



Universitat de Lleida

La CDK11 i la seva implicació en la mort de la cèl·lula beta pancreàtica en el debut diabètic del ratolí NOD

Ester Sala Solé

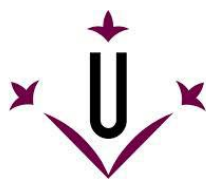
Dipòsit Legal: L.1457-2015

<http://hdl.handle.net/10803/350562>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

LA CDK11 I LA SEVA IMPLICACIÓ EN LA MORT DE LA CÈL·LULA BETA
PANCREÀTICA EN EL DEBUT DIABÈTIC DEL RATOLÍ NOD

ESTER SALA SOLÉ

Memòria presentada per a optar al grau de
Doctor per la Universitat de Lleida
(Programa de Doctorat en Salut)

Directora:
Concepció Mora Giral

Lleida, Gener de 2016

UNIVERSITAT DE LLEIDA

FACULTAT DE MEDICINA
DEPT. DE MEDICINA EXPERIMENTAL

TESI DOCTORAL

DOCTORAT EN SALUT

ESTER SALA SOLÉ

LA CDK11 I LA SEVA IMPLICACIÓ EN LA MORT DE LA CÈL·LULA BETA
PANCREÀTICA EN EL DEBUT DIABÈTIC DEL RATOLÍ NOD

Director científic:
Concepció Mora Giral

Gener de 2016

© 2016. Tots els drets reservats. Cap part d'aquesta publicació no pot ser reproduïda sense el permís per escrit del propietari del copyright.

RESUM

La diabetis de tipus 1 (T1D) és una malaltia autoimmunitària en què les cèl·lules beta del pàncrees productores d'insulina són atacades pel sistema immunitari propi, la qual cosa provoca la deficiència de la producció d'insulina (insulinopènia) i l'aparició de la malaltia. En aquest treball de recerca es dona a conèixer una de les dianes moleculars de les cèl·lules beta responsable de la seva mort a causa de l'atac limfocític. L'expressió de la CDK11 sofreix una reducció en les cèl·lules endocrines dels illots pancreàtics durant l'atac autoimmunitària en el model murí NOD (*non obese diabetic*) de T1D. El gen que codifica per a la CDK11 té 2 productes gènics en humans: p58 i p110 (p130 en el ratolí). La CDK11^{p110} està implicada en la transcripció i *splicing* de l'mRNA i s'expressa al llarg de tot el cicle cel·lular de manera ubíqua. La CDK11^{p58} s'expressa només durant la mitosi (fase G2/M) i està implicada en els processos apoptòtics. Davant d'aquests fets, s'ha estudiat la relació causal entre la disminució de la CDK11 i el debut diabètic en el ratolí NOD. Es va generar el ratolí NODCDK11HTZ, que tenia 1 al·lel de la CDK11 eliminat, i, per tant, era hemideficient en CDK11. Els ratolins HTZ presentaven una incidència acumulativa de diabetis inferior, comparada amb els ratolins WT, i aquesta millora al fenotip diabètic venia determinada per una resistència de les cèl·lules beta pancreàtiques a l'apoptosi induïda per la infiltració limfocitària.

El conjunt de la fisiologia de l'illot pancreàtic no semblava que estigués alterat per l'hemidelecció de la CDK11, ja que les proves d'IPGTT i IPITT, així com les fluctuacions de calci intracel·lular, no es veien modificades en els ratolins HTZ. Pel que fa a les poblacions de la infiltració limfocítica, no es veien canvis entre els 2 genotips, tant en el nombre de cèl·lules T, B, macròfags i DC com en el seu estat d'activació. Les proporcions de cèl·lules T reguladores tampoc no es veien modificades com a conseqüència de l'hemidelecció de la CDK11. No obstant això, l'efecte protector davant l'apoptosi de l'hemidelecció de la CDK11 era dependent de la infiltració limfocítica, ja que els ratolins NOD/SCID CDK11 HTZ i WT no presentaven diferents nivells d'apoptosi beta cel·lular entre ells.

A més a més, la diabetogènicitat dels leucòcits derivats dels ganglis limfàtics pancreàtics de ratolins HTZ era la mateixa en transferències adoptives a ratolins NOD/SCID, comparada amb la diabetogènicitat dels leucòcits derivats del ratolins WT.

Segons aquests resultats, es pot concloure que l'hemidelecció de la CDK11 protegeix els ratolins NOD de la diabetis autoimmune *in situ* i de manera independent del cicle cel·lular, i inhibeix la mort de la cèl·lula beta quan la infiltració limfocítica ataca els illots dels ratolins NOD. Llavors la repressió de l'expressió de la CDK11 prèvia al debut diabètic de la T1D respondria a un mecanisme protector davant l'apoptosi induïda per inflamació.

RESUMEN

La diabetes de tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmune donde las células beta pancreáticas productoras de insulina son atacadas por el sistema inmune propio, lo que provoca la deficiencia de la producción de insulina (insulinopenia) y la aparición de la enfermedad. En este trabajo de investigación se da a conocer una de las dianas moleculares de las células beta responsable de la muerte de estas como consecuencia del ataque linfocítico. La expresión de la CDK11 sufre una reducción en las células endocrinas de los islotes pancreáticos durante el ataque autoinmune en el modelo murino NOD (*non obese diabetic*) de T1D. El gen que codifica para la CDK11 tiene 2 productos génicos en humanos: p58 y p110 (p130 en el ratón). La CDK11^{p110} está implicada en la transcripción y *splicing* del mRNA y se expresa a lo largo de todo el ciclo celular de manera ubicua. La CDK11^{p58} se expresa solo durante la mitosis (fase G2/M) y está implicada en los procesos apoptóticos. Ante estos hechos, se ha estudiado la relación causal entre la reducción de la CDK11 y el debut diabético en el ratón NOD. Se generó el ratón NODCDK11HTZ que tenía un alelo de la CDK11 eliminado, y, por lo tanto, era hemideficiente en CDK11. Los ratones HTZ presentaban una incidencia acumulativa de diabetes inferior comparada con los ratones WT, y esta mejora en el fenotipo diabético venía determinada por una resistencia de las células beta pancreáticas a la apoptosis inducida por la infiltración linfocitaria.

El conjunto de la fisiología del islote pancreático no parecía que estuviera alterado por la hemidelección de la CDK11, ya que las pruebas de IPGTT y IPITT, así como las fluctuaciones de calcio intracelular, no se veían modificadas en los ratones HTZ. Además, no se veían cambios en las poblaciones del infiltrado linfocítico, tanto en el número de células T, B, macrófagos y DC como en su estado de activación. Las proporciones de las células T reguladoras tampoco se veían modificadas como consecuencia de la hemidelección de la CDK11. No obstante, el efecto protector frente a la apoptosis de la hemidelección de la CDK11 dependía del infiltrado linfocítico, ya que los ratones NOD/SCID CDK11 HTZ y WT no presentaban distintos niveles de apoptosis beta celular entre ellos.

Por último, la diabetogenicidad de los leucocitos derivados de los ganglios linfáticos pancreáticos de ratones HTZ era la misma en transferencias adoptivas a ratones NOD/SCID, comparada con la diabetogenicidad de los leucocitos derivados de los ratones WT.

Según estos resultados, se puede concluir que la hemidelección de la CDK11 protege a los ratones NOD de la diabetes autoinmune *in situ* y de forma independiente del ciclo celular, e inhibe la muerte de la célula beta cuando el infiltrado linfocítico ataca los islotes de los ratones NOD. Entonces la represión de la expresión de la CDK11 previa al debut diabético de la T1D respondería a un mecanismo protector frente a la apoptosis inducida por inflamación.

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease in which insulin-producing beta pancreatic cells are attacked by the body's own immune system, leading to an insulin production deficiency (insulinopenia) and the appearance of the disease. This thesis unveils one of the molecular targets involved in beta cell apoptosis caused by lymphocytic attack. CDK11 expression is reduced in the endocrine cells of the islets of Langerhans during the autoimmune attack in the murine model NOD (Non Obese Diabetic) of T1D. CDK11 has two gene products in humans: p58 and p110 (p130 in mouse). CDK11^{p110} is involved in mRNA transcription and splicing and is expressed ubiquitously throughout the cell cycle. CDK11^{p58} is expressed only during mitosis (G2/M phase) and is involved in apoptotic procedures. Faced with these events, the causal relationship between CDK11 reduction and diabetes onset in the NOD mouse has been studied. The NODCDK11HTZ mouse, which had one CDK11 allele deleted and was therefore CDK11 hemideficient, was produced. HTZ mice had a reduced accumulative diabetes incidence compared with WT mice, and this improvement in the diabetic phenotype incidence was determined by a resistance of beta pancreatic cells to apoptotic cell death induced by the lymphocytic infiltrate.

Overall islet physiology did not seem to be altered by the hemideletion of CDK11 gene, because IPGTT and IPITT tests, as well as intracellular calcium flux, were not modified in HTZ mice. Moreover, the lymphocytic infiltrate populations presented the same number of T, B macrophages and DCs in both genotypes, as well as the same activation level. Furthermore, T regulatory cell ratios were not modified as a consequence of CDK11 hemideletion. However, the protective effect against apoptosis by CDK11 hemideletion required the lymphocytic infiltrate, since NOD/SCID CDK11 HTZ and WT mice did not show different beta-cell apoptotic levels.

