



XI
EDIZIONE
PARMA
DIABETE

Il mio viaggio attraverso la plasticità beta cellulare

Francesca Cinti

MD, PhD

Centro per le Malattie Endocrine e Metaboliche
UCSC Policlinico A. Gemelli-Roma
Columbia University - NYC

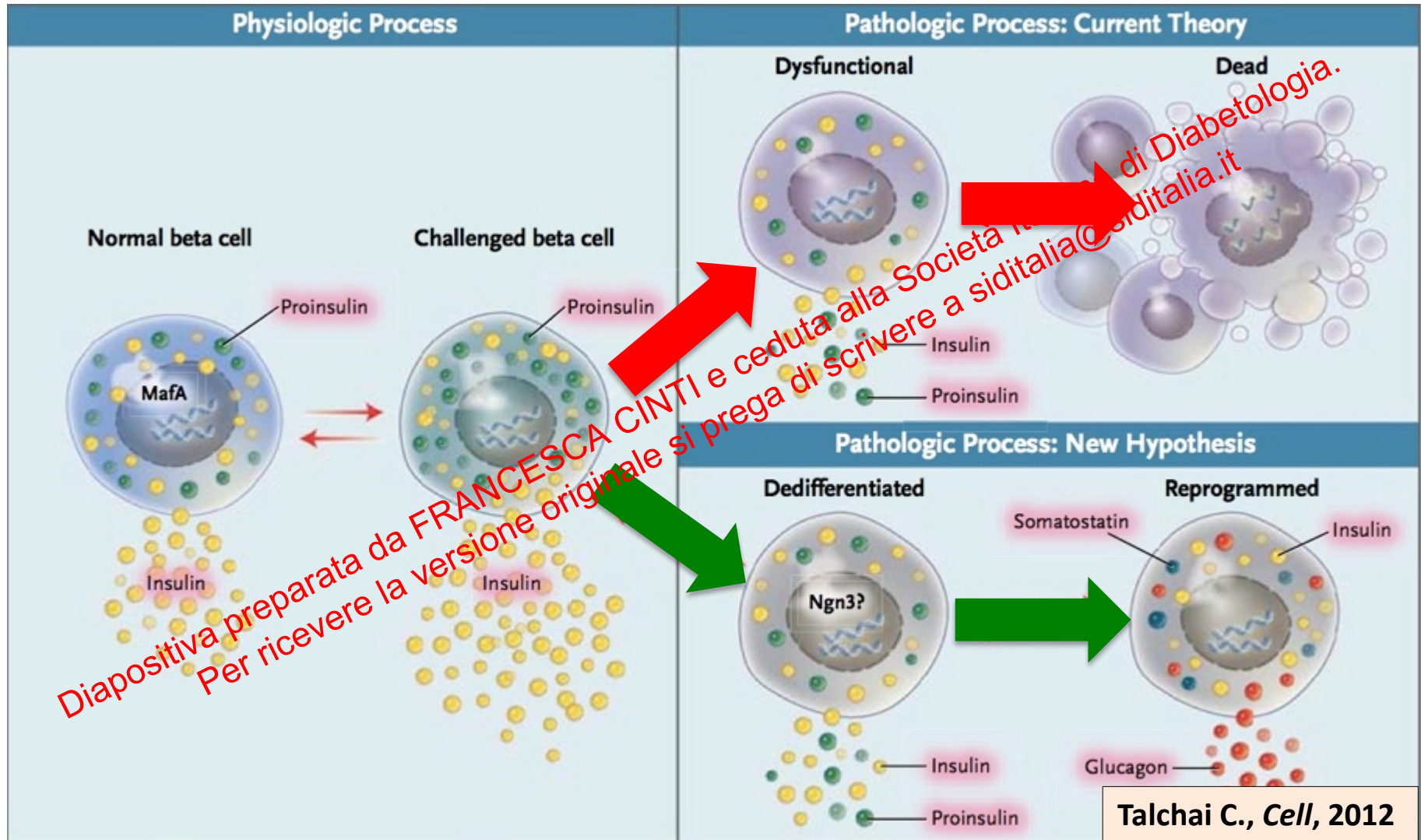
Gemelli



Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli
Università Cattolica del Sacro Cuore



La Dedifferenziazione come principale meccanismo nella patogenesi del Diabete di Tipo 2



Adpted from Dor Y., *NEJM*, 2013

La Dedifferenziazione Beta Cellulare avviene anche nell'uomo?

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

Donatori

Variable	Control	Diabetes	P
Number	<u>15</u>	<u>15</u>	NS
Gender (M/F)	9/6	7/8	NS
Age	56 ± 18	66 ± 17	NS
BMI (kg/m ²)	26 ± 6	29 ± 6	NS
Duration of diabetes	N/A	12 ± 8	N/A

Pancreas analizzato: testa e collo

([Wang et al., June 2013](#))

OPEN ACCESS Freely available online

 **PLOS** | ONE

Regional Differences in Islet Distribution in the Human Pancreas - Preferential Beta-Cell Loss in the Head Region in Patients with Type 2 Diabetes

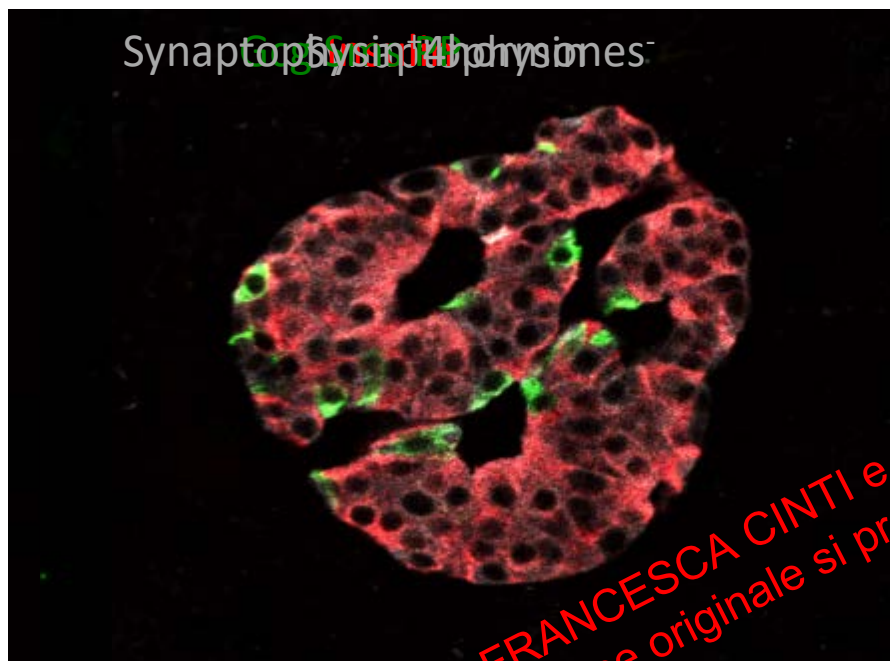
Xiaojun Wang^{1,2}, Ryosuke Misawa^{1✉a}, Mark C. Zielinski³, Peter Cowen³, Junghyo Jo^{4✉b}, Vipul Periwal⁴, Camillo Ricordi⁵, Aisha Khan⁵, Joel Szust⁵, Junhui Shen^{3✉c}, J. Michael Millis¹, Piotr Witkowski¹, Manami Hara^{3*}

Caratteristiche della Beta cellula Dedifferenziata nell'animale

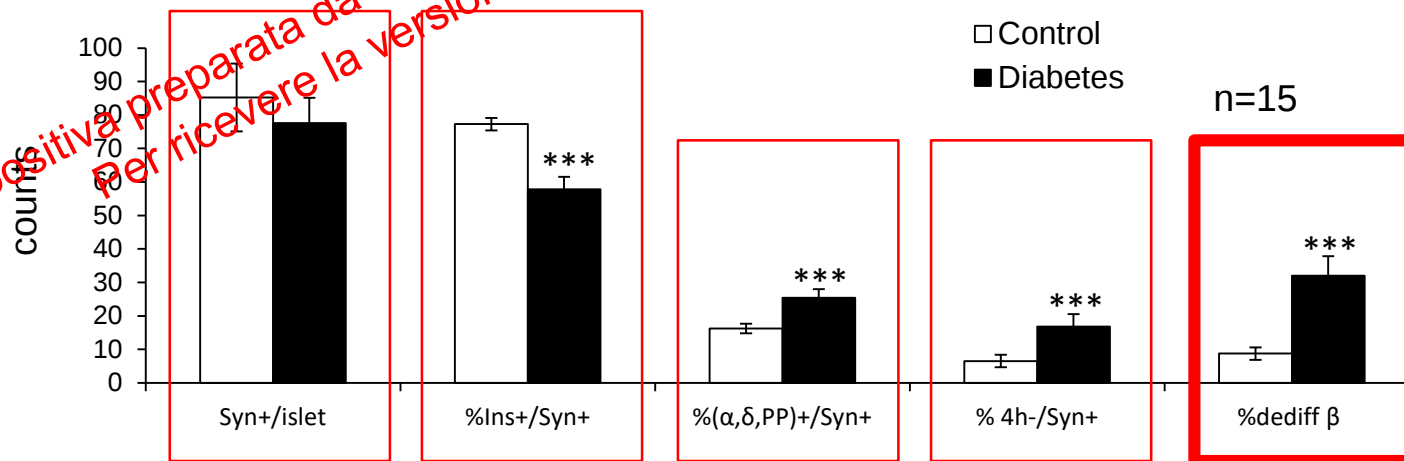
- La Beta cellula Dedifferenziata **NON** contiene **INSULINA**, o altri **ormoni** pancreatici (per escludere cellule transdifferenziate)
- Mantiene le **caratteristiche** di cellula **endocrina**, dimostrato dall'immunoreattività per markers quali **Sinaptofisina** e **Cromogranina A**
- Fattori di trascrizione fondamentali nella beta cellula **FOXO1**, **NKX6.1**, **and PDX1** – **sono alterati** (non espressione, traslocazione nucleo/citoplasma)
- **L'espressione ectopica** di tali **fattori di trascrizione** in cellule non-Beta, indica **transdifferenziazione**

