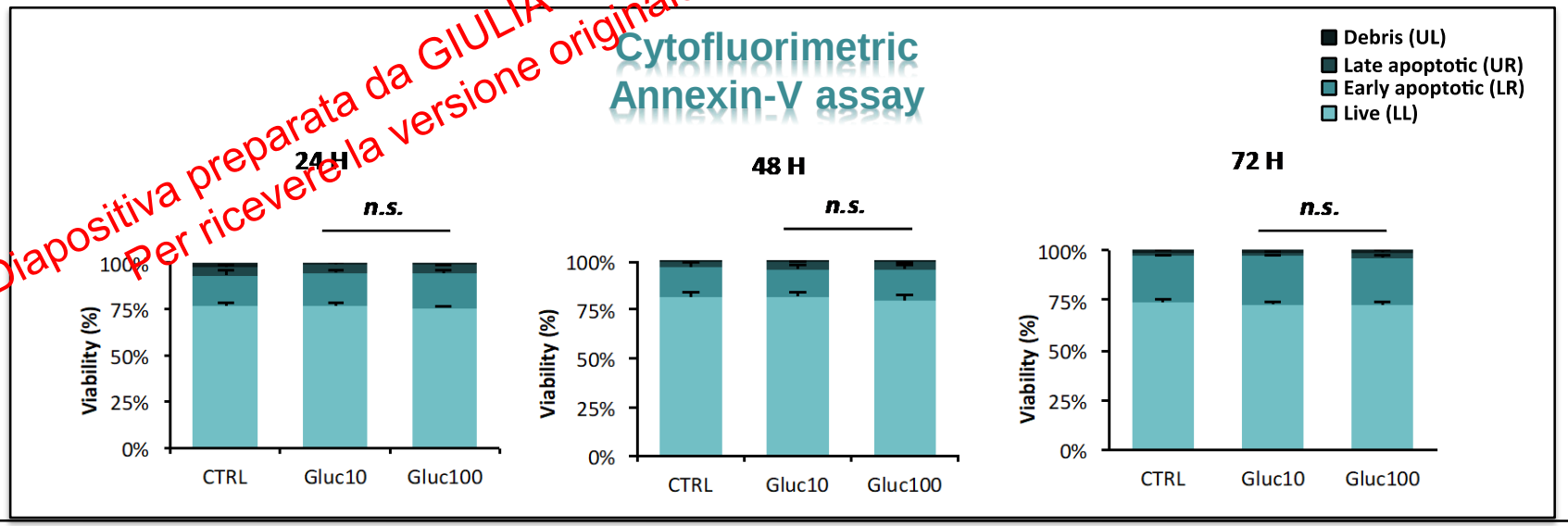


Diapositiva preparata da GIULIA*CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Time- & dose-dependent