Finally, pancreatic lymph node leucocyte diabetogenicity of HTZ mice was the same as WT mice when they were adoptively transferred to NOD/SCID mice.

Bearing these results in mind, it can be concluded that CDK11 hemideletion protects NOD mice from autoimmune diabetes *in situ* in a cell cycle-independent manner, inhibiting beta cell death when the lymphocytic infiltrate attacks the islets of Langerhans of NOD mice. Therefore, CDK11 downregulation prior to T1D onset corresponds to a protective mechanism against inflammation induced beta cell apoptosis.

Aquest projecte s'ha finançat a través del Ministerio de Ciencia e Innovación amb referència SAF2007-31050-E i SAF2008-02536; l'Institut de Salud Carlos III – Ministerio de Sanidad y Consumo amb referència PI041310; l'Acadèmia de Ciències Mèdiques i de la Salut de Catalunya i Balears amb referència beca de Recerca Bàsica 2012; i la beca predoctoral FI-DGR de la Generalitat de Catalunya.

Aquesta tesi ha rebut un ajut de l'Institut de Llengües de la Universitat de Lleida per a la correcció lingüística (convocatòria de 2015).

TAULA DE CONTINGUTS

RESUM	iii
AGRAÏMENTS	¡Error! Marcador no definido.
LLISTA D'ABREVIACIONS.....	xv
1 INTRODUCCIÓ	1
1.1 Sistema immunitari.....	1
1.2 Autoimmunitat	1
1.2.1 Inducció de la tolerància	2
1.2.2 Malalties autoimmunes i mecanismes patològics	3
1.2.3 La base genètica i ambiental de l'autoimmunitat	4
1.3 Diabetis de tipus 1 (T1D) o autoimmune.....	4
1.3.1 Manifestacions clíniques i diagnòstic.....	5
1.3.2 Factors genètics	7
1.3.3 Factors ambientals	8
1.3.4 Estadis de la T1D	10
1.3.5 Mecanismes involucrats en la destrucció de les cèl·lules beta	12
1.3.6 Models de la diabetis autoimmune	14
1.4 Fisiologia de la cèl·lula beta	16
1.4.1 La secreció d'insulina estimulada per glucosa	16
1.4.2 Electrofisiologia de la cèl·lula beta pancreàtica	19
1.4.3 Regulació del gen de la insulina	19
1.4.4 Processament de la molècula d'insulina.....	20
1.4.5 Altres hormones.....	22
1.4.6 Transport de glucosa	22
1.4.7 Estrès, mort beta cel·lular i tolerància immunològica induïts per citocines	22
1.4.8 Generació de massa beta.....	26
1.5 Teràpies actuals de la T1D	27
1.5.1 Teràpia amb insulina exògena.....	27
1.5.2 Trasplantament de pàncrees	28
1.5.3 Trasplantament d'illots pancreàtics	28
1.6 Cicle cel·lular.....	29
1.6.1 Ciclines i cinases dependents de ciclines (CDK).....	30
1.6.2 Inhibidors del cicle cel·lular.....	32
1.6.3 Proteïnes i gens de la CDK11	33
1.6.4 CDK11 ^{p46}	34
1.6.5 CDK11 ^{p60}	35
1.6.6 CDK11 ^{p58}	35
1.6.7 CDK11 ^{p110}	36
2 HIPÒTESI.....	39
3 OBJECTIUS	41
3.1 Objectiu principal.....	41
3.2 Objectius específics	41
4 MATERIALS	43

4.1	Materials per a les tècniques <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>	43
4.2	Anticossos.....	45
4.3	Aparells i programari.....	47
4.4	Oligonucleòtids per a la PCR.....	48
5	MÈTODES.....	49
5.1	Estudis <i>in vitro</i>	49
5.1.1	Sobreexpressió de la CDK11 a la línia NIT-1 d'insulinoma murí NOD.....	49
5.1.2	Subclonatge de la CDK11 ^{p58} i la CDK11 ^{p130} per transfectar.....	49
5.1.3	Transfecció de la línia cel·lular NIT-1.....	50
5.1.4	Anàlisi de l'expressió de l'mRNA del transgèn CDK11 ^{p58} i CDK11 ^{p130}	50
5.1.5	Estudis d'apoptosi mitjançant Annexin-V.....	51
5.1.6	Proliferació dels limfòcits.....	52
5.1.7	Producció d'IL-2 i IFN γ per cultius de leucòcits.....	52
5.2	Estudis <i>in vivo</i>	53
5.2.1	Ratolí model usat per estudiar la diabetis de tipus 1.....	53
5.2.2	Generació de la soca NODCDK11 β KO.....	54
5.2.3	Generació de la soca NOD/SCID CDK11.....	56
5.2.4	Aïllament d'illots pancreàtics.....	56
5.2.5	Separació magnètica de cèl·lules pancreàtiques endocrines (fracció CD45-).....	56
5.2.6	Expressió de l'mRNA de la CDK11 i del glucagó.....	56
5.2.7	Monitoratge de la diabetis.....	57
5.2.8	Anàlisi immunohistoquímica de la infiltració pancreàtica.....	58
5.2.9	Transferències adoptives de diabetis.....	59
5.2.10	Test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (IPGTT).....	59
5.2.11	Test intraperitoneal de tolerància a la insulina (IPITT).....	60
5.2.12	Lectura de glucagó en plasma de ratolí.....	60
5.2.13	Obtenció de proteïnes de membrana i anàlisi del transportador de glucosa (GLUT-4) en teixit adipós i múscul esquelètic.....	60
5.2.14	Lisi d'illots per a Western blot.....	61
5.2.15	Western blot.....	61
5.2.16	Estudis morfològics.....	63
5.2.17	Estudis d'immunofluorescència per analitzar les cèl·lules secretores de glucagó (cèl·lules α).....	64
5.2.18	Determinació d'apoptosi tardana (TUNEL).....	65
5.2.19	Tinció d'antígens de membrana de leucòcits per a citometria de flux.....	65
5.2.20	Tinció intracel·lular d'antígens leucocitaris per a citometria de flux.....	66
5.2.21	Tinció de marcadors intracel·lulars de cèl·lules beta.....	66
5.2.22	Contingut d'insulina d'illots pancreàtics.....	67
5.2.23	Contingut d'insulina d'illots pancreàtics.....	67
5.2.24	Mesura de canvis en la concentració de calci intracel·lular [Ca ²⁺] _i	68
5.2.25	Anàlisi estadística.....	68
6	RESULTATS.....	69
6.1	L'expressió de l'mRNA de la CDK11 disminueix a conseqüència de l'infiltrat leucocitari prèviament a la mort beta cel·lular.....	69
6.1.1	La disminució de l'expressió de la CDK11 no altera la proliferació de les cèl·lules beta.....	69
6.2	Generació del model NODCDK11 β KO.....	72

6.2.1	Fenotip del model CDK11 β KO. Les seqüències loxP afecten la incidència de la diabetis independentment de la presència o no de recombinasa	73
6.3	Resolució del model d'estudi de la CDK11	75
6.3.1	Caracterització fenotípica dels ratolins NOD hemideficients en CDK11	76
6.3.2	L'hemideficiència en CDK11 no altera l'àrea beta cel·lular per illot, però sí el nombre d'illots per ratolí	77
6.3.3	Els ratolins NOD CDK11 HTZ presenten una incidència de diabetis reduïda	78
6.3.4	La proliferació de la cèl·lula beta pancreàtica no es veu afectada per la reducció de la CDK11	80
6.3.5	La deleció parcial de la CDK11 com a mecanisme protector de l'apoptosi induïda per Fas	82
6.3.6	Les cèl·lules beta pancreàtiques dels ratolins HTZ són resistents a l'apoptosi induïda per la infiltració limfocitària	82
6.3.7	Estudis metabòlics de la glucosa en ratolins hemideficients en CDK11	85
6.3.8	L'hemideficiència en CDK11 s'associa amb insulinèmies inferiors en resposta a estímuls de glucosa	90
6.3.9	Els nivells de glucagó en sèrum de ratolins privats de menjar no estan alterats per l'hemideficiència en CDK11	93
6.3.10	Els nivells d'expressió de GLUT-2 i GLUT-4 no es veuen afectats per l'hemideficiència en CDK11	97
6.3.11	L'hemideficiència en CDK11 no és suficient per causar diabetis	100
6.3.12	Els ratolins HTZ no presenten alteracions en les poblacions de la infiltració limfocítica	101
6.3.13	Susceptibilitat a la diabetis induïda per transferència adoptiva de limfòcits provinents de melsa	105
6.3.14	Els limfòcits provinents de melsa de ratolins HTZ tenen l'apoptosi induïda després d'estímul (AICD) augmentada i la secreció d'IL-2 disminuïda amb la capacitat de proliferació inalterada	109
6.3.15	Diabetogenicitat dels leucòcits provinents de ganglis limfàtics regionals (pancreàtics i mesentèrics)	115
6.3.16	Els limfòcits provinents de ganglis limfàtics pancreàtics de ratolins HTZ tenen la secreció d'IL-2 augmentada encara que l'apoptosi induïda després d'estímul i la capacitat de proliferació es mantenen inalterades	116
6.3.17	Les cèl·lules T reguladores dels ratolins HTZ no es veuen alterades	119
6.3.18	L'activació de les cèl·lules dendrítiques (DC) dels ratolins HTZ no es veu alterada	122
6.3.19	La proporció de limfòcits T CD4 naïfs està disminuïda en els ratolins HTZ, encara que es manté la proporció de cèl·lules activades	124
6.4	Resum dels resultats	126
7	DISCUSSIÓ	127
8	CONCLUSIÓ	137
	BIBLIOGRAFIA	139
	ANNEXOS	155