LA DEDIFFERENZIAZIONE COLPISCE IL 30% DELLE BETA CELLULE DEI SOGGETTI DIABETICI

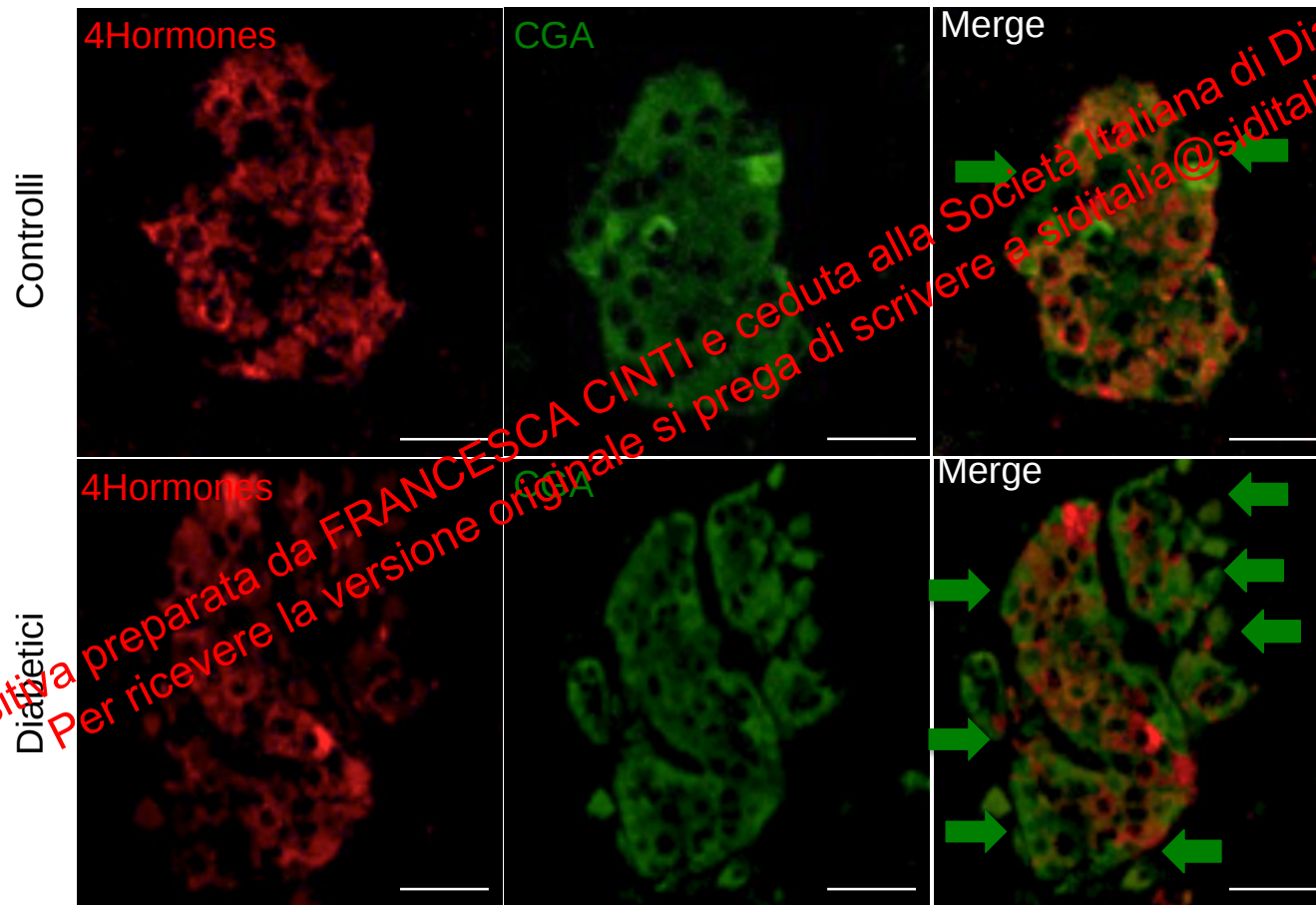
Controlli



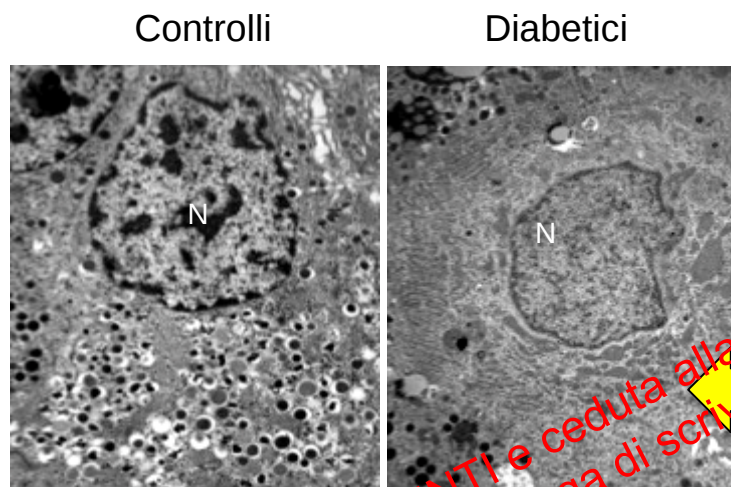
Diabetici



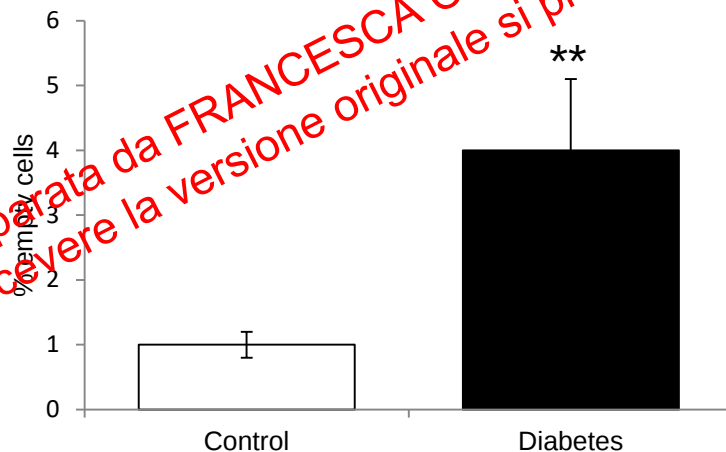
Cellule Chromogranin A+/4hormones-aumentano nelle isole dei diabetici



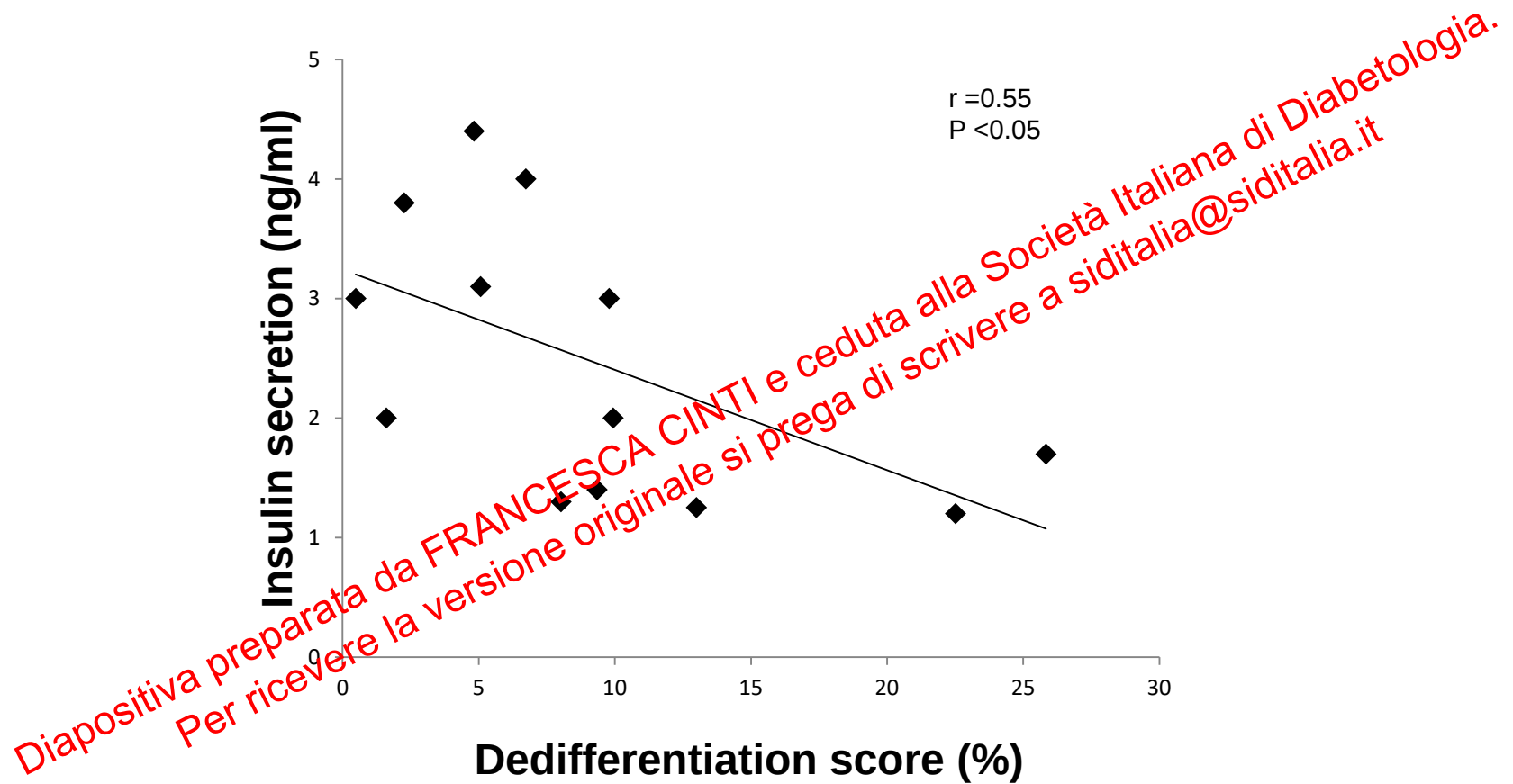
La Microscopia Elettronica conferma l'aumento di "Empty cell" nelle isole dei soggetti diabetici



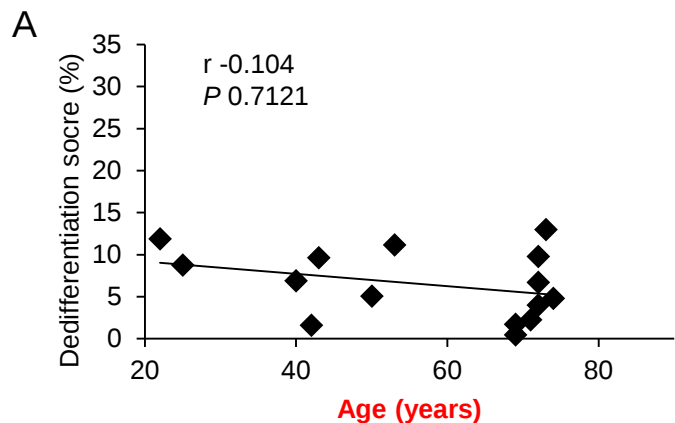
Empty cell



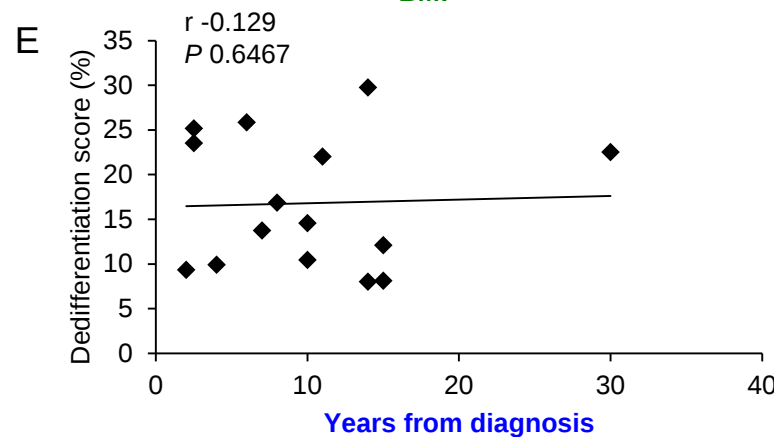
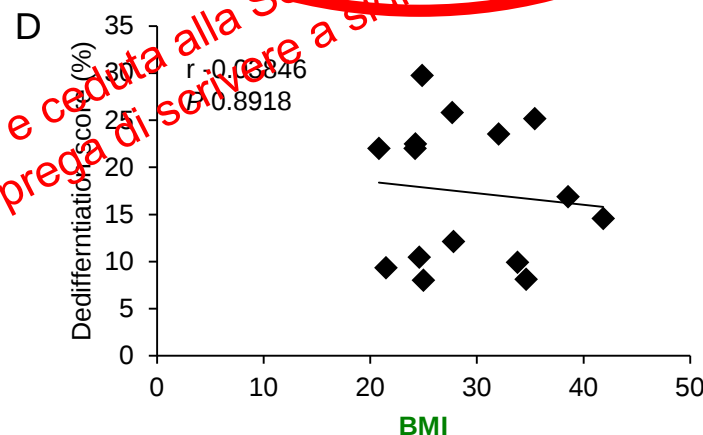
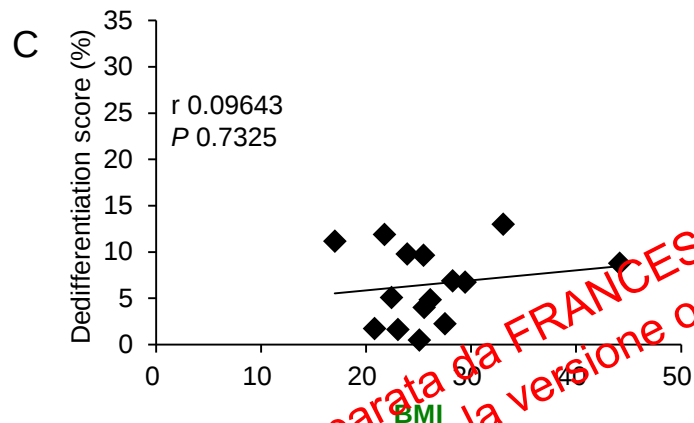
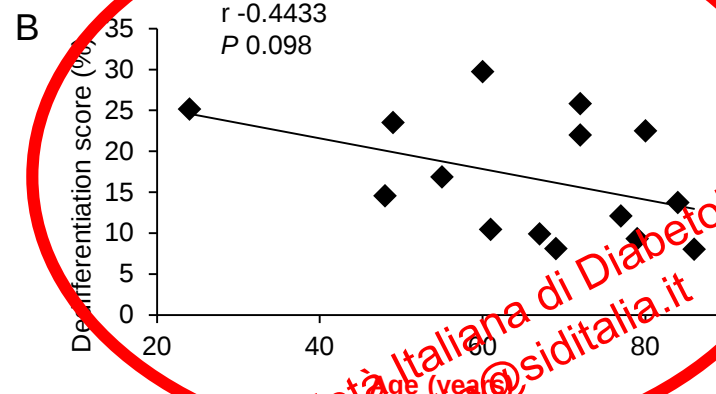
La secrezione di insulina è inversamente correlata al de-differentiation index (in vitro experiment)