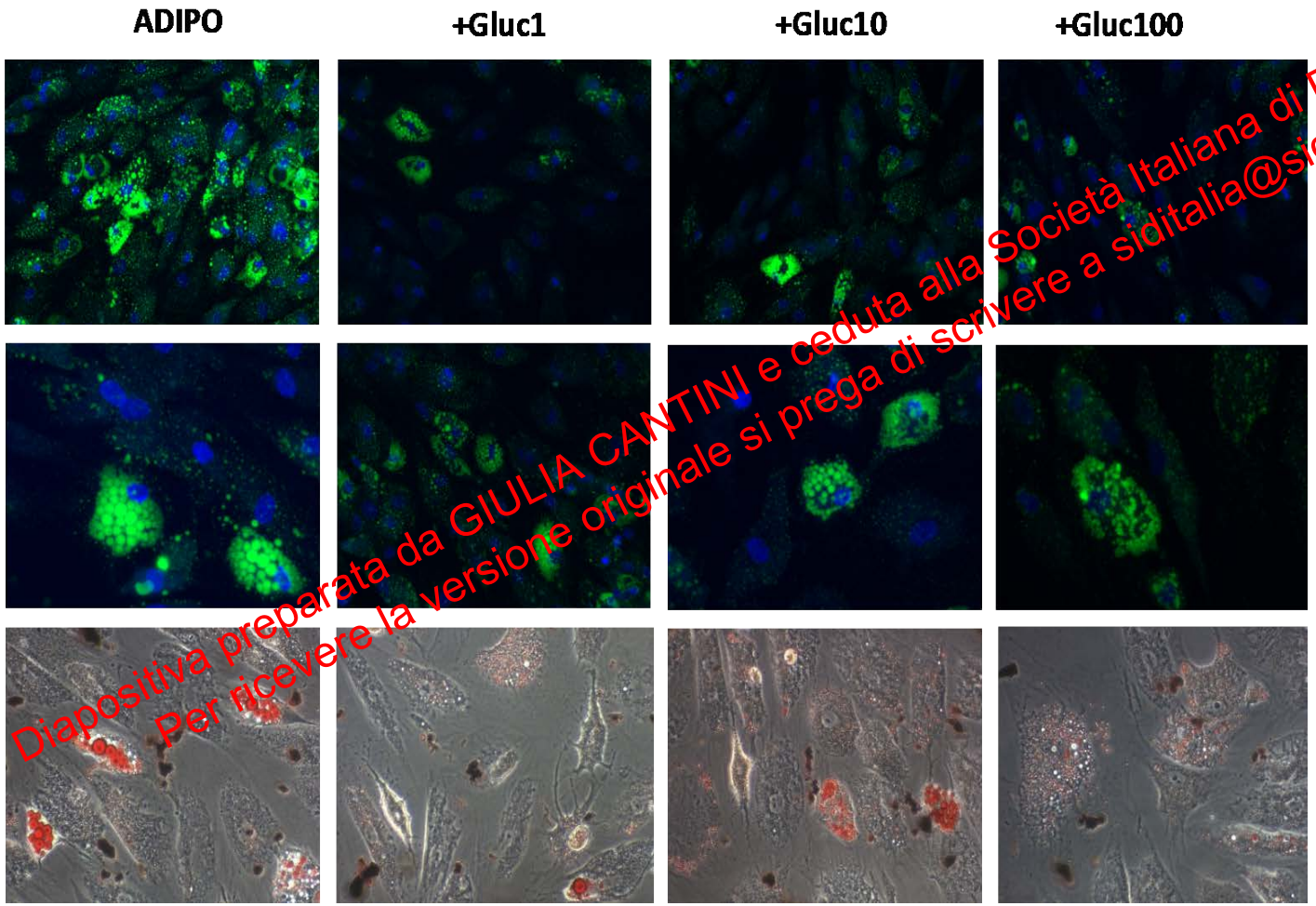
GLUCAGONE NON ATTIVA L'APOPTOSI





Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

GLUCAGONE inibisce il DIFFERENZIAMENTO

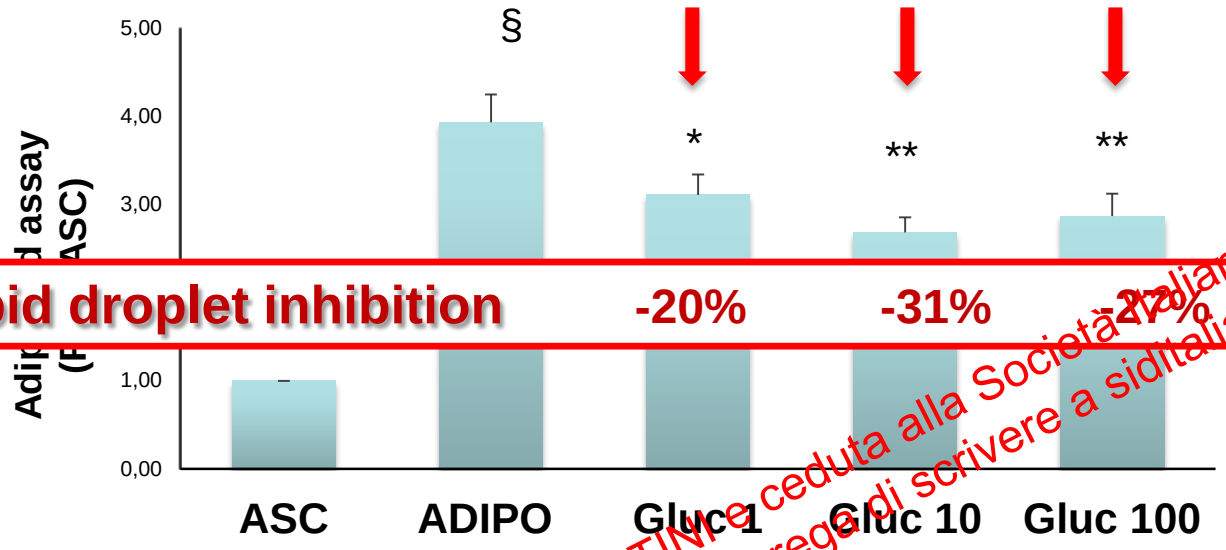


AdipoRed
Epifluorescent microscopy

Oil Red O
Optical microscopy

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