LLISTA D'ABREVIACIONS

ADP	Difosfat d'adenosina
AICD	Apoptosi induïda després d'estímul
Apaf-1	Apoptosi <i>protease-activating factor</i> -1
APC	Cèl·lules presentadores d'antígens
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Trifosfat d'adenosina
AUC	Àrea sota la corba
BB	<i>Biobreeding</i>
Bcl2	Cèl·lula B limfoma 2
bp	Parell de bases
[Ca ²⁺] _i	Concentració de Ca ²⁺ citoplasmàtic lliure
CAK	Cinasa activadora de CDK
canal Ca ^v	Canal de calci dependent de voltatge
canal KATP	Canal de potassi sensible a ATP
Ccn	Ciclina
CcnD1	Ciclina D1
CcnD2	Ciclina D2
CcnD3	Ciclina D3
Cdc2L	Control cicle cel·lular isoforma 2
CDK	Cinasa dependent de ciclina
CDK _i	Inhibidor de cinasa dependent de ciclina
CEEA	Comitè Ètic d'Experimentació Animal
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CHK2	Cinasa del punt de control 2
CHO	Ovari d'hàmsster xinès
CK2	Caseïna cinasa 2
ConA	Concanavalina A
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DC	Cèl·lula dendrítica

DMSO	Sulfòxid de dimetil
dNTP	Desoxiribonucleòtid
DQ2	DRB*0301-DQA1*0501-DQB1*0201
DQ8	DQA1*0301-DQB1*0302
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
eIF3	Factor d'iniciació eucariòtic 3
eIF3f	Subunitat F del factor d'iniciació eucariòtic 3
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FACT	Facilita la transcripció de la cromatina
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FasL	Lligand de Fas
FBS	Sèrum fetal boví
FITC	Isotiocianat de fluoresceïna
GAD65	Descarboxilasa de l'àcid glutàmic 65
GIP	Polipèptid insulinoatròpic dependent de la glucosa
GLP-1	Pèptid similar al glucagó-1
GLUT	Transportador de glucosa
GLUT-2	Transportador de glucosa 2
GLUT-4	Transportador de glucosa 4
GSIS	Secreció d'insulina estimulada per glucosa
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HLA	Antigen leucocitari humà
HPRT	Hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa
HTZ	Heterozigot
IAA	Autoanticossos de la insulina
IA-2	Antitirosina fosfatasa
IDDM	Locus de susceptibilitat a la T1D
IFN	Interferó
IFN- γ	Interferó gamma
IL	Interleucina

IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-1 β	Interleucina 1 beta
iNOS	Sintetasa d'òxid nítric induïble
INS	Gen de la insulina humana
INSB12-25	Pèptid B de la cadena d'insulina (p12-25)
IPGTT	Test intraperitoneal de tolerància a la glucosa
IPITT	Test intraperitoneal de tolerància a la insulina
IRES	Lloc intern d'entrada al ribosoma
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
KATP	Canal de K ⁺ sensible a ATP
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KLH	Hemocianina de <i>Megathura crenulata</i>
KO	Organisme genoanul·lat
LN	Nòdul limfàtic
LPS	Lipopolisacàrid
MFI	Intensitat mitjana de fluorescència
MHC	Complex d'histocompatibilitat principal
mRNA	RNA missatger
NF- κ B	Factor de transcripció nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Òxid nítric
NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
OD	Densitat òptica
PAK1	Cinasa p21 activada 1
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa

PE	Ficoeritrina
pèptid-C	Pèptid connector
PI	Iodur de propidi
PIL	Limfòcits pancreàtics infiltrants
Plk1	Serina/treonina proteïna cinasa 1
Plk4	Serina/treonina proteïna cinasa 4
PLN	Ganglis limfàtics pancreàtics
pRB	Proteïna del retinoblastoma
PVDF	Polifluorur de vinilidè
qPCR	PCR en temps real (PCR quantitativa)
RanBPM	Proteïna d'unió Ran al centre organitzador de microtúbuls
RanGTP	Ran-guanosina trifosfat
RE	Reticle endoplasmàtic
RER	Reticle endoplasmàtic rugós
rhINS	Insulina recombinant humana
RIP	Promotor de la insulina de rata
RIP Cre	Recombinasa Cre expressada sota el control del promotor de la insulina
rmIL-2	IL-2 recombinant de ratolí
rmIFN γ	IFN γ recombinant de ratolí
RNA	Àcid ribonucleic
RNAP II	RNA polimerasa 2
RNPS1	Proteïna d'unió a l'RNA amb un domini ric en serina 1
ROS	Espècies reactives de l'oxigen
rT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa inversa
SCID	Immunodeficiència combinada greu
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic
SFC	Compartiment dels factors de <i>splicing</i>
siRNA	Petit RNA d'interferència
SPF	Lliure de patògens específics
SV40	Virus del simi 40

TBS	Tampó Tris salí
TBST	Tampó Tris salí Tween
TFIIIF	Factor de transcripció 2F
TFIIS	Factor de transcripció 2S
Th	Cèl·lules T col·laboradores
TNF	Factor de necrosi tumoral
TNF- α	Factor de necrosi tumoral alfa
Treg	Cèl·lules T reguladores
TSC	leucòcits de melsa
T1D	Diabetis tipus 1
UV	Ultraviolat
V_m	Potencial de membrana
VNTR	Nombre variable de repeticions en tàndem
WAT	Teixit adipós blanc
WB	Transferència Western
WT	Salvatge
α	Alfa
β	Beta
Δ	Gen CDK11 eliminat
γ	Gamma
+	Gen WT
φ	Sense estímul
7AAD	7 aminoactinomicina D

1 INTRODUCCIÓ

1.1 Sistema immunitari

El cos està exposat a microorganismes i agents patògens que poden causar malalties. Tot i això, existeixen mecanismes de defensa que permeten aturar aquestes infeccions. El conjunt de cèl·lules efectores i molècules que formen aquests mecanismes de defensa es coneix com a sistema immunitari. Quan hi ha una exposició a un agent infecciós, primerament actua la immunitat innata inespecífica (cèl·lules fagocítiques) i, a continuació, la immunitat adquirida (limfòcits), que va dirigida específicament a cada patògen i és més eficient. Els limfòcits poden reconèixer els diferents patògens mitjançant els receptors que tenen a la seva membrana; les molècules que reconeixen s'anomenen antígens (Murphy, Travers et al. 2008).

L'activació de la resposta immune adaptativa comença amb la captació dels patògens per part de les cèl·lules fagocítiques als teixits infectats, el processament dels antígens, la migració als òrgans limfoides secundaris (ganglis limfàtics, melsa i teixit limfàtic de la mucosa) i la presentació d'aquests als limfòcits T. El receptor de les cèl·lules T està especialitzat a reconèixer antígens que s'han generat a l'interior cel·lular i que s'exposen a la superfície de les cèl·lules presentadores d'antígens (macròfags, cèl·lules dendrítiques i limfòcits B). A més a més, el receptor dels limfòcits T només podrà reconèixer aquests antígens quan estiguin presentats mitjançant 1 proteïna de membrana anomenada complex major d'histocompatibilitat (MHC). La regió genòmica que codifica per a l'antigen leucocitari humà (HLA), també anomenat complex major d'histocompatibilitat, inclou 1 grup d'aproximadament 150 gens i 3,5 milions de parells de bases de DNA que es troben al braç curt del cromosoma 6 (6p21.31) (Murphy, Travers et al. 2008).

1.2 Autoimmunitat

La resposta patològica del sistema immunitari vers antígens de les cèl·lules i teixits propis d'un individu (autoantígens) s'anomena autoimmunitat, la qual pot conduir a les malalties autoimmunes (Murphy, Travers et al. 2008).

Durant el desenvolupament dels limfòcits als òrgans limfoides centrals, es produeix la reorganització a l'atzar dels exons que codifiquen per a la part variable dels receptors dels limfòcits, de manera que es generen alguns limfòcits amb receptors amb alta afinitat per autoantígens. Aquest limfòcits són eliminats del repertori, la qual cosa dona lloc a un estat de tolerància en què el sistema immunitari no ataca els teixits propis. L'autoimmunitat obeeix a una fallada en els mecanismes de la tolerància (Murphy, Travers et al. 2008).