Controlli



Diabetici



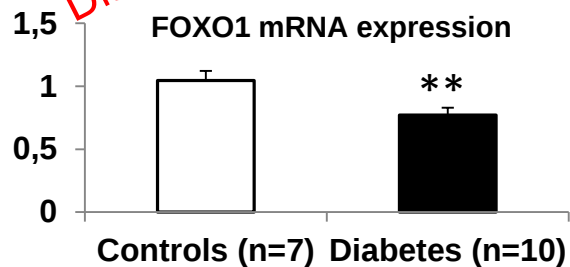
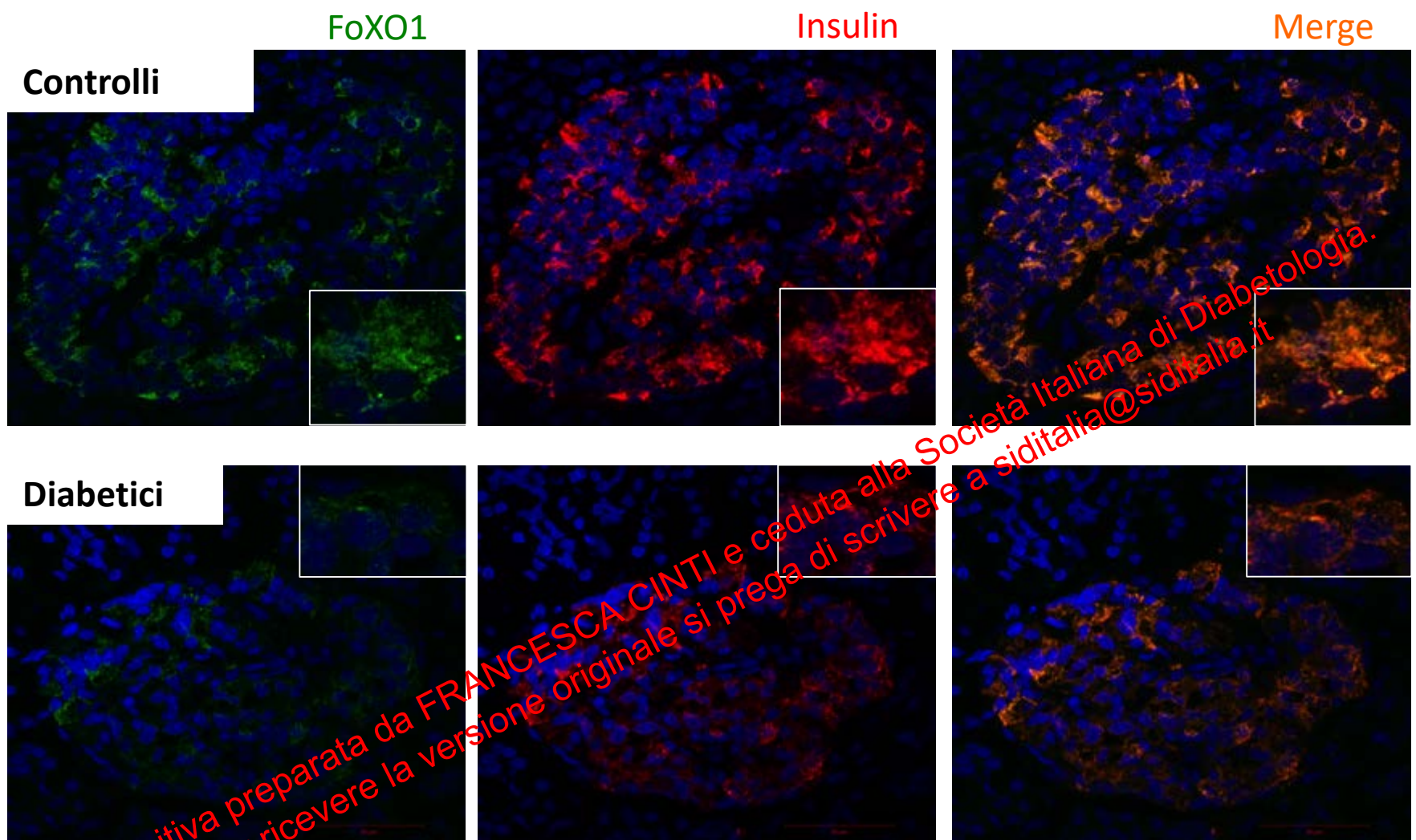
Diapositiva preparata da FRANCESCA CINTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Conclusioni prima parte

- La Beta Cellula dedifferenziata non contiene insulina
(Immunofluorescenza – Microscopia elettronica)
- Mantiene le caratteristiche di cellula endocrina
(Positività per Synaptophysin)
- La secrezione di insulina è inversamente correlata con il Dedifferentiation score
(In vitro studies-Islets isolation and insulin secretion studies)

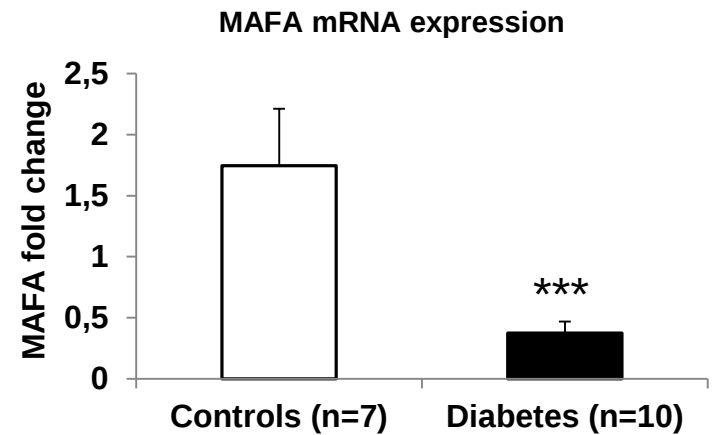
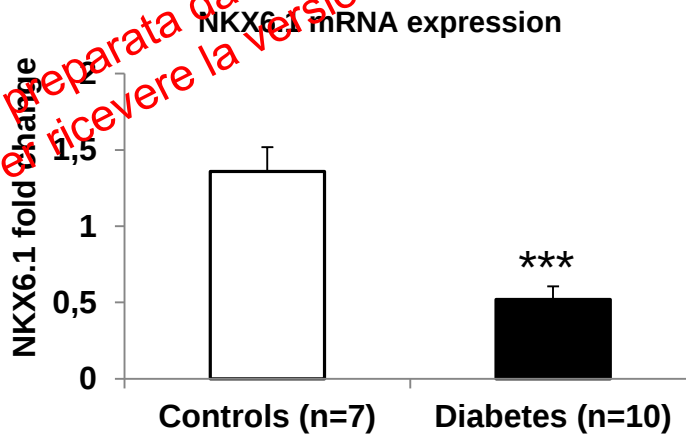
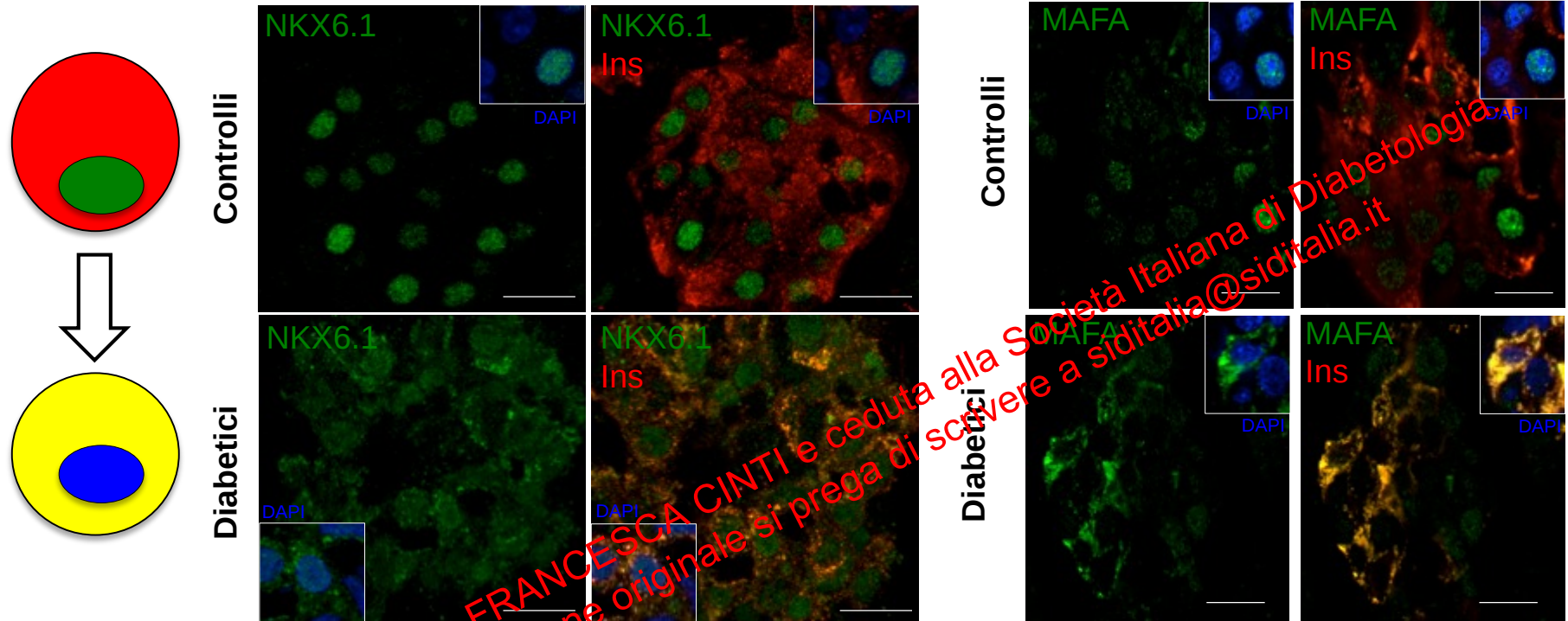
Quali sono le caratteristiche della Beta Cellula Dedicata nell'uomo?