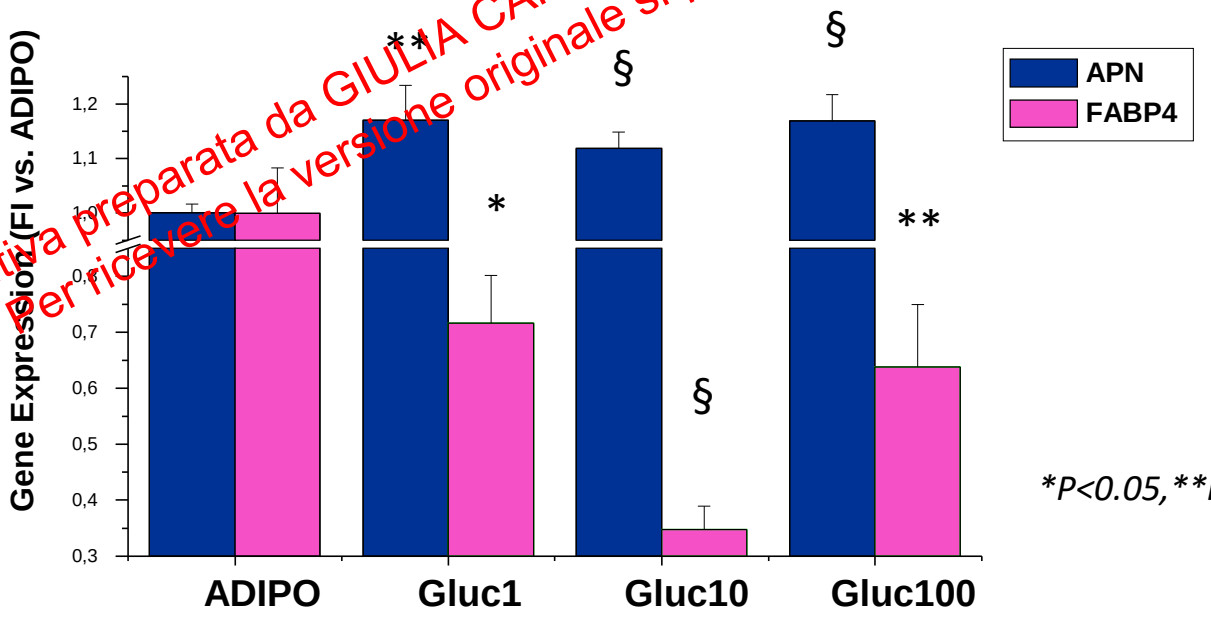
GLUCAGONE inibisce il DIFFERENZIAMENTO



Lipid droplet inhibition -20% -31% -27%

§P<0.001 vs ASC
P<0.05,P<0.005 vs ADIPO*

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it



P<0.05,P<0.01, §P<0.001 vs ADIPO*

CONCLUSIONI IV

GLUCAGONE AGISCE DIRETTAMENTE SULLA CELLULA STAMINALE ADIPOSA:

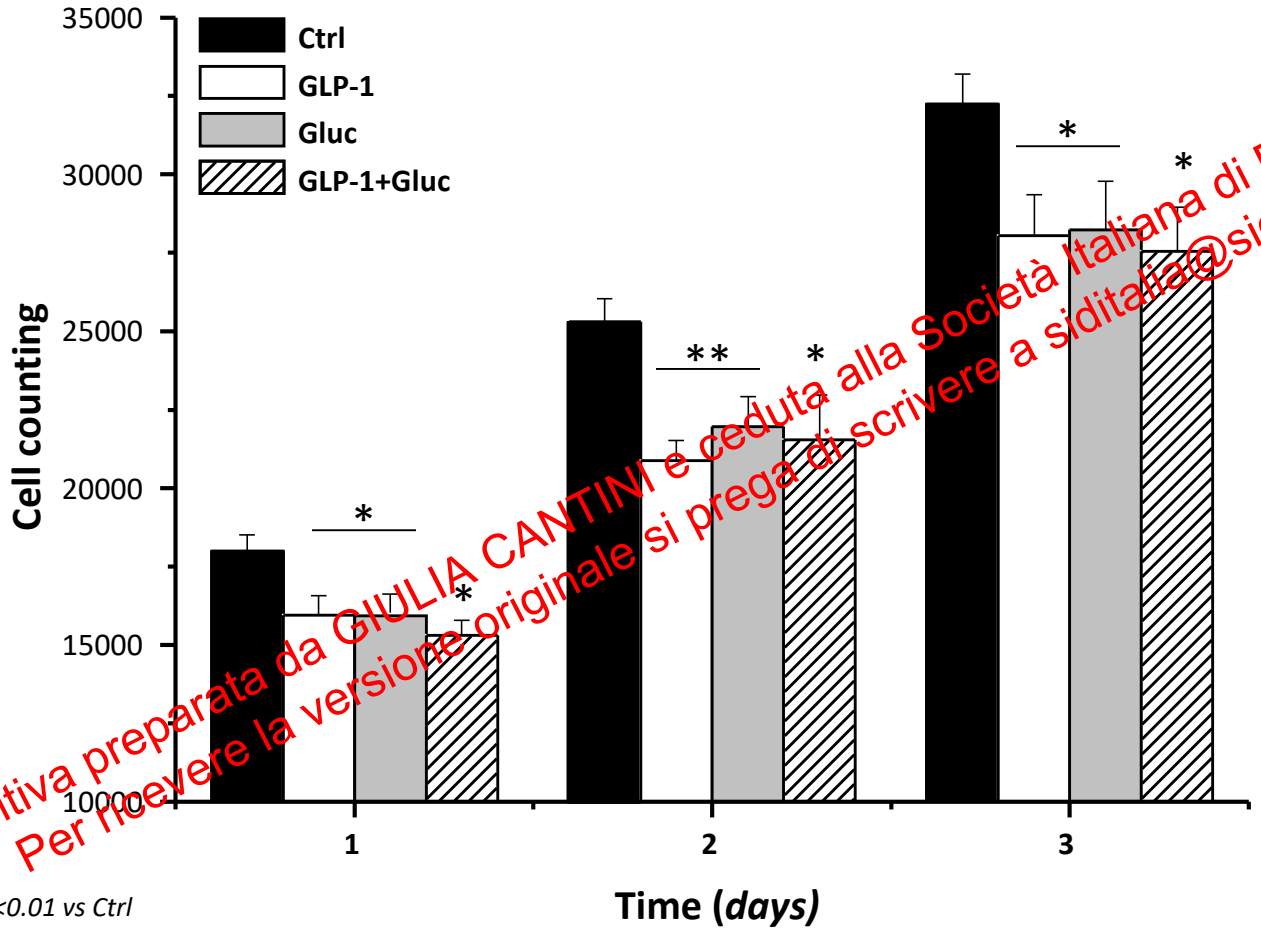
- **RIDUZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE**
- **RIDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO**

RIDUZIONE DELL'ADIPOGENESI…

…MA ADIPOCITA PIU' FUNZIONALE

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

E insieme?



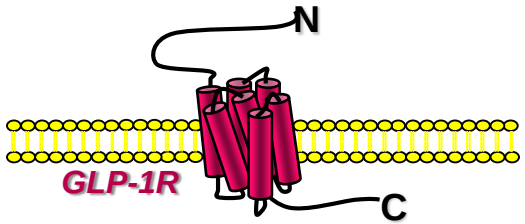
*P<0.05 **P<0.01 vs Ctrl

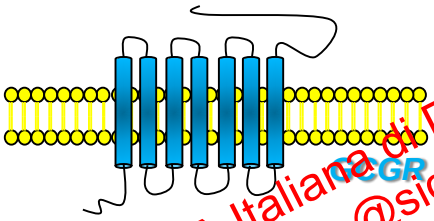
Unpublished data

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

NO effetto addittivo => stesso recettore?