1.2.1 Inducció de la tolerància

Per tal de desenvolupar tolerància vers el propi, el sistema immunitari ha de ser capaç de detectar els limfòcits autoreactius durant la seva ontogènia. Tot i els diferents mecanismes per identificar i eliminar els limfòcits autoreactius, alguns escapen d'aquests sistemes de control i migren a la perifèria, on poden provocar malalties autoimmunes un cop activats. Les respostes autoimmunes s'assemblen a les respostes normals del sistema immunitari, però són específicament activades per autoantígens, i donen lloc a anticossos autoreactius anomenats autoanticossos (Murphy, Travers et al. 2008).

Layers of self-tolerance		
Type of tolerance	Mechanism	Site of action
Central tolerance	Deletion Editing	Thymus Bone marrow
Antigen segregation	Physical barrier to self-antigen access to lymphoid system	Peripheral organs (e.g. thyroid, pancreas)
Peripheral anergy	Cellular inactivation by weak signaling without co-stimulus	Secondary lymphoid tissue
Regulatory cells	Suppression by cytokines, intercellular signals	Secondary lymphoid tissue and sites of inflammation
Cytokine deviation	Differentiation to T_H2 cells, limiting inflammatory cytokine secretion	Secondary lymphoid tissue and sites of inflammation
Clonal deletion	Apoptosis post-activation	Secondary lymphoid tissue and sites of inflammation

Figure 14-2 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Figura 1-1: La tolerància vers el propi depèn del conjunt d'accions d'una varietat de mecanismes que operen en diferents llocs i estadis del desenvolupament (Murphy, Travers et al. 2008).

Hi ha diferents tipus i nivells de tolerància vers el propi (Figura 1-1). La tolerància central és la tolerància induïda al timus (en el cas dels limfòcits T) i a la medul·la òssia (limfòcits B), quan un limfòcit immadur reconeix un antigen, que dona un senyal negatiu que causa la mort o inactivació del limfòcit. La tolerància perifèrica s'indueix al limfòcit madur, quan aquest ja ha migrat dels òrgans limfoides centrals. La tolerància perifèrica es produeix quan s'uneix l'antigen al seu receptor en absència de senyals coestimuladors, usualment proveïts pel sistema immunitari innat (anergia); en absència de contacte amb antígens (ignorància); per apoptosi cel·lular (deleció clonal), o mitjançant cèl·lules T reguladores, que inhibeixen la proliferació i les funcions efectores de les cèl·lules T autoreactives. La funció principal de les cèl·lules T CD4⁺/CD25⁺ reguladores (Treg), el desenvolupament i la funció de les quals estan dictats pel factor de transcripció FoxP3, és regular la resposta inflamatòria. Suprimeixen i regulen diverses respostes immunes a microbis, tumors, al·lèrgens i trasplantaments. Els defectes en el nombre i l'activitat de les Treg estan relacionats amb la desregulació de l'equilibri entre les cèl·lules reguladores i les cèl·lules efectores, que indueix el desenvolupament de la T1D (Sakaguchi, Setoguchi et al. 2006, Thomas 2010).

1.2.2 Malalties autoimmunes i mecanismes patològics

S'ha vist que certs agents infecciosos tenen epítops semblants a antígens propis, la qual cosa condueix a una sensibilització del sistema immunitari de l'infectat vers aquests antígens. No obstant això, també hi ha evidències que diversos desordres autoimmunes són causats per una desregulació interna del sistema immunitari sense cap participació aparent d'agents infecciosos (Murphy, Travers et al. 2008).

En general, les malalties autoimmunes es caracteritzen per una fase d'activació inicial en la qual només hi ha involucrats uns quants autoantígens, però la presència constant d'aquests dona una inflamació crònica, que fa alliberar més autoantígens i atrau cèl·lules efectores no específiques, com ara macròfags o neutròfils, al focus d'infecció, la qual cosa dona lloc a un procés destructiu continuat (Steinman 1996, Murphy, Travers et al. 2008).

1.2.3 La base genètica i ambiental de l'autoimmunitat

L'autoimmunitat és el resultat de múltiples factors, tant genètics com ambientals, i el seu pes específic relatiu és variable en funció de la malaltia (Figura 1-2). Els factors ambientals (la temperatura, les infeccions, la dieta, etc.) o genètics (complex major d'histocompatibilitat) més importants estan explicats detalladament més endavant. Els factors genètics i ambientals combinats poden escapar dels mecanismes de tolerància i donar com a resultat malalties autoimmunes (Murphy, Travers et al. 2008, Temajo and Howard 2014).

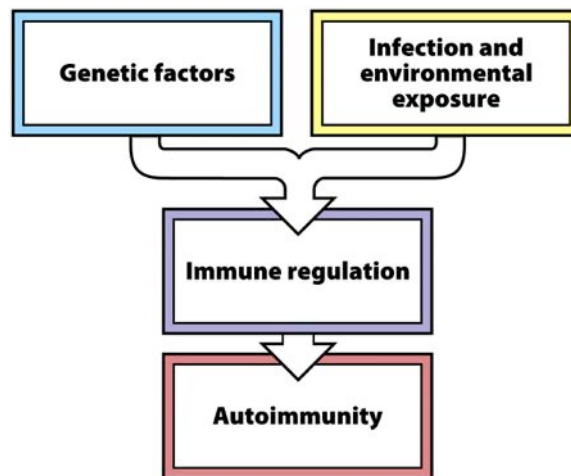


Figura 1-2: Requeriments per al desenvolupament de les malalties autoimmunes (Murphy, Travers et al. 2008).

1.3 Diabetis de tipus 1 (T1D) o autoimmune

La T1D és una malaltia multifactorial caracteritzada per la destrucció autoimmune de les cèl·lules pancreàtiques secretores d'insulina, les cèl·lules beta, la qual cosa requereix l'administració diària d'insulina subcutània per mantenir la normoglucèmia. La T1D pot desenvolupar-se a qualsevol edat. No obstant això, existeixen 2 edats amb un pic d'aparició màxim: cap als 5–7 anys i els 11–14 anys (Redondo and Gómez-Peralta 2006, Harjutsalo, Sjoberg et al. 2008).

Les cèl·lules beta es troben en agrupacions cel·lulars anomenades illots de Langerhans o illots pancreàtics, que constitueixen el pàncrees endocrí, format per altres tipus cel·lulars, a més a més de les cèl·lules beta: alfa, delta, èpsilon i PP.

La T1D representa el 5–10% de tots els casos de diabetis mellitus (Figura 1-3) i afecta 1/300 nens al món (Redondo and Gómez-Peralta 2006). Contràriament a la majoria de malalties autoimmunes, la T1D afecta lleugerament més el sexe masculí que el sexe femení (Ostman, Lonnberg et al. 2008). La incidència de la T1D està subjecta a àmplies variacions geogràfiques: Finlàndia presenta la més alta, amb més de 40 casos anuals per cada 100.000 habitants, a continuació la segueix Sardenya, amb uns 30 casos anuals per cada 100.000 habitants. Xina i Amèrica del Sud presenten les incidències més baixes. A Espanya la incidència és intermèdia, amb uns 12–20 casos anuals per cada 100.000 habitants segons les regions (Karvonen, Tuomilehto et al. 1993, Redondo and Gómez-Peralta 2006).

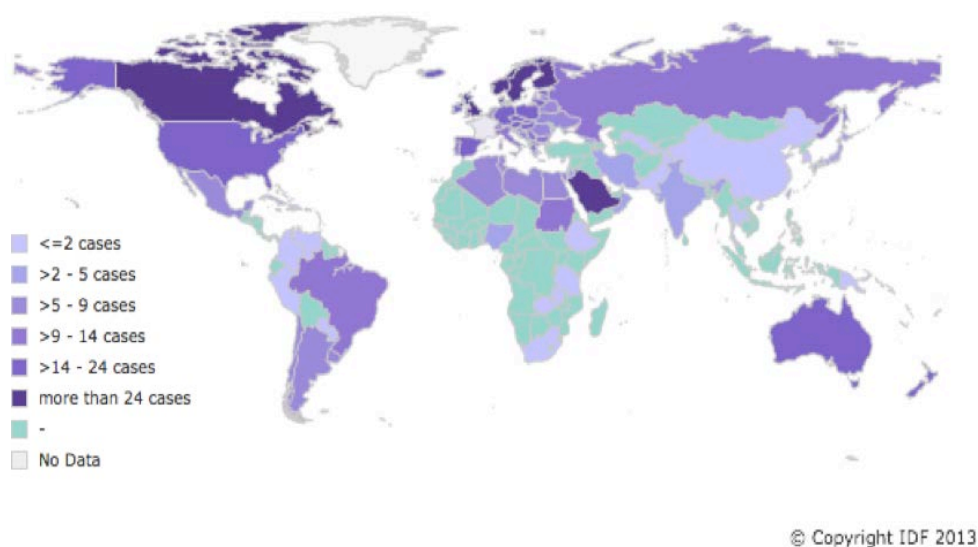


Figura 1-3: Incidència mundial de la T1D en joves de 0 a 14 anys. La incidència es dona per cada 100.000 habitants per any (Federation 2013).