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



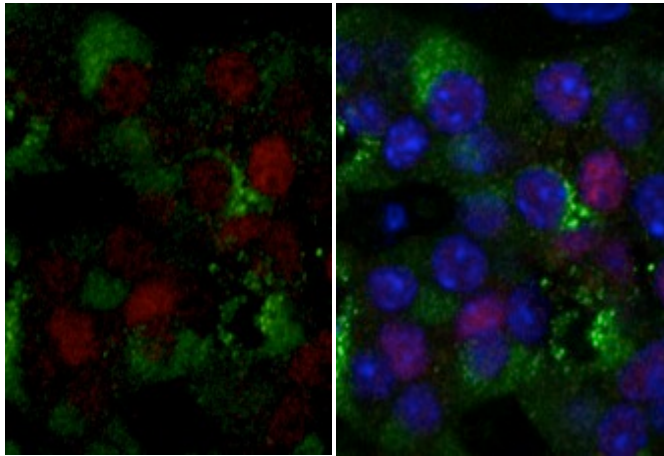
**FoXO1 ha lo stesso pattern di espressione
sia nell'uomo sia nel topo:
è un marker della Beta Cellula
e si riduce nel Diabete di tipo 2**

L'espressione di NKX6.1 e MafA si riduce nei diabetici e i fattori di trascrizione traslocano nel citoplasma, dove sono inattivi

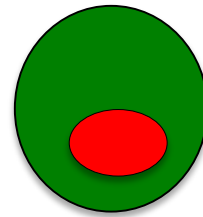
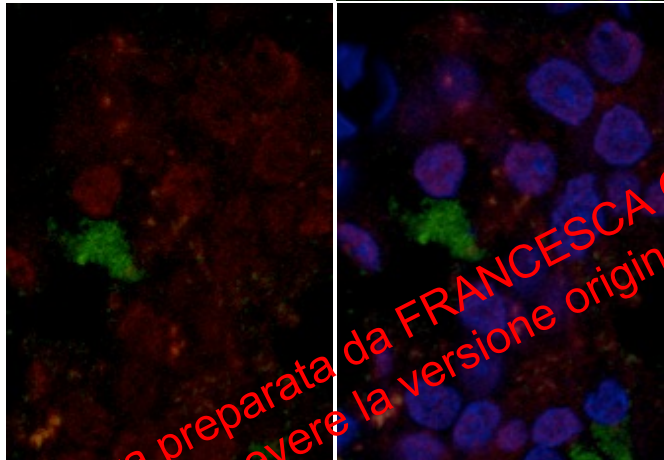


FoXO1 NKX6.1 DAPI

Controlli

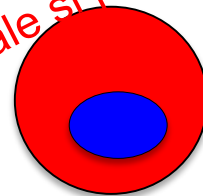


Diabetici



FOXO1⁺
NKX6.1^{+nucl}

La perdita di FoXO1 come nel topo,
condurre ad un'incapacità di
mantenere NKX6.1 in forma attiva
nel nucleo



FOXO1⁻
NKX6.1^{+cyt}

Perdita della maturità Beta Cellulare

L'espressione citoplasmatica di NKX6.1 potrebbe
rappresentare un marker per seguire il destino della
beta cellula

Espressione dei Progenitor Markers

La beta cellula dedifferenziata del topo esprime progenitor markers quali Neurog3, Oct4, Nanog e L-Myc (Talchai, Cell 2012)

L'Aldeide deidrogenasi (ALDH1a3) rappresenta un nuovo progenitor marker del processo di dedifferenziazione

JYK Muller, Nature Communication 2016

ALDH1a3 è espressa nelle isole umane

T1D Beta Cell Gene Atlas



ALDH1a3 aumenta in FoxO KO islets

<u><i>b-triple FoxO</i></u> (RtKO)				<u><i>progenitor-triple FoxO</i></u> (PtKO)			
Gene symbol	RefSeq	P-value	Fold change	Gene symbol	RefSeq	P-value	Fold change
Serpina7	NM_177920	0.0057	6.10	Serpina7	NM_177920	0.005	11.23
Rsl1	NM_001013769	0.0645	4.99	Penk	NM_001013769	1.42x10 ⁻⁵	9.24
Tcea1	NM_011541	0.0804	4.72	Aldh1a3	NM_053080	5.18x10 ⁻⁷	5.59
Ly96	NM_016923	0.0210	3.54	Acass	NM_013930	0.0008	5.29
Asb11	NM_026853	0.0011	2.93	Rsl1	NM_001013769	0.0645	4.63
Tc2n	NM_001082976	0.0428	2.91	Fabp3	NM_010174	0.0070	3.49
Aldh1a3	NM_053080	5.18x10 ⁻⁷	2.87	Zfp423	NM_033327	5.70x10 ⁻⁶	3.40
Fabp3	NM_010174	0.0070	2.70	Ly96	NM_016923	0.0210	3.39
Bet1	NM_009748	0.0558	2.69	Asb11	NM_026853	0.0011	3.36
Naa38	NM_133939	0.04334	2.68	Tmed6	NM_025458	0.0097	3.29

Adapted from Ja Young Kim-Muller

JYK Muller, Nature Communication 2016

STEM CELLS

CANCER STEM CELLS

Aldehyde Dehydrogenase Activity of Breast Cancer Stem Cells is Primarily Due to Isoform ALDH1A3 and Its Expression is Predictive of Metastasis

PAOLA MARCATO,^a CHERYL A. DEAN,^a DA PAN,^a RAKHNA ARASLANOVA,^a MEGAN GILLIS,^b MADALYN JOSHI,^b LUCY HELYER,^b LUZHE PAN,^a ANDREW LEIDAL,^a SHASHI GUJAR,^a CARMAN A. GIACOMANTONIO,^a PATRICK W. K. LEE^{a,c}

Departments of ^aMicrobiology and Immunology, ^bSurgery and ^cPathology, Faculty of Medicine, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada

Cancer Letter 2012

Genome-wide DNA methylation profiling identifies ALDH1A3 promoter methylation as a prognostic predictor in G-CIMP– primary glioblastoma

Wei Zhang^{a,1}, Wei Yan^{a,1}, Gan You^a, Zhaoshi Bao^a, Yongzhi Wang^a, Yanwei Liu^a, Yongping You^b, Tao Jiang^{a,*}

IJC 2013

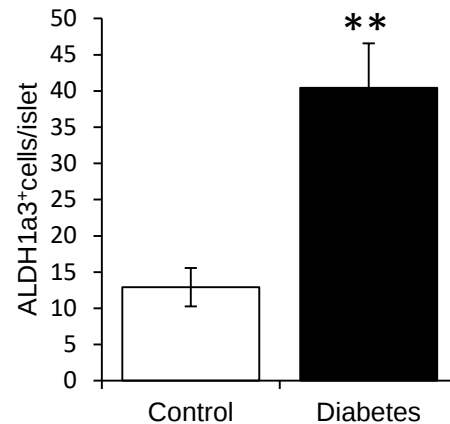
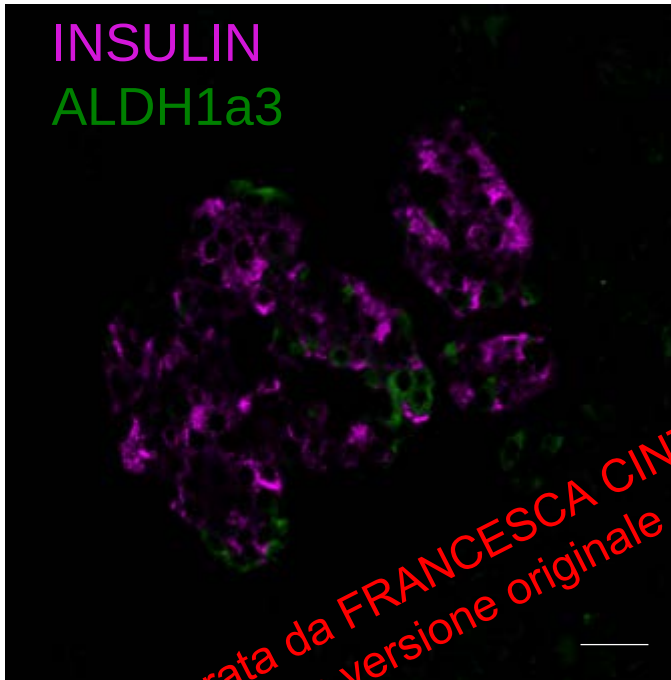
HOXA9, ISL1 and ALDH1A3 methylation patterns as prognostic markers for nonmuscle invasive bladder cancer: Array-based DNA methylation and expression profiling

Yong-June Kim¹, Hyung-Yoon Yoon¹, Ji Sang Kim¹, Ho Won Kang¹, Byung-Dal Min¹, Seon-Kyu Kim², Yun-Sok Ha^{1,3}, Isaac Yi Kim³, Keun Ho Ryu⁴, Sang-Cheol Lee¹ and Wun-Jae Kim¹

ALDH1a3 non è espressa da Insulin⁺cells e aumenta nelle isole dei diabetici

Controlli

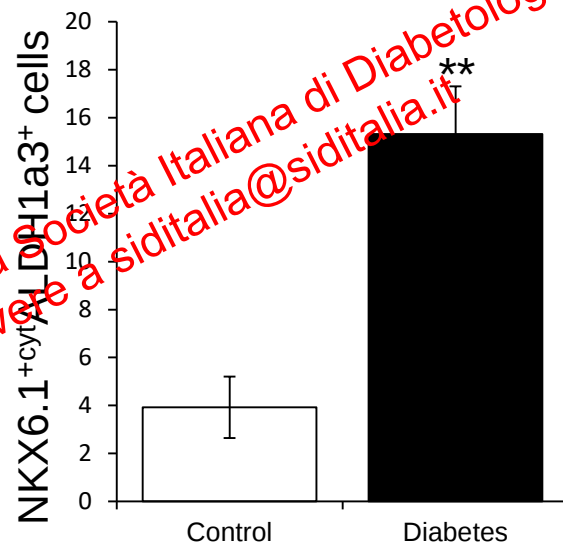
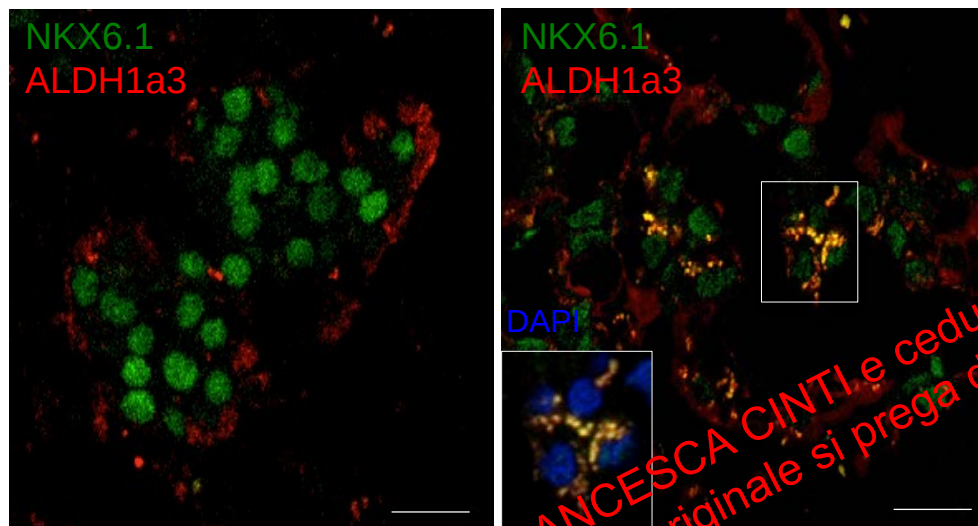
Diabetici



ALDH1A3 è espressa dalle beta cellule dedifferenziate i.e. cellule con NKX6.1 nel citoplasma negative per insulina