GLP-1RA ? Glucagone



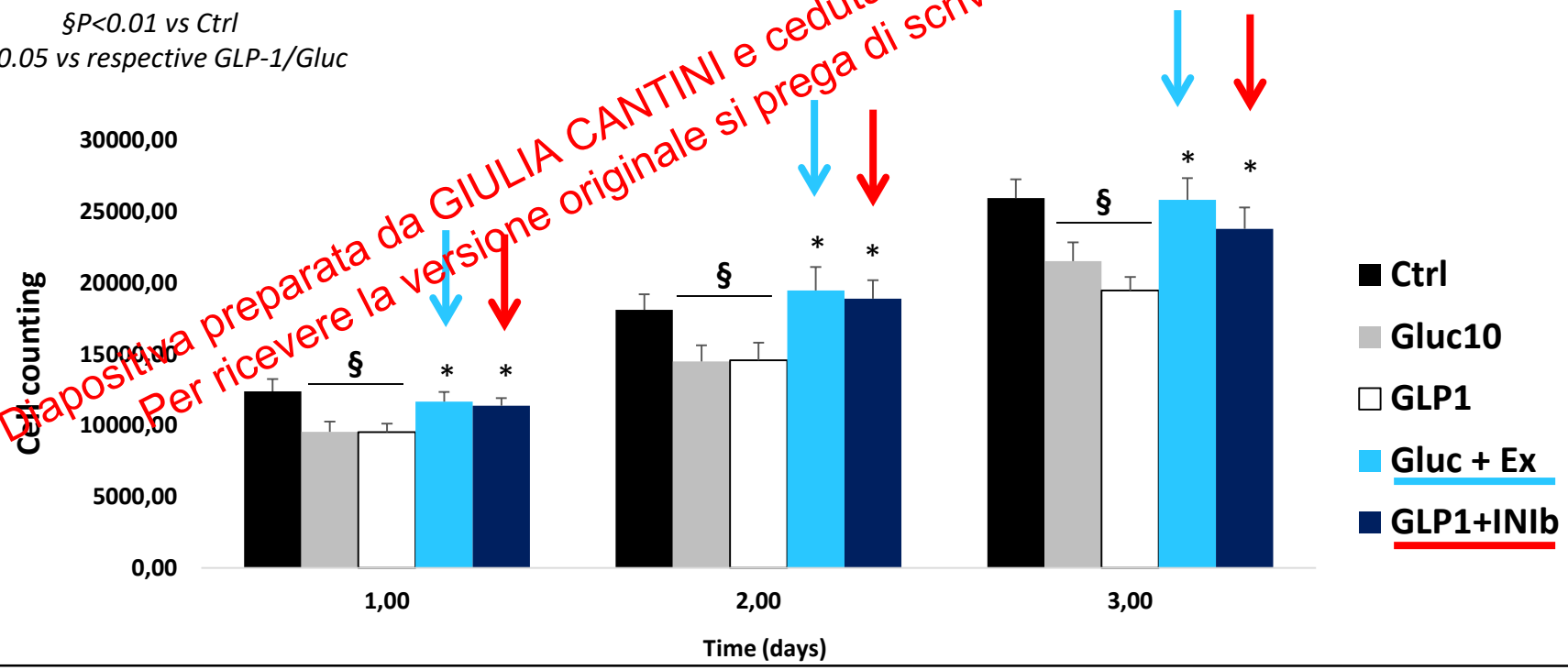


Exendin 9-39

[des-His^1, Glu^9]-Glucagon amide

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

§P<0.01 vs Ctrl
**P<0.05 vs respective GLP-1/Gluc*



Unpublished data

CELLULA STAMINALE DEL TESSUTO ADIPOSO E' UN NUOVO "TARGET" DEI GLP-1RA