1.3.1 Manifestacions clíniques i diagnòstic

El diagnòstic de la diabetis inclou qualsevol nivell de glucosa en sang igual o superior a 11,1 mM (200 mg/dL) amb símptomes d'hiperglucèmia (American Diabetes 2012). Els símptomes d'hiperglucèmia són reconeguts més fàcilment en nens que en adults. Les manifestacions principals són: poliúria (excreció de grans volums d'orina), polidipsia (set excessiva), polifàgia, caquèxia progressiva, glucosúria, hiperglucèmia, visió borrosa, fatiga, rampes i candidiasi.

L'orina conté altes concentracions de glucosa que provoquen un efecte osmòtic i redueixen l'absorció d'aigua als ronyons, la qual cosa causa poliúria i polidípsia. La manca de captació de glucosa pels teixits perifèrics deguda a la deficiència d'insulina dona lloc a un estat de debilitat, fatiga, pèrdua de pes i increment d'apetit (polifàgia). Els pacients amb hiperglucèmia són més susceptibles a les infeccions, particularment vaginals i del tracte urinari (Massoud and MAassoud 2012).

La retinopatia és una de les múltiples complicacions de la diabetis (Figura 1-4). La diabetis és deguda a alts nivells de glucosa en sang, que a la vegada poden danyar els vasos sanguinis de petit calibre, com ara el de la retina (Bakker, Tushuizen et al. 2013). Les 2 complicacions més perilloses de la diabetis són: la hiperglucèmia i la cetoacidosi (increment de l'aciditat de la sang). La insuficiència d'insulina dona lloc a una severa hiperglucèmia i a un increment de la lipòlisi que deriva en la formació de cossos cetònics, i augmenta el contingut àcid de la sang. La combinació de la hiperglucèmia i l'acidosi s'anomena cetoacidosi diabètica i dona lloc a una hiperventilació i fallada de la funció del sistema nerviós central, que culmina en coma i mort (Massoud and MAassoud 2012).

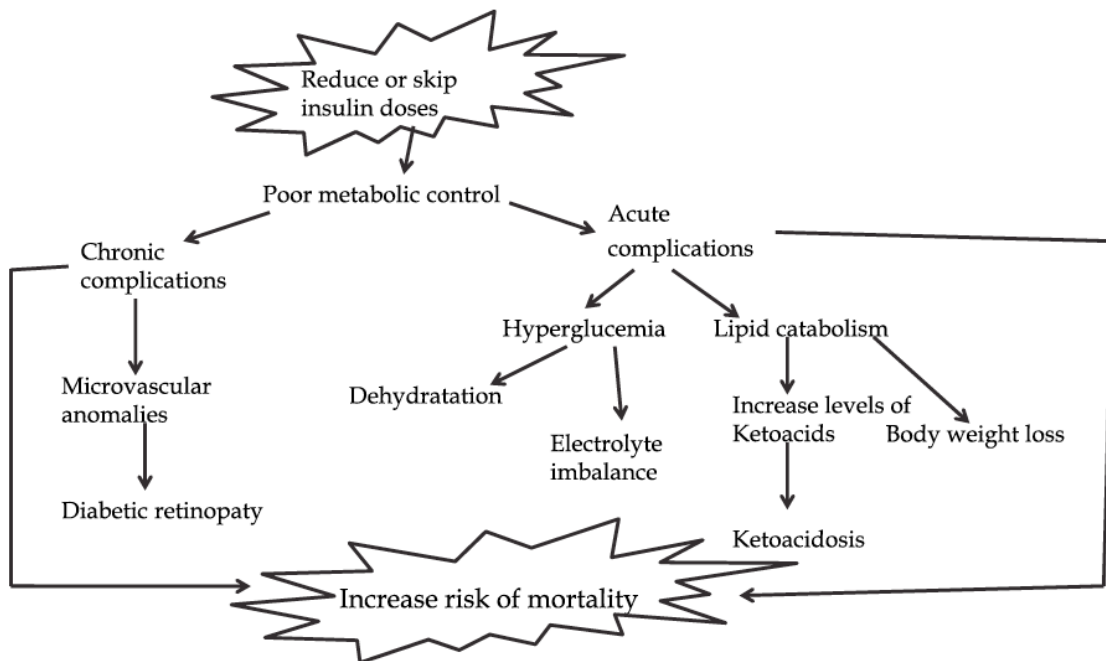


Figura 1-4: Conseqüències de la mala utilització de la insulina en pacients diabètics de tipus 1 (García-Mayor and Larrañaga 2011).

1.3.2 Factors genètics

Més del 85% de les persones afectades per T1D no presenten una història familiar d'aquesta malaltia. No obstant això, hi ha una clara predisposició genètica. Aproximadament, hi ha un risc del 50% en bessons monozigòtics i del 10% per als dizigòtics o germans dels pacients (Kyvik, Green et al. 1995, Redondo and Gómez-Peralta 2006).

Hi ha diverses regions del genoma relacionades amb el risc a patir T1D. Aquestes regions, que poden contenir diferents gens, s'anomenen IDDM (locus de susceptibilitat a la T1D). El locus IDDM1 és el més ben estudiat i conté els gens de l'HLA (Figura 1-5). Aproximadament un 50% de l'agregació familiar de la T1D està associada a la regió HLA, al·lels DR i DQ (Nerup, Platz et al. 1974, Erlich, Zeidler et al. 1993, Noble, Valdes et al. 1996). Els haplotips amb un risc més elevat són DQA1*0301-DQB1*0302 (conegut com a DQ8) amb els al·lels DRB1*0401, *0402 o *0405, i el DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2) (Ziegler, Alper et al. 1991, Pugliese, Gianani et al. 1995, Kimpimaki and Knip 2001). És interessant esmentar que la freqüència dels haplotips d'alt risc és més baixa en els pacients afroamericans comparada amb els caucàsics (Lipton, Drum et al. 2011).

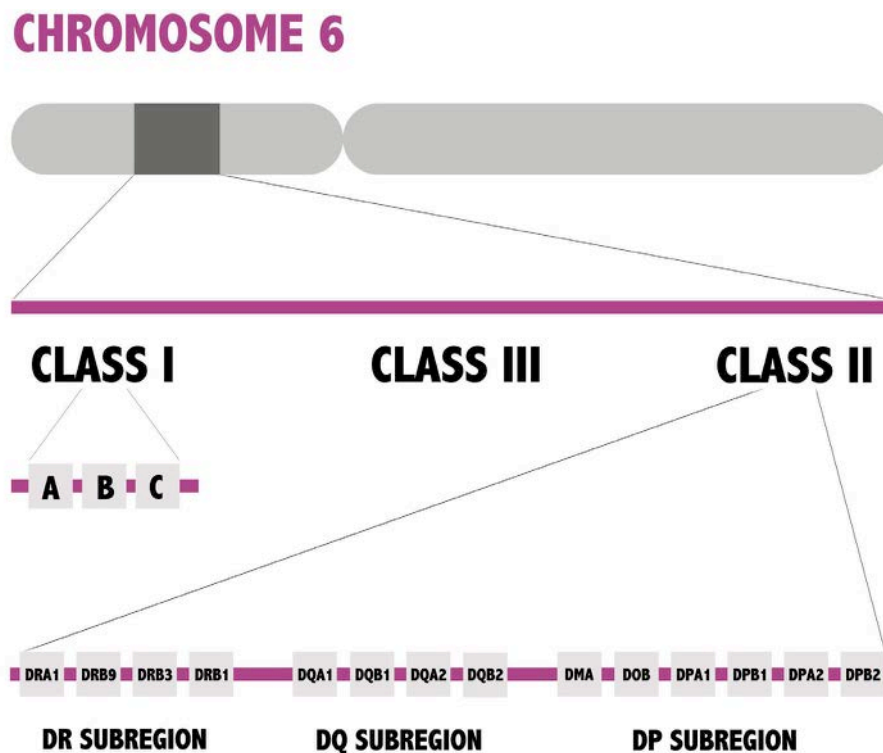


Figura 1-5: Regió HLA en el cromosoma 6p21.3 (Zemunik and Boraska 2011).

La hipòtesi més contrastada és que les molècules de l'HLA contribueixen al risc de desenvolupar diabetis mitjançant els pèptids que uneixen i presenten (Lee, Wucherpfennig et al. 2001). La presència d'un àcid aspàrtic a la posició 57 de la cadena beta de la molècula DQ és una característica comuna del tipus HLA associat a protecció davant de la malaltia. Els haplotips d'alt risc no tenen un àcid aspàrtic a la posició 57 de la cadena beta de la molècula DQ, sinó un aminoàcid neutre. De la mateixa manera, la presència d'una arginina a la posició 52 de la cadena alfa de la molècula DQ sembla que és un determinant de susceptibilitat per a la T1D (Khalil, d'Auriol et al. 1990, Nepom and Kwok 1998).

El locus IDDM2 està relacionat amb el gen de la insulina, cromosoma 11p15, i inclou un nombre variable de repeticions en tàndem (VNTR) (Bell, Horita et al. 1984). Hi ha 3 tipus principals de VNTR de la insulina, definits per la seva mida: classe I (26–63 repeticions), classe II (aproximadament 80 repeticions) i classe III (140-200 repeticions). Els individus amb un nombre menor de repeticions, associats amb menys expressió d'insulina, tenen un risc més alt de T1D, mentre que individus amb un major nombre de repeticions expressarien concentracions altes d'insulina al timus afavorint la destrucció (selecció negativa) de les cèl·lules T autoreactives (Pugliese, Zeller et al. 1997, Vafiadis, Bennett et al. 1997, Redondo and Gómez-Peralta 2006).