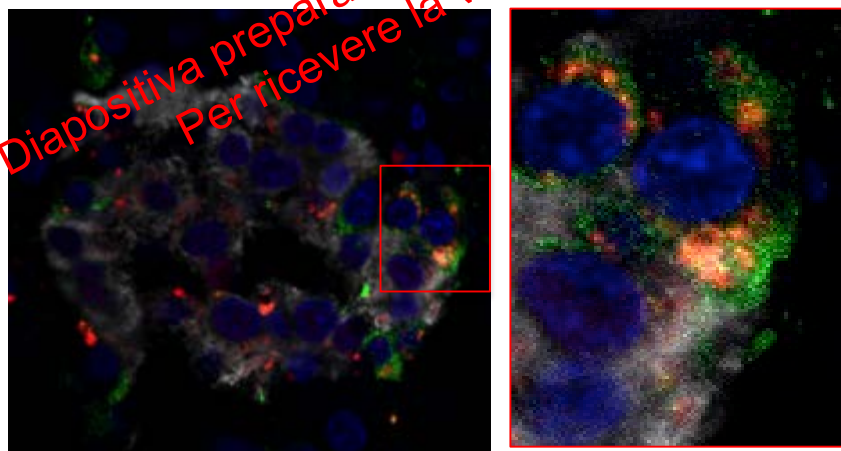
Controlli

Diabetici



INSULIN ALDH1a3 NKX6.1 DAPI

Diabetici



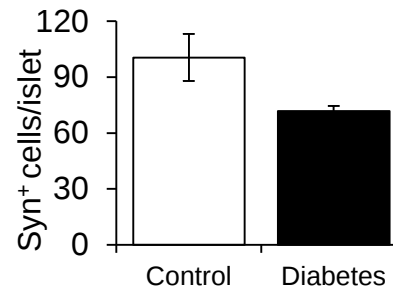
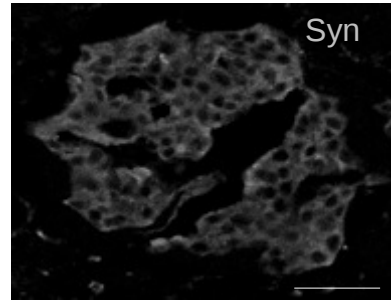
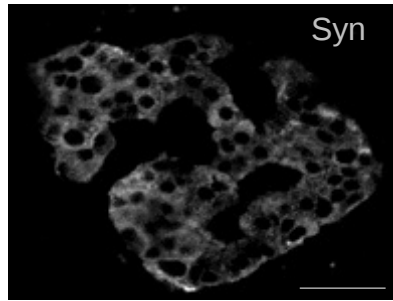
- **NEGATIVA PER INSULINA**
- **NKX6.1 INATTIVATO NEL CITOPLASMA (BETA CELL ALTERATA)**
- **ALDH1a3 POSITIVA (PROGENITOR MARKER)**

Le Beta cellule umane transdifferenziano in alfa cellule anche nell'uomo come nel topo?

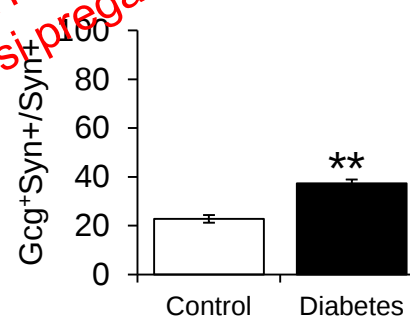
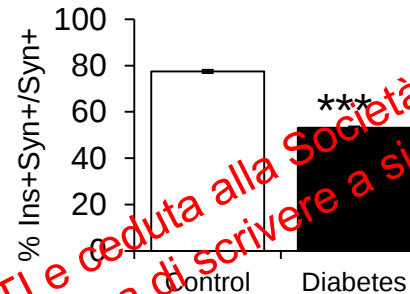
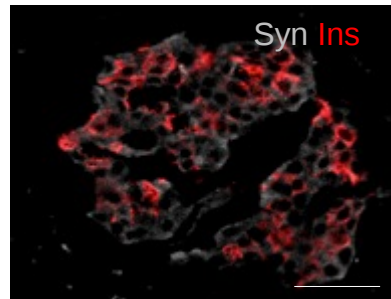
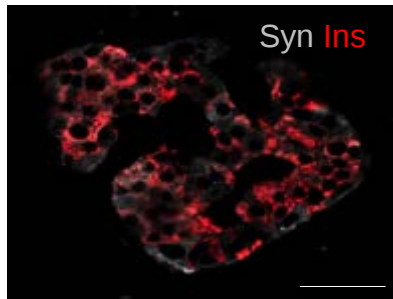
Diapositiva preparata da FRANCESCA CINTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siiditalia@siiditalia.it

Control

Diabetes



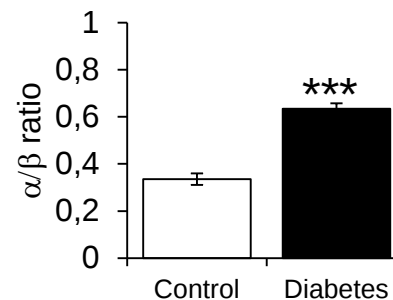
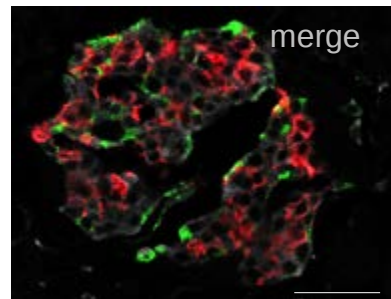
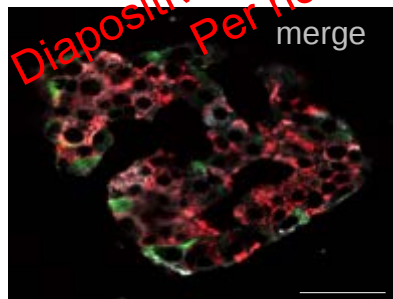
Sinaptofisina



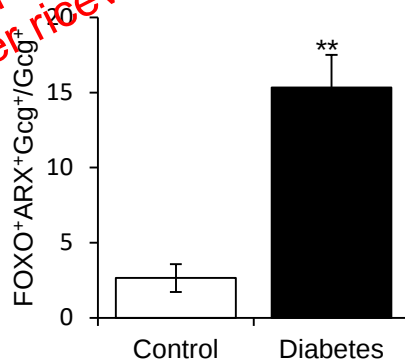
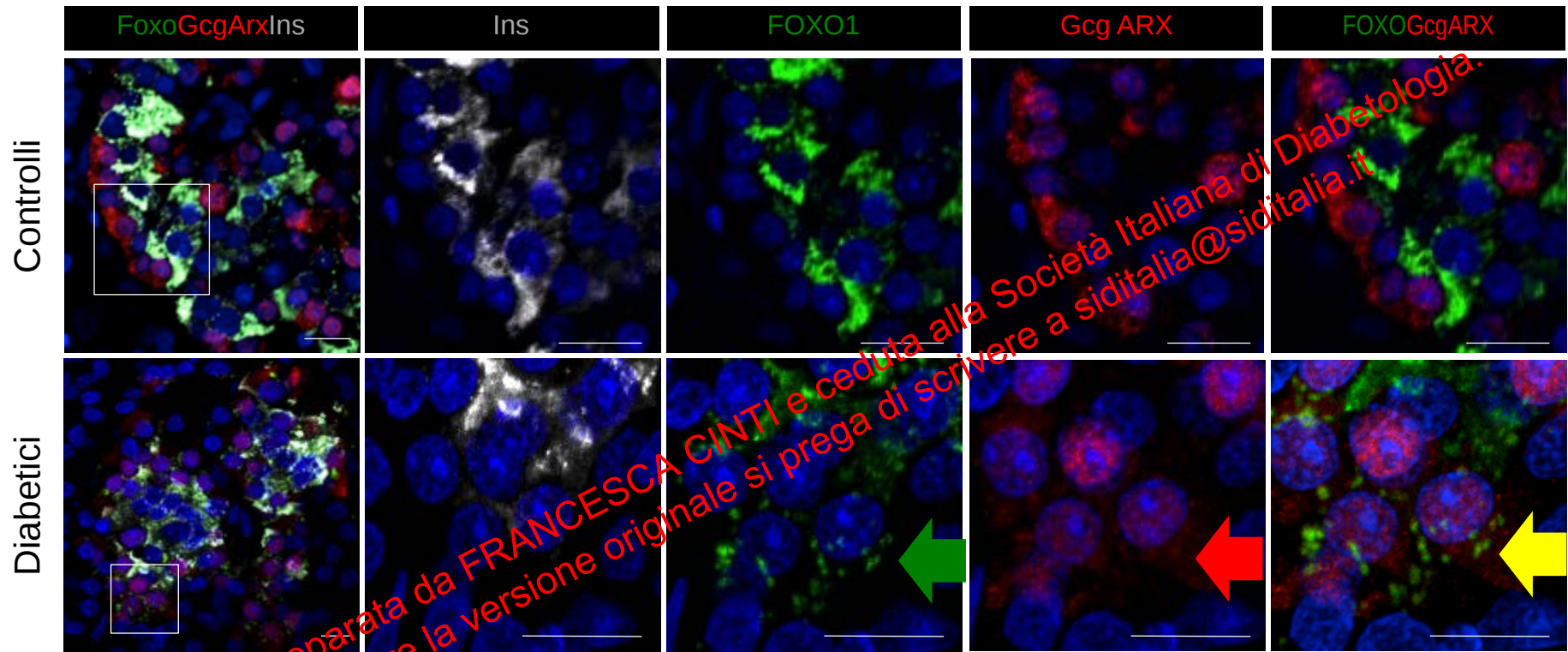
Glucagone



Assoluto, non
relativo, aumento
delle cellule alpha
nei diabetici



Espressione ectopica di FoxO1 in cellule Glucagone⁺ È un segno di transdifferenziazione beta→alpha cellulare



- **INSULINA NEGATIVA**
- **FOXO1 CITOPLASMATICO IN DEGRADAZIONE (BETA CELLULA ALTERATA)**
- **POSITIVA PER GLUCAGONE E ARX (ALFA CELLULA MATURA)**

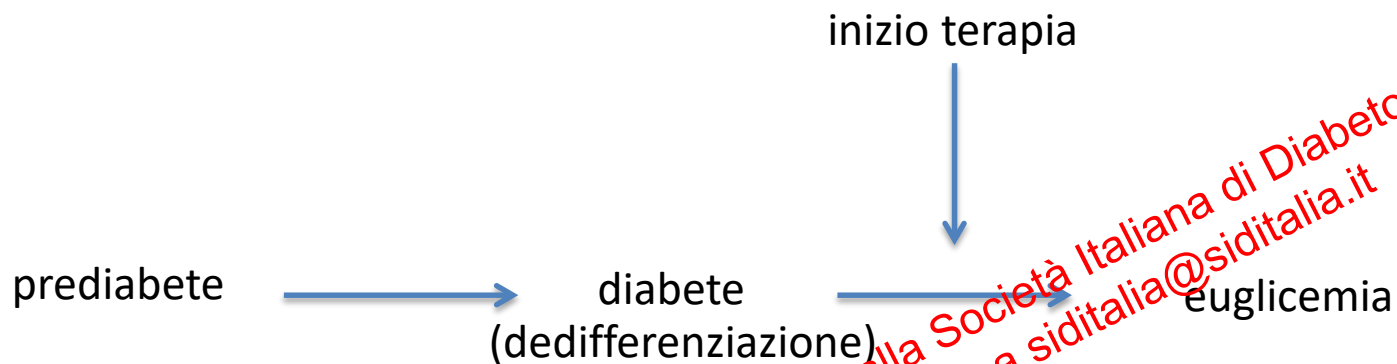
Conclusioni seconda parte

- Anche nell'uomo la Dedifferenziazione beta cellulare potrebbe rappresentare il principale meccanismo del fallimento beta cellulare
- La transdifferenziazione beta → alfa cellulare potrebbe spiegare l'iperglucagonemia che si riscontra nei soggetti diabetici