IL BLOCCO PROLIFERATIVO E IL RIMODELLAMENTO DEL PROCESSO DI ADIPOGENESI SUPPORTANO IL CALO DEL PESO

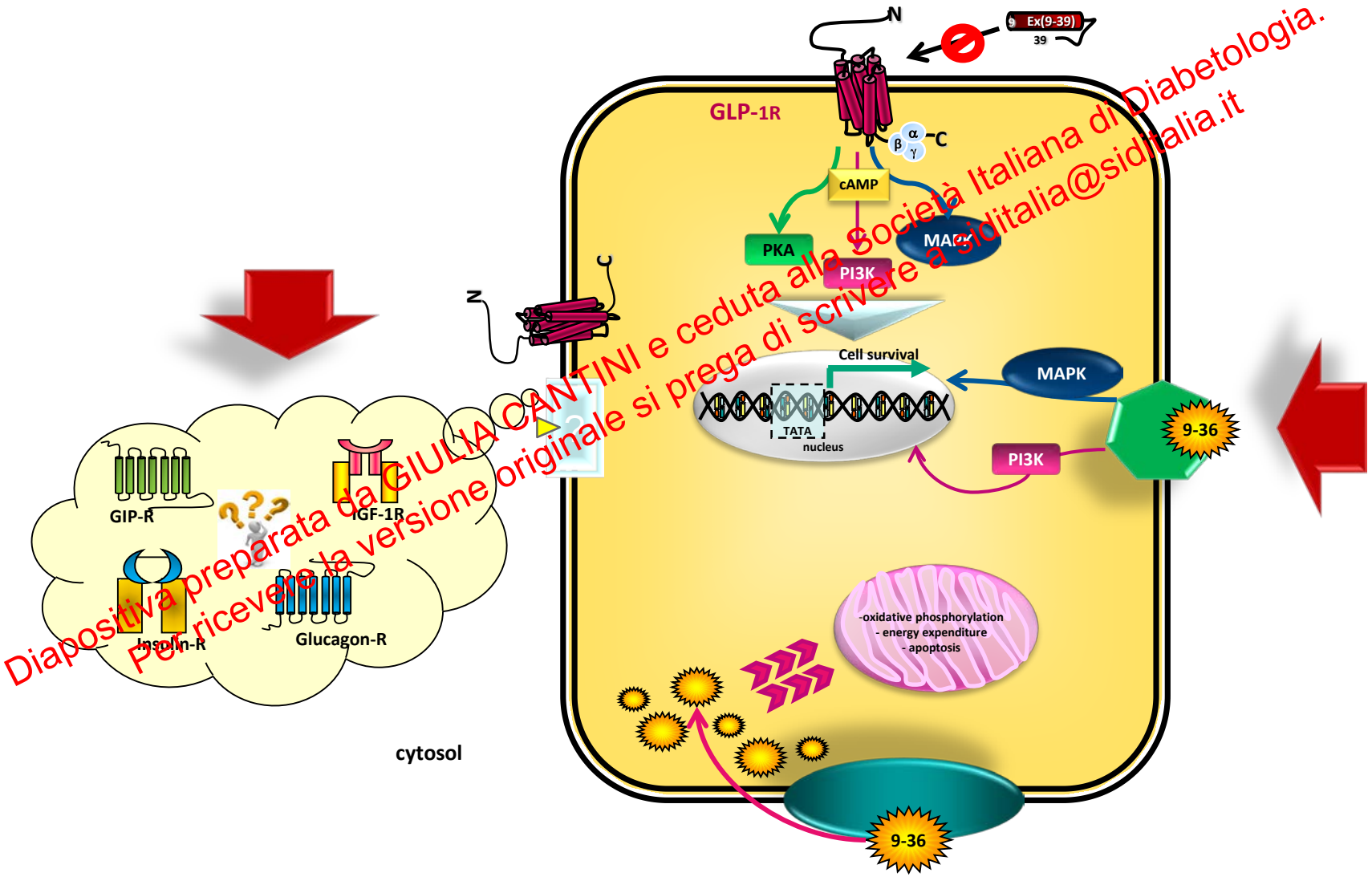
Meccanismo di azione dei GLP-1RA è mediato dal GLP-1R "classico"

Meccanismo di azione del GLP-1(9-36) è mediato da un recettore alternativo

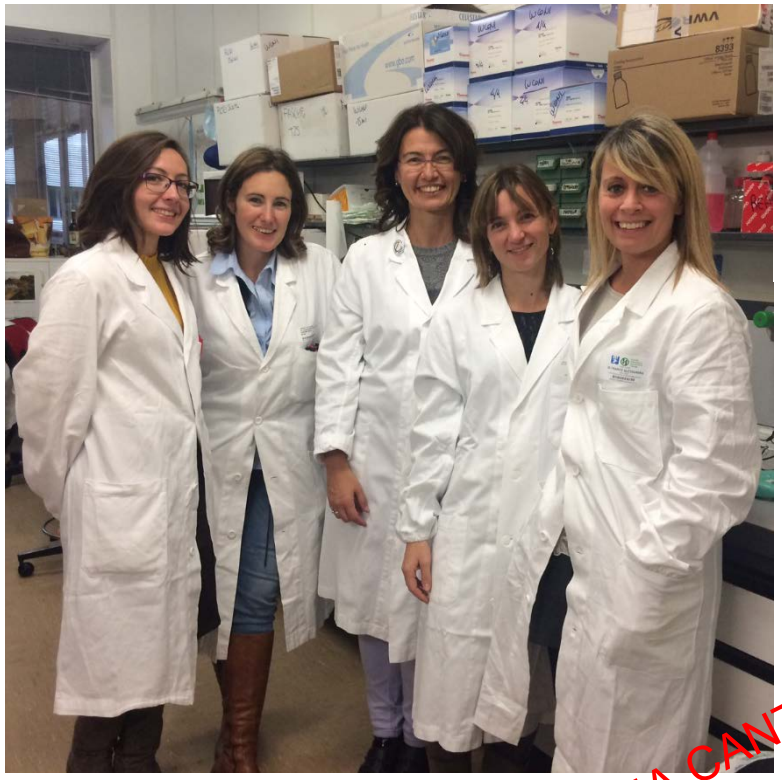
Parte degli effetti dei GLP-1RA sono mediati dal recettore del glucagone