A més a més de la regió MHC, s'han definit fins a quasi 20 locus associats a la T1D que no pertanyen a la regió MHC, però molts d'ells no s'han pogut confirmar fora de la població en què van ser descrits (Redondo and Gómez-Peralta 2006).

1.3.3 Factors ambientals

Hi ha evidències que donen suport als factors externs en la patogènesi de la T1D. Per exemple, la incidència de la T1D s'ha incrementat en grups poblacionals que s'han mogut d'una regió amb baixa incidència a una regió amb alta incidència, la qual cosa emfatitza la influència de les condicions ambientals (Akerblom and Knip 1998).

- Virus. Sembla que hi hagi una variació en l'aparició de la diabetis segons l'època de l'any, amb un pic d'incidència a la tardor. Les malalties que tenen incidències estacionals habitualment són causades per virus. Els virus estan implicats en la patogènesi de la T1D, ja

que destrueixen les cèl·lules beta productores d'insulina per infecció citolítica i desencadenen l'autoimmunitat de les cèl·lules beta (Gamble and Taylor 1969, Yoon 1991). També s'ha demostrat que certs virus comparteixen antígens amb els illots pancreàtics, la qual cosa condueix a un fenomen de mimetisme molecular (Hiemstra, Schloot et al. 2001, Coppieters, Wiberg et al. 2012). Les infeccions virals són el factor ambiental més important. Els virus que s'han demostrat que estan implicats en la T1D són els rotavirus, els adenovirus, el virus de la rubèola, els retrovirus, els reovirus, els citomegalovirus, els virus d'Epstein-Barr i els virus de les galteres. Els virus amb risc més alt de produir T1D són els enterovirus. Dins d'aquest grup, el coxsackievirus i els echovirus són molt citolítics i poden causar la citòlisi de la cèl·lula beta i activar la resposta immune innata i adaptativa (Yoon 1991, Akerblom and Knip 1998, Roivainen and Klingel 2010).

- Components dietètics. S'ha especulat sobre l'existència d'una associació entre la dieta materna durant l'embaràs (com ara el consum d'oli vegetal i vitamina D, també el blat, la llet de vaca i l'omega-3) i la T1D. La introducció de la llet de vaca i la carn abans dels 6 mesos augmenta el risc de patir T1D. Contràriament, l'oli vegetal i els omega-3 tenen efectes favorables (Akerblom, Vaarala et al. 2002, Norris 2010).
- Clima i canvis estacionals. Els estudis relacionats amb l'aparició de la T1D segons l'estacionalitat són controvertits. No obstant això, hi ha un increment de la incidència de la T1D a l'època tardor-hivern (Moltchanova, Schreier et al. 2009, Jarosz-Chobot, Polanska et al. 2011). L'efecte dels canvis estacionals sobre la T1D és degut a canvis en l'activitat del sistema immunitari. A l'hivern, la reducció de l'exposició a la radiació ultraviolada dona una reducció dels nivells de vitamina D; per tant, disminueix l'efecte regulador de la vitamina D sobre els limfòcits Th1. A més a més, durant els mesos d'hivern hi ha una major estimulació del sistema immunitari a causa de les infeccions virals. D'aquesta manera, el nord d'Europa té els nivells d'incidència de T1D més elevats, fet que concorda amb la disminució de la llum del dia i les hores de sol (Knip, Veijola et al. 2005, Frese and Sandholzer 2013).
- Obesitat. Existeix una relació directa entre l'obesitat i l'aparició d'autoanticossos contra l'autoantigen antitirosina fosfatasa (IA-2), fet que representa un risc addicional en el desenvolupament de la malaltia (Bruining 2000).
- Toxines. Els nitrats i nitrats són additius alimentaris que serveixen per preservar els aliments i que es transformen en nitrosamines a l'intestí. La nitrosamina és una toxina associada amb un increment del risc de la T1D (Dahlquist, Blom et al. 1990, Akerblom, Vaarala et al. 2002).

- Factors perinatals. Els factors perinatals, com ara mares d'edat avançada, parts amb cesària, pes alt del nadó o gestacions curtes, marquen una tendència a augmentar el risc de desenvolupar T1D. No obstant això, les associacions entre els factors perinatals i el desenvolupament de la T1D són febles i inconsistents i és difícil concloure'n una influència directa (Stene and Gale 2013).
- Macro i microbiota intestinal (Saunders, Raine et al. 2007, Wen, Ley et al. 2008).

1.3.4 Estadis de la T1D

Els autoanticossos contra els illots pancreàtics són conseqüència de la destrucció autoimmune dels illots, i apareixen molts anys abans de desenvolupar la malaltia (Redondo and Gómez-Peralta 2006). Els 3 autoantígens principals contra els quals van dirigits els autoanticossos són: insulina, GAD65 i antitirosina fosfatasa (IA-2). Fins a un 90% dels pacients de recent diagnòstic presenten 1 o més d'aquests 3 antígens (Verge, Gianani et al. 1996, Bingley, Williams et al. 1999, Notkins and Lernmark 2001). No obstant això, els autoanticossos contra els illots pancreàtics no són sempre detectats en tots els pacients de T1D (Pietro Paolo, Becker et al. 2002).

Tot i que no és clar com té lloc la pèrdua de massa beta cel·lular, la hipòtesi més acceptada és que es destrueix de manera crònica i progressiva (Bleich, Jackson et al. 1990). El marcador patològic clàssic de la T1D és la invasió limfocitària dels illots pancreàtics, anomenada insulinitis. Només els illots que contenen cèl·lules beta productores d'insulina presenten invasió limfocitària (Itoh, Hanafusa et al. 1993, Foulis 1996).

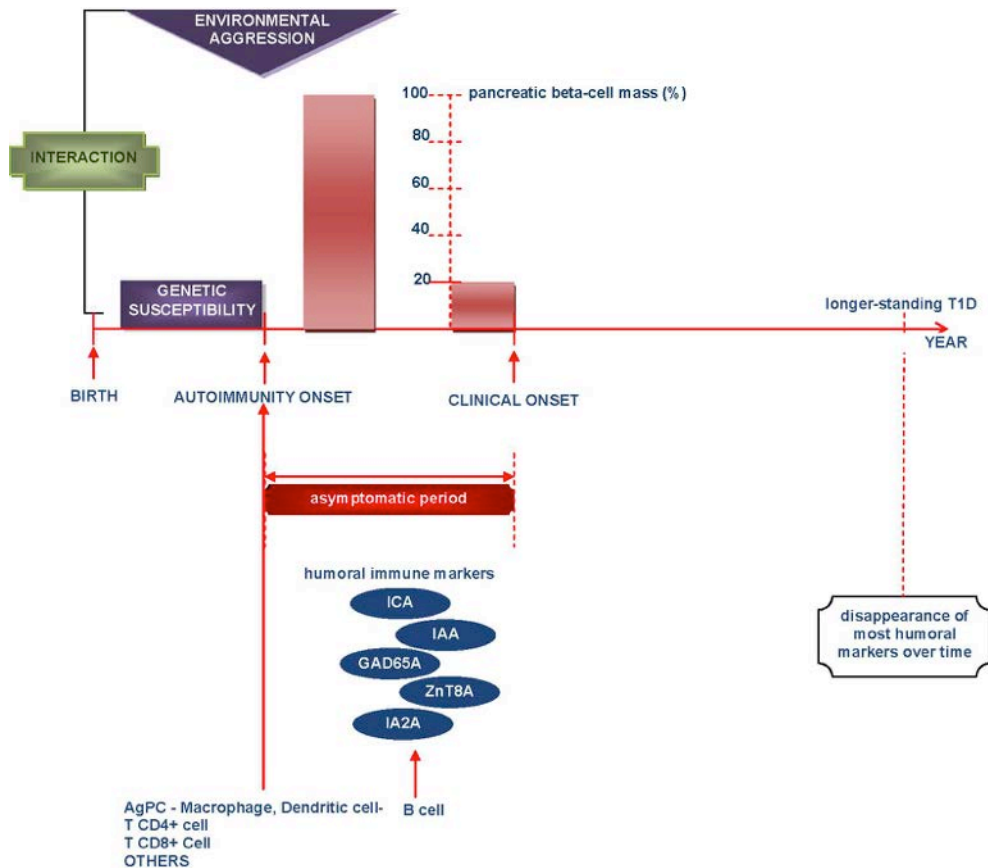


Figura 1-6: Història natural de la T1D (Aribi 2011).