Implicazioni terapeutiche

- Preferire un immediato "riposo" della beta cellula è utile per preservarne la funzione
- Trattamenti per il diabete di tipo 2 dovrebbero mirare a ripristinare la differenziazione delle beta cellule addormentate

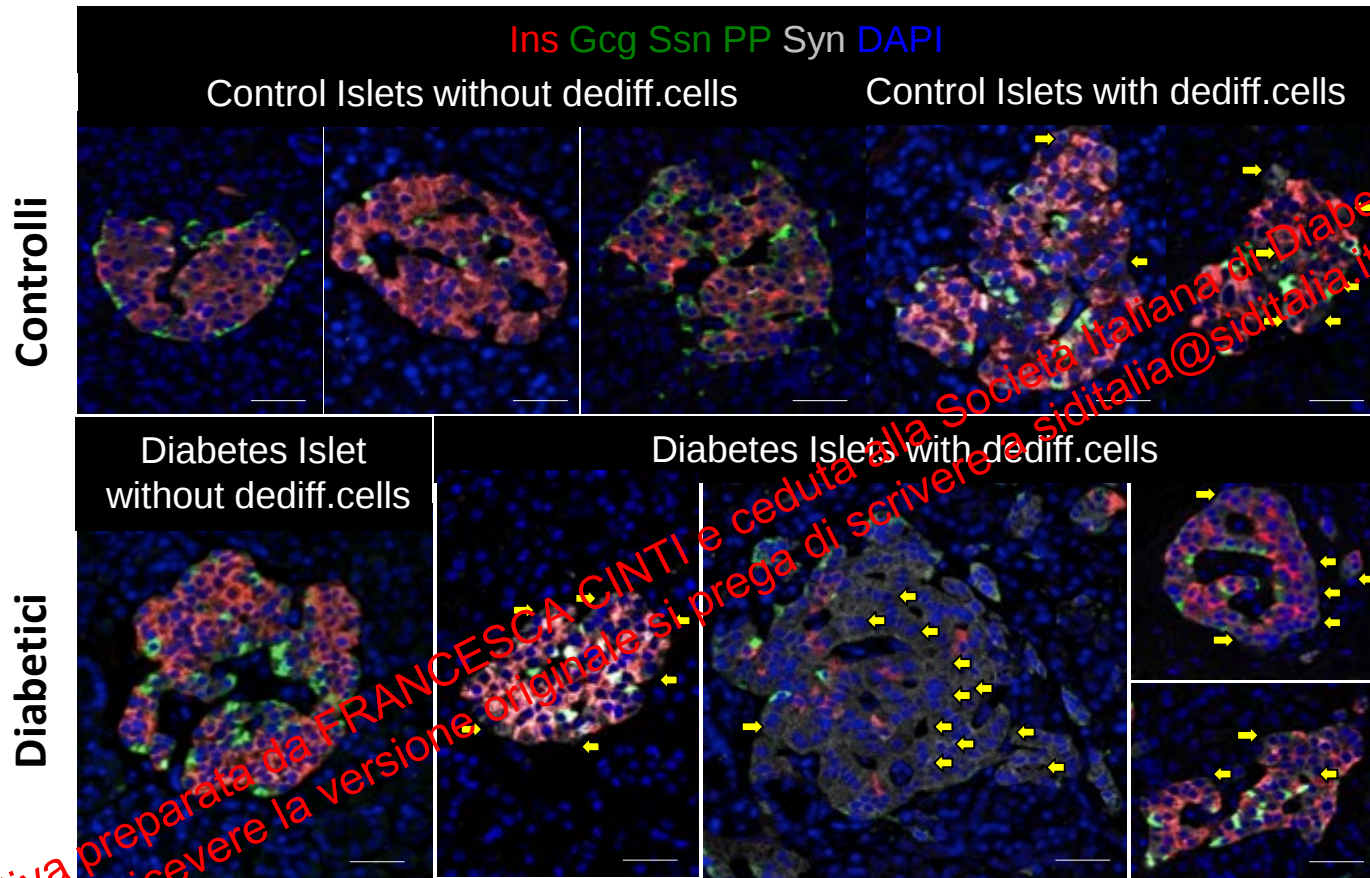
Per rallentare il declino beta cellulare



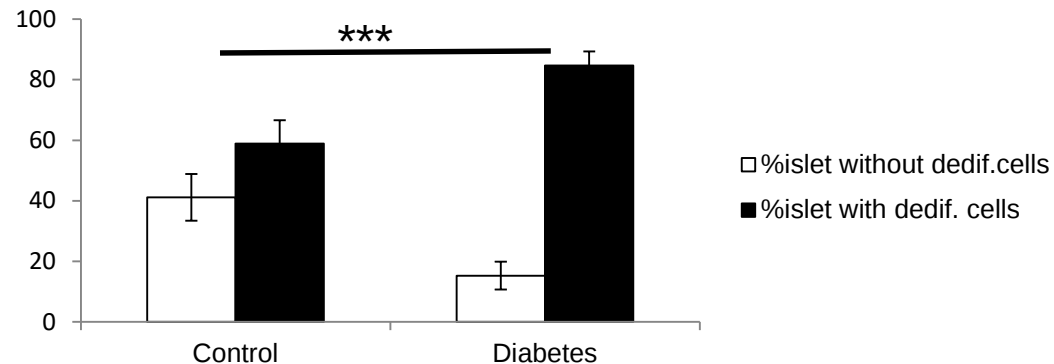
Diapositiva preparata da FRANCESCA CINTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it



Il processo di dedifferenziazione è già presente nelle isole dei soggetti NON diabetici

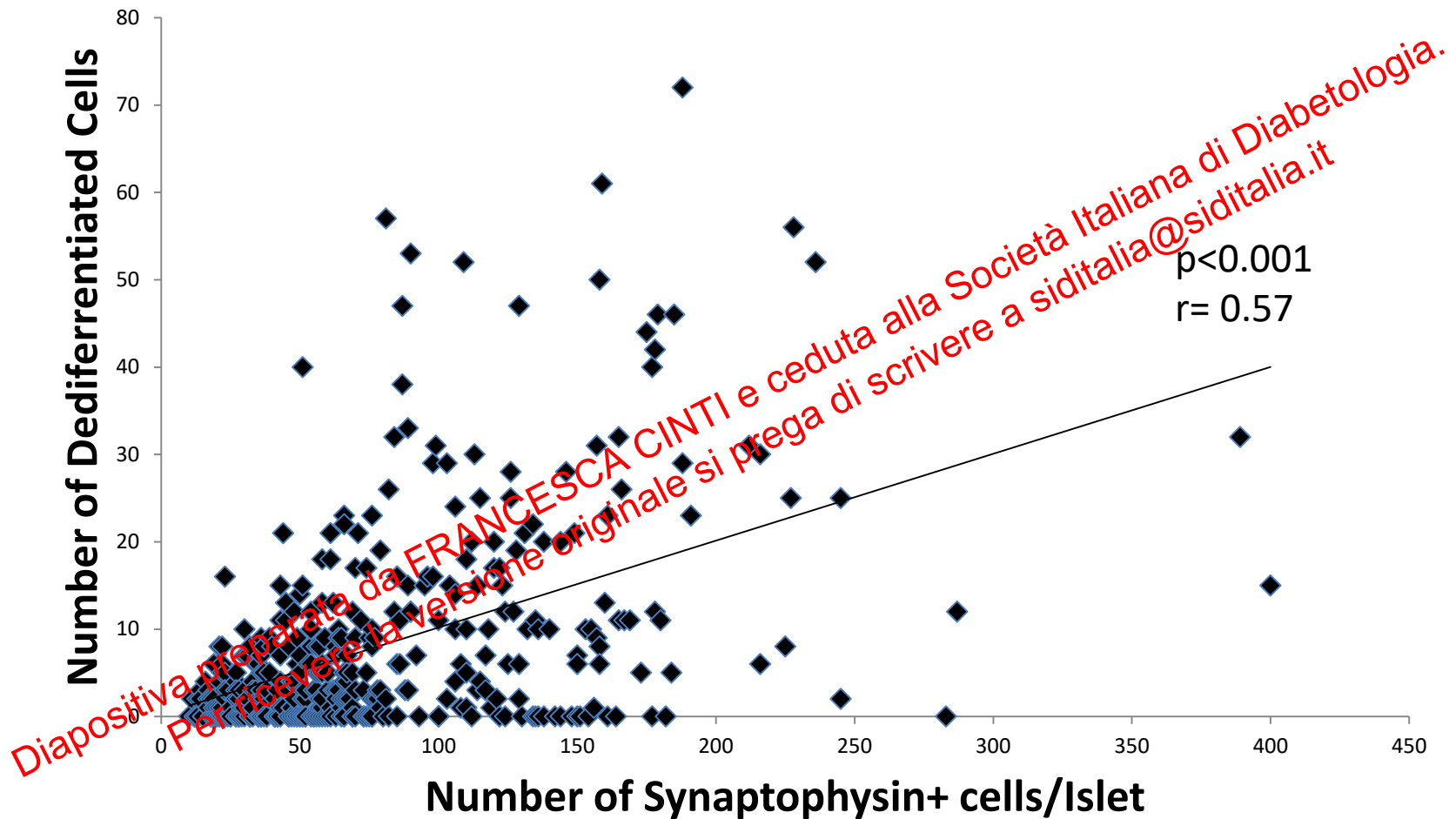


Cellule dedifferenziate
sono presenti nel **60%**
delle isole dei soggetti
NON DIABETICI



Unpublished

Nelle isole più grandi ci sono più cellule dedifferenziate



Che cosa innesca il processo di dedifferenziazione?

**Ruolo dell'innervazione nella
dedifferenziazione Beta Cellulare**

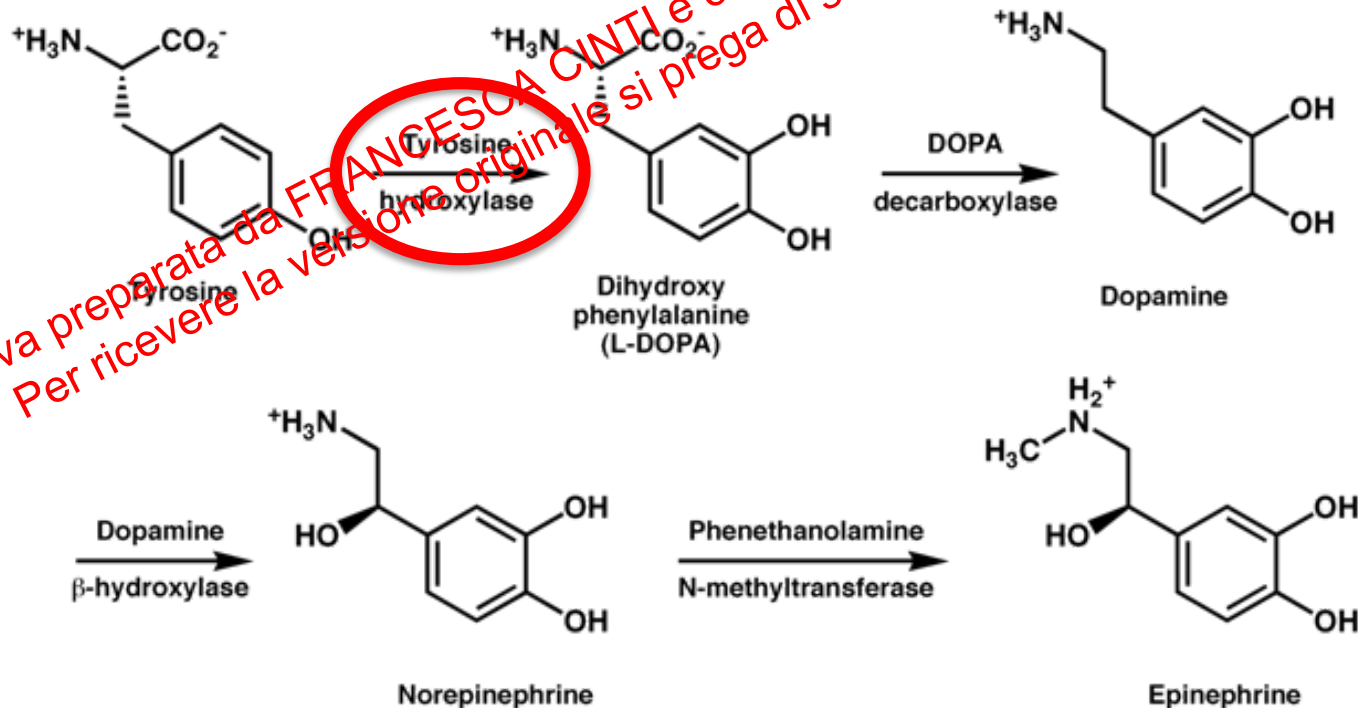
Diapositiva preparata da FRANCESCA CINTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