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

RECETTORE "ALTERNATIVO" ?
O MECCANISMI "ALTERNATIVI" ?



Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

UNIVERSITA' DI FIRENZE

Dip. Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche

ENDOCRINOLOGIA

Prof.ssa Michaela Luconi

Prof. Carlo Rotella

Prof. Edoardo Mannucci

Prof. Gianni Forti

Dr.ssa Martina Trabucco

Dr.ssa Alessandra Di Franco

Dr.ssa Giada Poli

Dr.ssa Roberta Armignacco

CHIRURGIA GENERALE

Prof. Giuliano Perigli

CHIRURGIA BARIATRICA SMN

Dr. Marcello Lucchese

Dr. Giovanni Quartararo

GASTROENTEROLOGIA

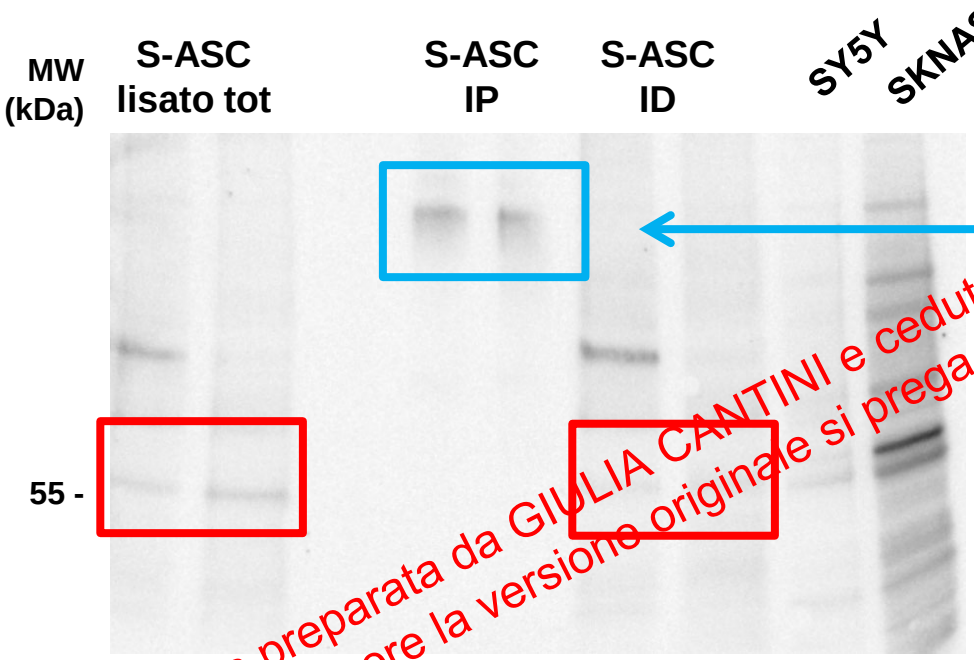
Dr. Tommaso Mello

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

PRIN 2015 (*prot. 2015ZTT5KB, Italian Ministry of University and Research*)

Ente Cassa di Risparmio di Firenze *(prot. 2014/0764;2013/0326)*

ESPRESSIONE DEL GLP-1R NEL TESSUTO ADIPOSO



GLP-1R

Immunoprecipitato GLP-1R+Ab

Proteina purificata da analizzare in spettrometria di massa

Diapositiva preparata da GIULIA CANTINI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it