El procés que condueix a la destrucció de les cèl·lules productores d'insulina (Figura 1-6) es pot classificar en una sèrie d'etapes:

- 1) Predisposició genètica. Diferents factors genètics influeixen en la susceptibilitat a desenvolupar la T1D; no obstant això, la presència d'un factor d'alt risc no dictamina el desenvolupament de la malaltia (Erlich, Zeidler et al. 1993).
- 2) Desencadenament de l'autoimmunitat. Les infeccions víriques, les vacunes i la dieta semblen ser els desencadenants principals de la malaltia en individus genèticament susceptibles (Brink 2004).
- 3) Manifestació. Els primers marcadors de l'autoimmunitat contra l'illot són els autoanticossos. Els primers autoanticossos solen reconèixer la insulina, encara que l'autoanticòs GAD65 també és rellevant (Ziegler, Hummel et al. 1999, Colman, Steele et al. 2000).
- 4) Defectes metabòlics. La massa beta cel·lular pateix una reducció progressiva (Beer, Heaton et al. 1990, Bingley, Colman et al. 1992).

- 5) Defectes en el test de tolerància a la glucosa / prediabetis. Els pacients solen ser asimptomàtics, encara que progressen ràpidament a un estat clínic evident, amb un test de tolerància a la glucosa anormal (Brink 2004).
- 6) Manifestació clínica de la diabetis. Es dona la destrucció de la major part de la massa beta cel·lular, que condueix a la reducció dramàtica de la producció d'insulina. S'estipula que la hiperglucèmia apareix quan resta menys del 20% de la massa beta (Brink 2004).

1.3.5 Mecanismes involucrats en la destrucció de les cèl·lules beta

La iniciació i progressió de la destrucció de la massa beta cel·lular continua sent poc clara, tot i els nombrosos estudis de la T1D (Figura 1-7). Els models animals, com ara la rata *biobreeding* (BB) o el ratolí *non-obese diabetic* (NOD), han ajudat a elucidar els mecanismes involucrats en l'etiopatogènia de la malaltia. En aquests animals, els macròfags i les cèl·lules dendrítiques (DC) són els primers tipus cel·lulars del sistema immunitari que infiltren l'illot pancreàtic. Quan els antígens propis són capturats, es produeix una activació de les cèl·lules dendrítiques i dels macròfags i aquests migren als ganglis limfàtics regionals. Allí activarien limfòcits T autoreactius que proliferarien i migrarien al pàncrees. Les cèl·lules T CD4⁺ secreten IFN- γ , el qual activa altres macròfags inactius, que alliberen citocines, com ara IL-1 β , TNF- α , i radicals lliures, que són tòxics per a la cèl·lula beta. Durant aquest procés, s'indueix la migració de les cèl·lules T CD8⁺ perifèriques als illots inflamats mitjançant l'alliberament de diferents citocines. Les cèl·lules T CD8⁺ alliberen perforina i granzima, i són una font important de FasL. A més a més, el nostre grup ha demostrat que els limfòcits diabetogènics T CD4⁺ contribueixen significativament a la destrucció de la cèl·lula beta, i requereixen l'expressió de Fas a aquestes cèl·lules (Yoon and Jun 2005, Wen, Green et al. 2011).

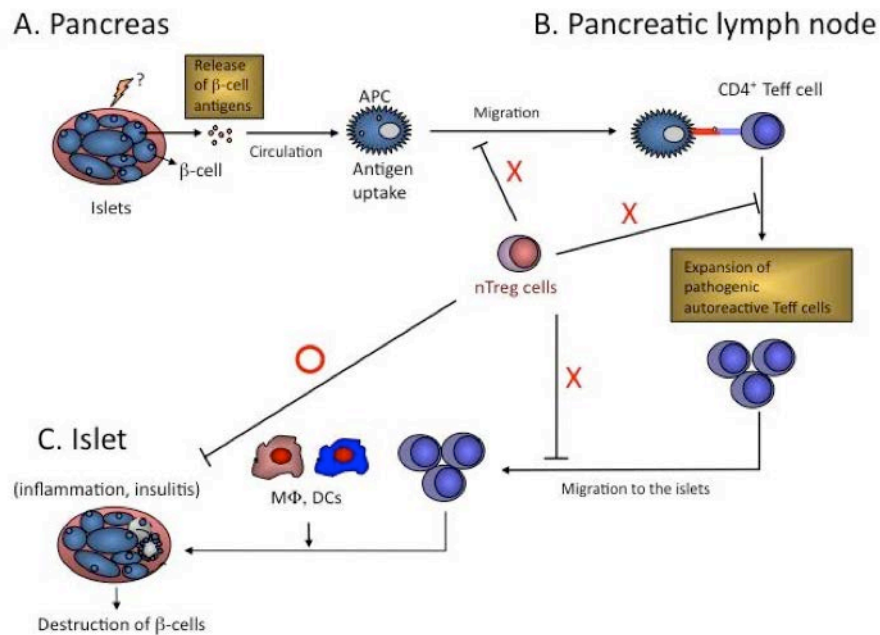


Figura 1-7: Patogènesi de la T1D (Lee, Liu et al. 2011).

Mentre que la IL-12 polaritza les cèl·lules T cap a Th1, les quals secreten $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-2, IL-1 β , etc.; la IL-4 polaritza les cèl·lules Th2, les quals secreten IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, etc. (Lafaille 1998, Crane and Forrester 2005). Hi ha diferents factors, com ara l'estrès físic, psicològic i químic, que poden produir una desregulació de l'equilibri en les proporcions dels subtipus Th1 CD4⁺ i Th2 CD4⁺ (Rabinovitch 1994, Thorvaldson, Johansson et al. 2005). La T1D requereix les cèl·lules Th1 (Kida, Kaino et al. 1999, Sharif, Arreaza et al. 2002, Yoon and Jun 2005), mentre que les cèl·lules Th2 estan associades amb la protecció de les cèl·lules beta (Cameron, Arreaza et al. 1997, Ko, Lee et al. 2001, Suarez-Pinzon and Rabinovitch 2001).

Es creu que la resposta immune cel·lular, i no la humoral, és la responsable de la mort beta cel·lular. El limfòcits T són els majors efectors de la resposta autoimmunitària dirigida contra les cèl·lules beta. Tant els limfòcits T CD4⁺ com els CD8⁺ són necessaris per al desenvolupament de la malaltia, ja que indueixen la mort directa i indirecta de les cèl·lules beta, majoritàriament per apoptosi, però la necrosi també hi pot participar (Graser, DiLorenzo et al. 2000, Di Lorenzo, Peakman et al. 2007). Tot i que els limfòcits T són els efectors més importants, les cèl·lules presentadores d'antígens (APC) són necessàries per a la iniciació i el posterior desenvolupament de la malaltia. Els limfòcits B contribueixen a la T1D mitjançant la seva funció presentadora d'antigen (Silveira, Serreze et al. 2007).

1.3.6 Models de la diabetis autoimmune

1.3.6.1 Ratolí NOD (*non-obese diabetic*)

El model de ratolí de diabetis autoimmune espontània es va descobrir a finals de 1970 per Makino et al. (Makino, Kunimoto et al. 1980). Els ratolins NOD comencen a desenvolupar periinsulitis pancreàtica quan arriben a les 4 o 5 setmanes d'edat, i l'inici de la diabetis apareix de les 12 a les 14 setmanes (Figura 1-8). Generalment, la incidència de T1D és més alta i es desenvolupa més ràpidament en les femelles que en els mascles. No obstant això, quan es crien en un ambient lliure de patògens, gairebé el 100% dels animals desenvolupa la malaltia (Pozzilli, Signore et al. 1993, Serreze and Leiter 2001). S'ha comprovat que la castració en mascles accelera la malaltia, i en femelles, la retarda, conduint a l'especulació que els andrògens exerceixen un efecte protector (Makino, Kunimoto et al. 1981, Verheul, Verveld et al. 1995, Toyoda, Takei et al. 1996).

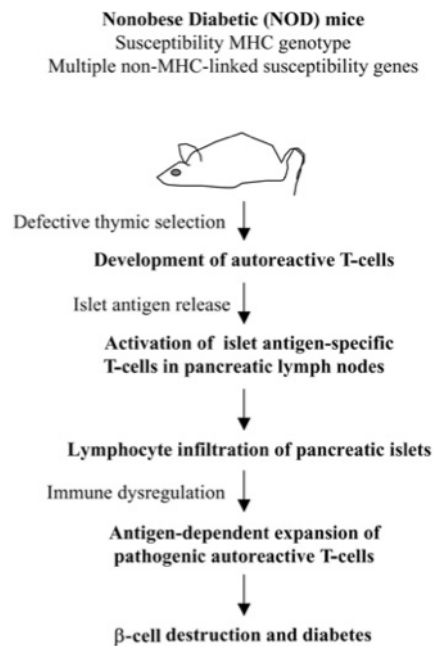


Figura 1-8: Model animal NOD (Yang and Santamaria 2006).

Com en humans, en ratolins s'han trobat locus associats a la susceptibilitat a desenvolupar T1D anomenats Idd. S'han trobat fins a 27 locus i 15 cromosomes diferents associats amb la diabetis

o insulinitis. El ratolí NOD té un haplotip únic de l'MHC, anomenat H-2^{g7}, que és essencial i és el contribuïdor genètic més gran en la susceptibilitat de la malaltia (Wicker, Todd et al. 1995).