- Abbiamo studiato due ceppi di topi geneticamente obesi (ob/ob e db/db) in due fasi differenti nello sviluppo della loro obesità e diabete (6 wk-15wk)
- Ci siamo concentrati sulle fibre adrenergiche alla luce del potente effetto inibitorio della stimolazione noradrenergica sulla secrezione insulinica

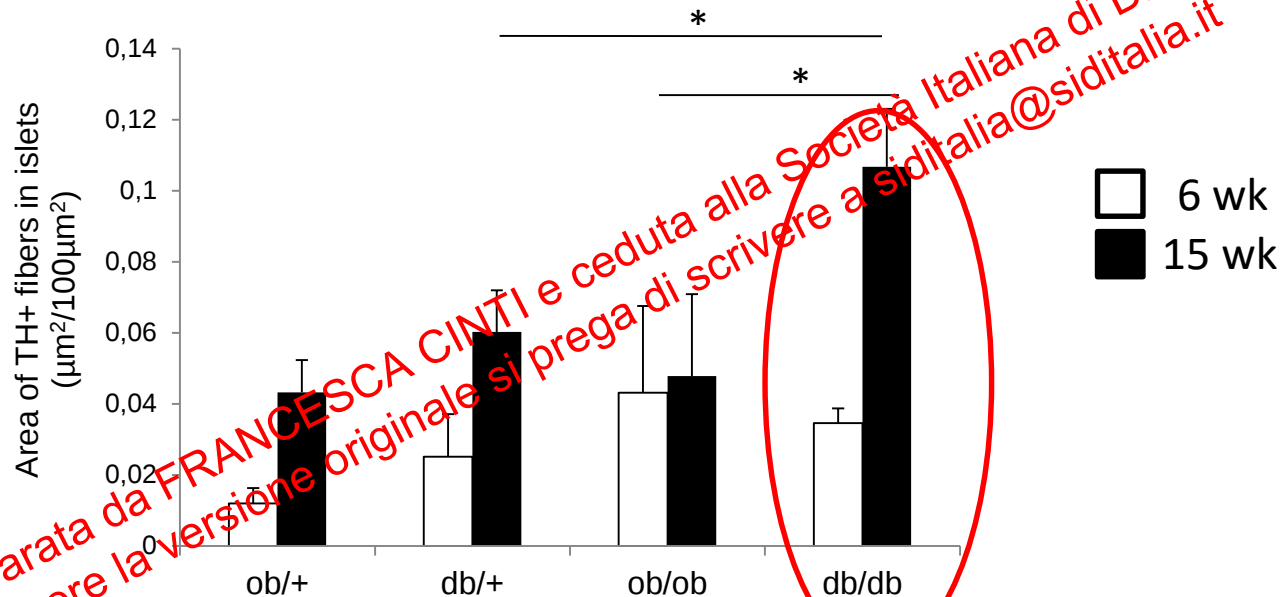
Diapositiva preparata da FRANCESCA CINTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
Per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Metodi

- **Immunoistochimica:** Tirosina Idrossilasi (TH) è stata utilizzata come marcatore di cellule e fibre contenenti noradrenalina
- **Microscopia elettronica:** quantificazione delle strutture sinaptoidi a contatto con le cellule beta

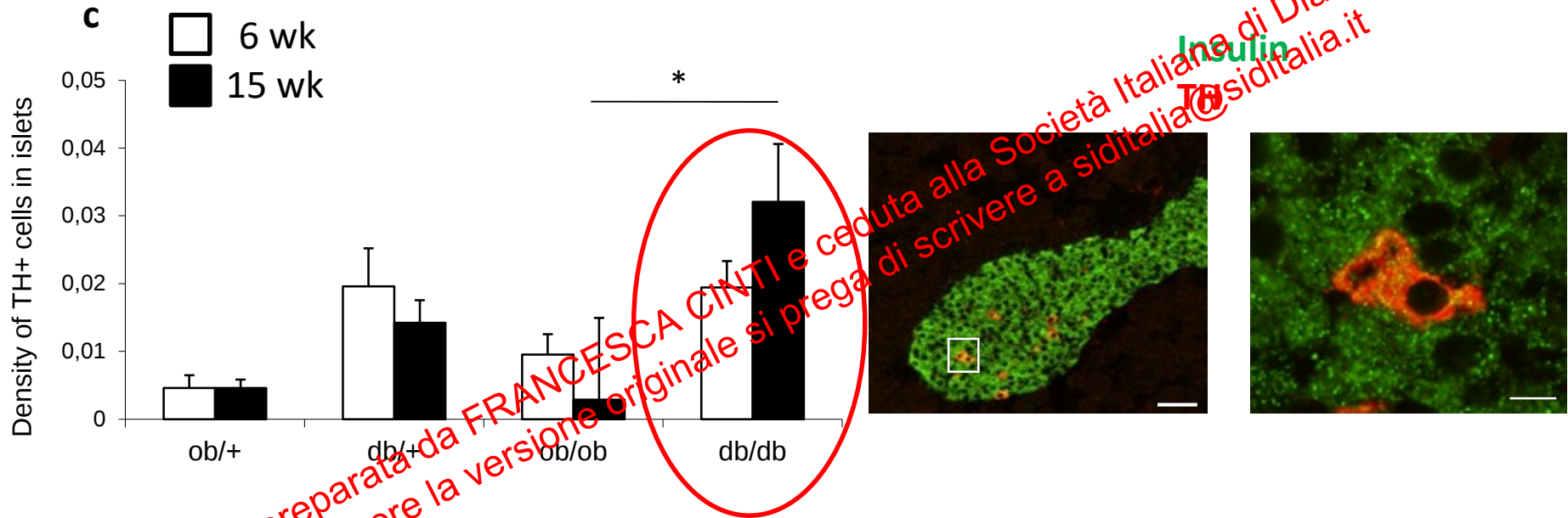


Significativo aumento dell'area delle fibre TH+ nei db/db rispetto ai controlli



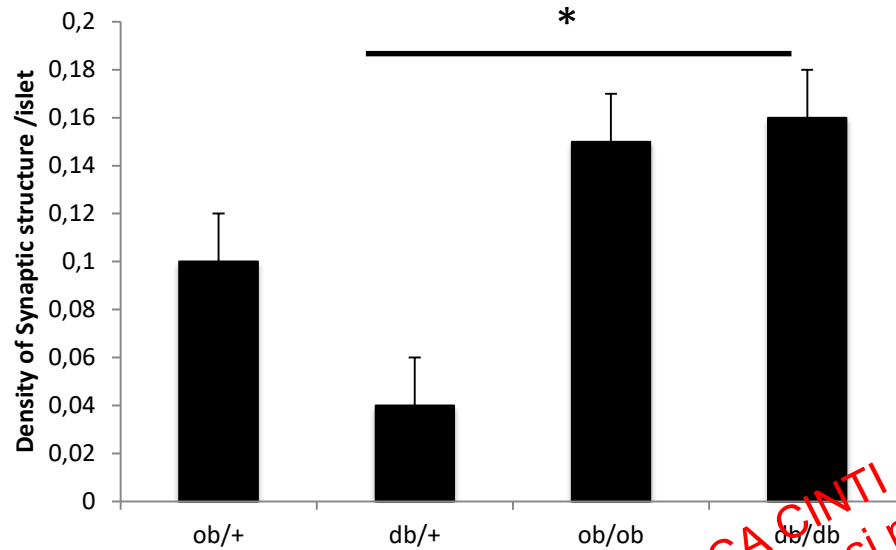
TH= tyrosine hydroxylase

Significativo aumento di cell.TH+ nei db/db rispetto ai controlli

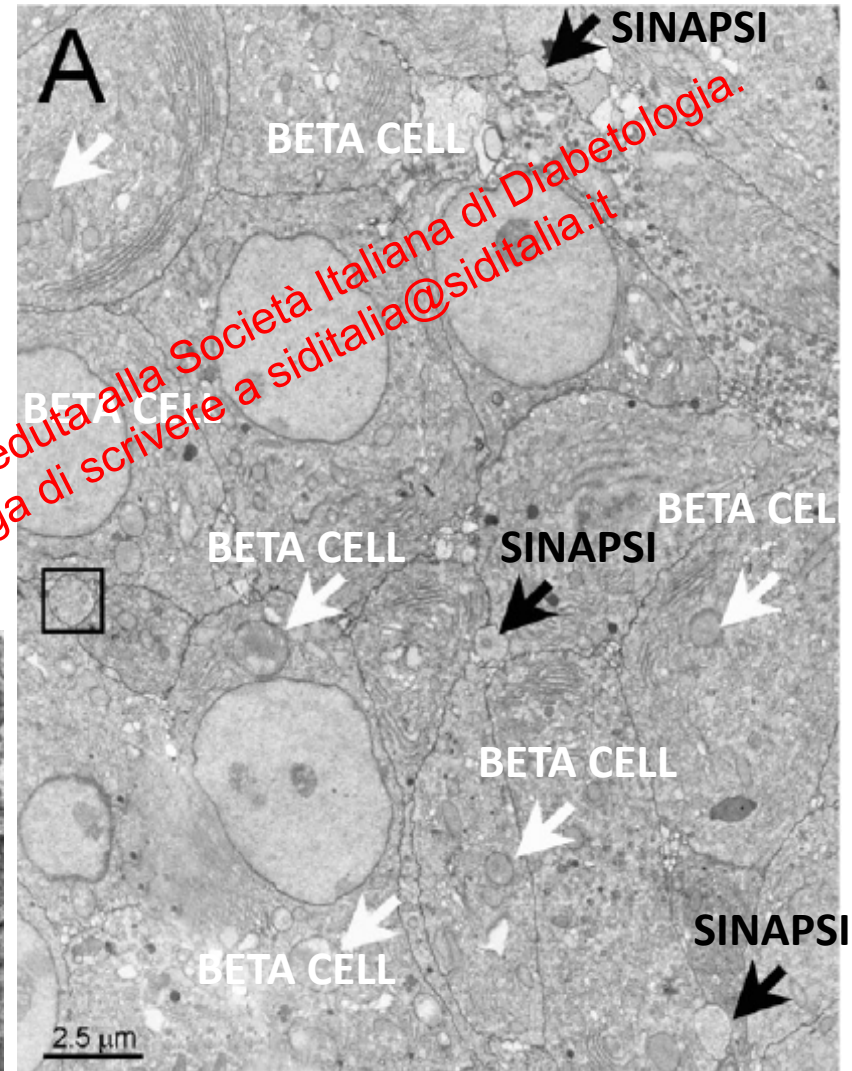
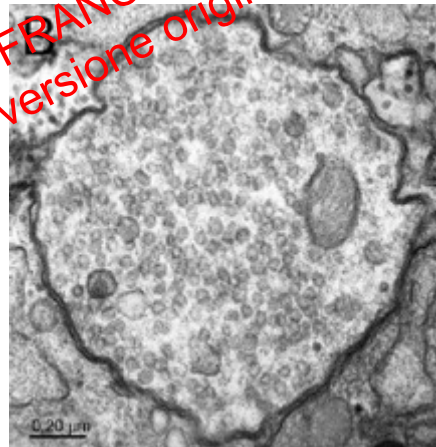


Significato delle cellule TH+ è ad oggi sconosciuto

Le strutture sinaptoidi a contatto con le beta cellule aumentano negli animali diabetici



Le fibre noradrenergiche sono coinvolte nel processo di differenziazione?



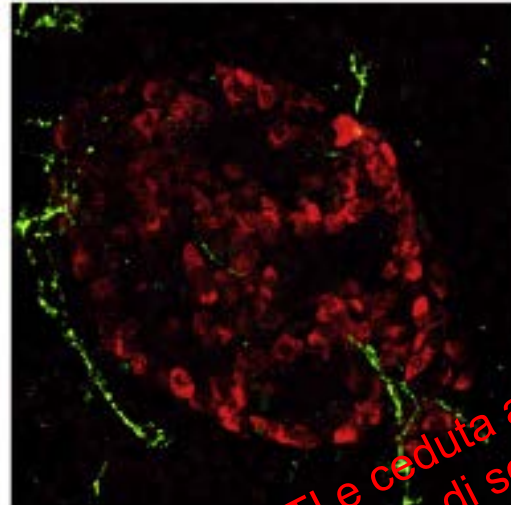
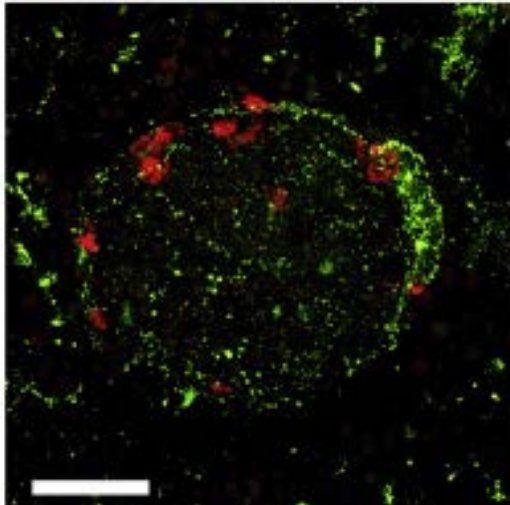
Innervazione delle isole nell'uomo

Mouse

Human

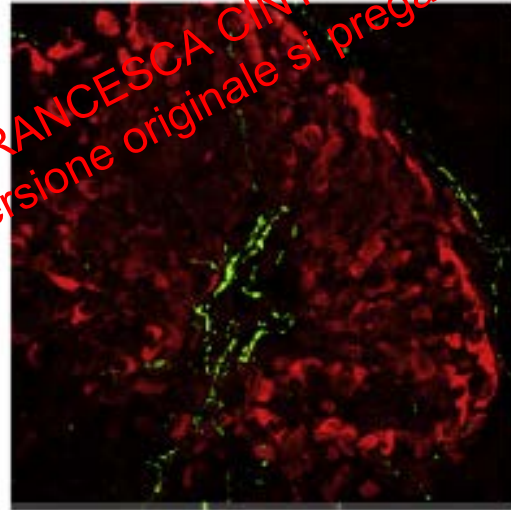
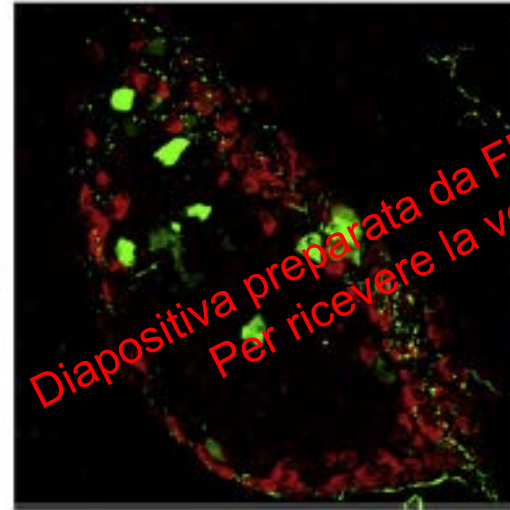
A

Synapsin



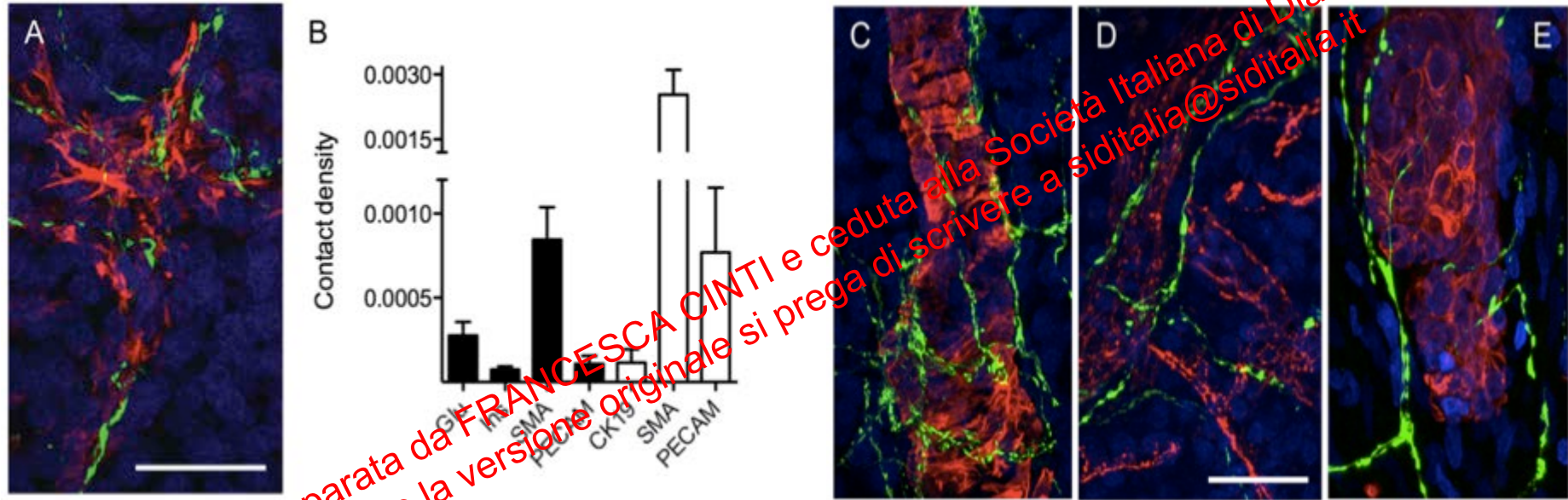
C

TH



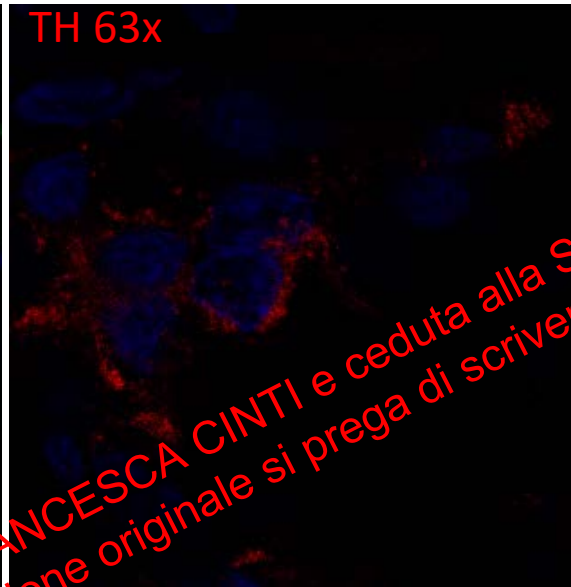
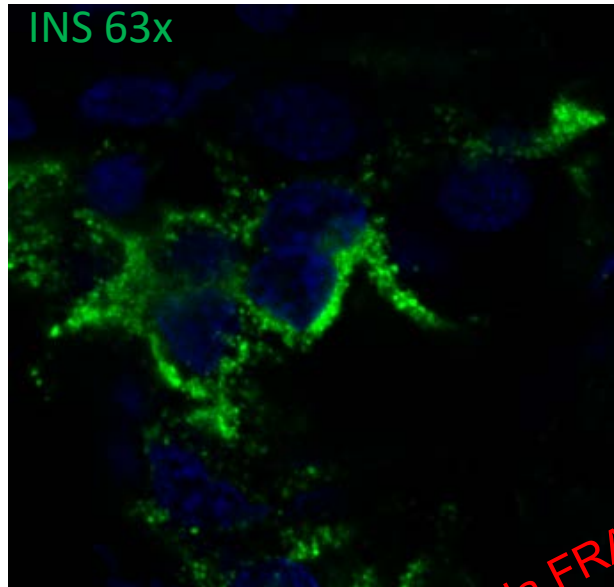
- **PANCREAS UMANO È SCARSAMENTE INNERVATO**
- **ASSENZA DI CELLULE TH POSITIVE**

Nell'uomo le fibre TH si localizzano principalmente attorno ai vasi

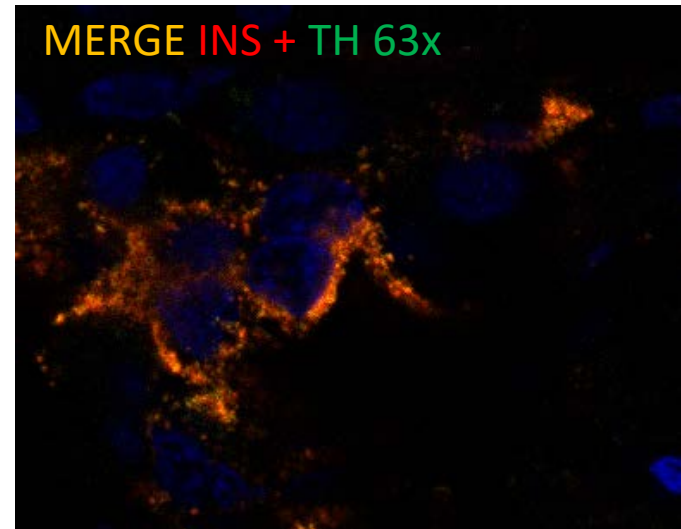


- Assenza di analisi dell'ultrastruttura (microscopia elettronica)
- Pancreas di soggetti diabetici non sono stati studiati

TH in isola di soggetto diabetico



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



Conclusioni e prospettive

- Il processo di dedifferenziazione inizia prima dello sviluppo della malattia
- L'innervazione noradrenergica potrebbe essere responsabile del processo di dedifferenziazione
- L'identificazione di possibili meccanismi molecolari che regolano la plasticità insulare, potrebbero aiutare a contrastare o ritardare il deficit di secrezione responsabile della comparsa del diabete.

Diapositiva preparata da FRANCESCA CINTI e ceduta alla Società Italiana di Diabetologia.
per ricevere la versione originale si prega di scrivere a siditalia@siditalia.it

Ringraziamenti

Prof. Domenico Accili (Columbia University)

Ryotaro Bouchi

Ja Young Kim Muller

Prof. Andrea Giaccari

(Università Cattolica del Sacro Cuore Roma)

Teresa Mezza

Gian Pio Sorice

Chiara Maria Assunta Cefalo

Simona Moffa

Alice Vinsin Sun

Flavia Impronta

Ilaria Impronta

Prof. Piero Marchetti

(Università di Pisa)

Lorella Marselli

Mara Suleiman

Matilde Masini



Gemelli

Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli
Università Cattolica del Sacro Cuore



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