La tolerància intratímica i perifèrica és defectuosa en els ratolins NOD (Markees, Serreze et al. 1999, Kishimoto and Sprent 2001). La iniciació i la progressió de la destrucció autoimmunitària de la cèl·lula beta requereixen cèl·lules T CD4 i CD8. A més a més, en el debut diabètic, els ratolins NOD contenen una població perifèrica de limfòcits T CD4 que poden causar la malaltia de manera independent per transferència adoptiva a recipients NOD/SCID (Christianson, Shultz et al. 1993, Peterson, Pike et al. 1994, Wong, Visintin et al. 1996, Wong and Janeway 1997, DiLorenzo, Graser et al. 1998, Wong, Visintin et al. 1998, Graser, DiLorenzo et al. 2000).

El ratolí NOD també té defectes en múltiples subgrups de leucòcits, els quals inclouen una maduració i funció defectiva en els macròfags (Serreze, Gaedeke et al. 1993), nivells baixos i defectes en les cèl·lules NK (Kataoka, Satoh et al. 1983, Wang, Geng et al. 2001, Ogasawara, Hamerman et al. 2003), deficiències en les poblacions T reguladores CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Salomon, Lenschow et al. 2000), l'absència de l'activitat de les molècules del complement C5a i de l'activitat hemolítica (Baxter and Cooke 1993) i limfopènia (King, Ilic et al. 2004).

1.3.6.2 Ratolí NOD/SCID

Bosma et al. van descriure els ratolins amb immunodeficiència severa combinada (SCID). Els ratolins homozigots per a la mutació SCID són deficients en limfòcits T i B funcionals, de manera que no desenvolupen T1D (Bosma, Custer et al. 1983). No obstant això, les cèl·lules NK i les cèl·lules mieloides no es veuen afectades (Dorshkind, Pollack et al. 1985).

1.3.6.3 Línia cel·lular NIT-1

La disponibilitat de teixit endocrí pancreàtic és limitada, i per tant, l'ús de cèl·lules beta primàries està condicionat a aquesta disponibilitat. D'altra banda, l'avantatge més gran d'utilitzar el cultiu cel·lular és la consistència i reproductibilitat dels resultats que se'n poden obtenir. No obstant això, també hi ha desavantatges que s'han de tenir en compte: les línies cel·lulars són cèl·lules immortalitzades, i algunes, tumorals, i poden tenir un contingut cromosòmic anormal, mutacions genètiques, expressió anormal de proteïnes i metabolisme modificat (Skelin, Rupnik et al. 2010).

El 1991, Hamaguchi et al. van generar una línia cel·lular d'insulinoma, NIT-1, que té característiques similars a la cèl·lula beta pancreàtica, com ara secreció d'insulina estimulada per glucosa, i característiques estructurals diferenciades de cèl·lules beta de ratolí. Les cèl·lules NIT-1 deriven del ratolí transgènic NOD/Lt, que expressa l'antigen T gran del SV40 en les cèl·lules beta pancreàtiques. Aquesta línia cel·lular ha estat utilitzada en molts dels estudis *in vitro* relacionats amb T1D (Hamaguchi, Gaskins et al. 1991).

1.4 Fisiologia de la cèl·lula beta

El pàncrees és una glàndula exocrina, porció formada pel teixit acinar responsable de secretar enzims digestius al suc pancreàtic, i endocrina. La porció endocrina comprèn els illots pancreàtics, formats per les cèl·lules beta, alfa, delta, PP i èpsilon; encarregades de la secreció d'insulina, glucagó, somatostatina, polipèptid pancreàtic i grelina, respectivament. El pàncrees endocrí representa de l'1 al 5% de la massa total pancreàtica. Les cèl·lules beta representen aproximadament el 70–80% de la massa total dels illots i la seva funció principal és la producció, l'emmagatzematge i la secreció regulada d'insulina. Quan la cèl·lula beta es veu estimulada per un augment de glucosa en sang, es comença a secretar insulina ràpidament. Aquest increment en la secreció d'insulina es veu compensat per un increment en la seva biosíntesi, mantenint les reserves d'insulina de la cèl·lula beta constants (Rhodes 2004, Lazo de la Vega-Monroy and Fernandez-Mejia 2011).

1.4.1 La secreció d'insulina estimulada per glucosa

La insulina està emmagatzemada en grànuls que poden estar ancorats a la membrana plasmàtica o lliures al citosol de la cèl·lula beta. Els últims són els grànuls de reserva. Quan arriben a la membrana després de la translocació des de la reserva, s'uneixen i es preparen per estar a punt per alliberar-se. La preparació consisteix en una acidificació de l'interior dels grànuls que facilita l'exocitosi. Per tant, els grànuls ancorats poden ser preparats o no preparats. A més a més, els grànuls preparats es poden subdividir en un grup que es pot definir com a llestos per alliberar i en un altre grup més petit definit com a immediatament alliberables. Quan hi ha una estimulació continuada de l'alliberament d'insulina, els grànuls es traslladen a la membrana plasmàtica, s'ancoren, i es preparen per a l'alliberament i l'exocitosi (Figura 1-9) (Proks,

Eliasson et al. 1996, Barg, Huang et al. 2001, Barg, Eliasson et al. 2002, Bratanova-Tochkova, Cheng et al. 2002, Olofsson, Gopel et al. 2002).

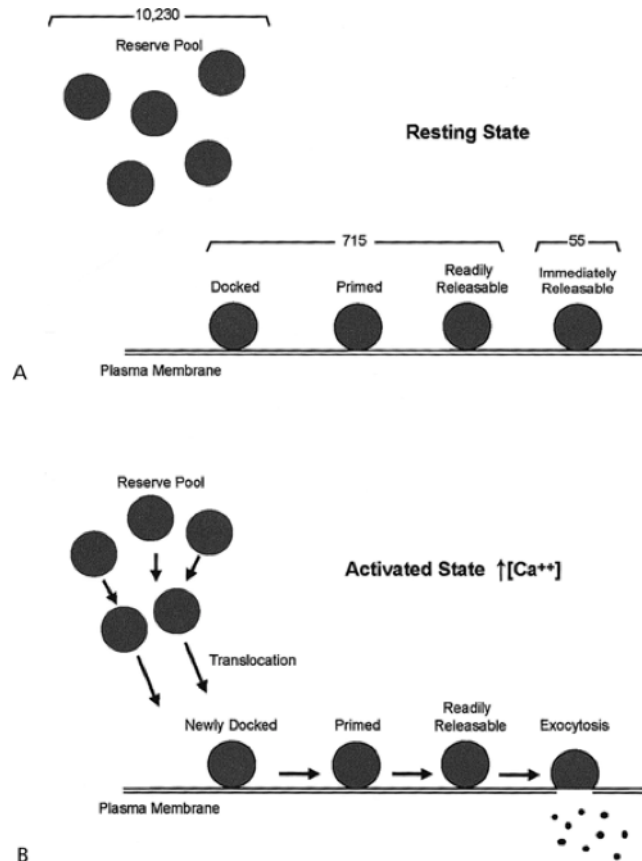


Figura 1-9: Reserves granulars de la cèl·lula beta (Straub and Sharp 2004).

El canal de potassi sensible a ATP (canal KATP) és sensible a glucosa (Ashcroft, Harrison et al. 1984). Quan la cèl·lula beta està exposada a glucosa, aquesta entra al citosol i augmenta la producció d'ATP, el canal es tanca i es despolaritza la cèl·lula. La despolarització obre els canals de calci dependents de voltatge, la qual cosa dona lloc a un increment de la concentració de calci intracel·lular i l'estimulació de la secreció d'insulina (Figura 1-10) (Wollheim and Sharp 1981, Ashcroft, Harrison et al. 1984, Hoenig and Sharp 1986). Per tant, el canal KATP és l'enllaç entre el metabolisme de la glucosa i l'estimulació de la secreció d'insulina. Aquesta ruta de senyalització es coneix com a via d'activació o via dependent dels canals de KATP. Existeix una segona ruta de senyalització de la glucosa que augmenta la resposta secretora quan no hi ha un increment del calci intracel·lular. Aquesta ruta s'anomena via d'amplificació independent del

canal KATP. Les 2 vies, la dependent i la independent, actuen en conjunt, complementant-se (Best, Yates et al. 1992, Gembal, Gilon et al. 1992, Sato, Aizawa et al. 1992, Henquin 2000, Bratanova-Tochkova, Cheng et al. 2002).

La primera fase de secreció d'insulina es caracteritza per un equilibri ràpid de la glucosa intracel·lular i extracel·lular de la cèl·lula beta, facilitat per l'excés de transportadors de glucosa del tipus GLUT-2 a la membrana plasmàtica. La glucocinasa controla el metabolisme inicial de la glucosa (Matschinsky 1996), la qual cosa dóna una elevació de la ràtio d'ATP/ADP i el tancament dels canals KATP. L'activitat de la glucocinasa i la velocitat de conversió de la glucosa a la glucosa-6-fosfat determina la velocitat de secreció d'insulina i la quantitat secretada durant les 2 fases de secreció. La despolarització de la cèl·lula beta comporta l'obertura dels canals de calci dependents de voltatge, l'increment en l'entrada del calci i l'exocitosi dels grànuls d'insulina (Ashcroft, Harrison et al. 1984).

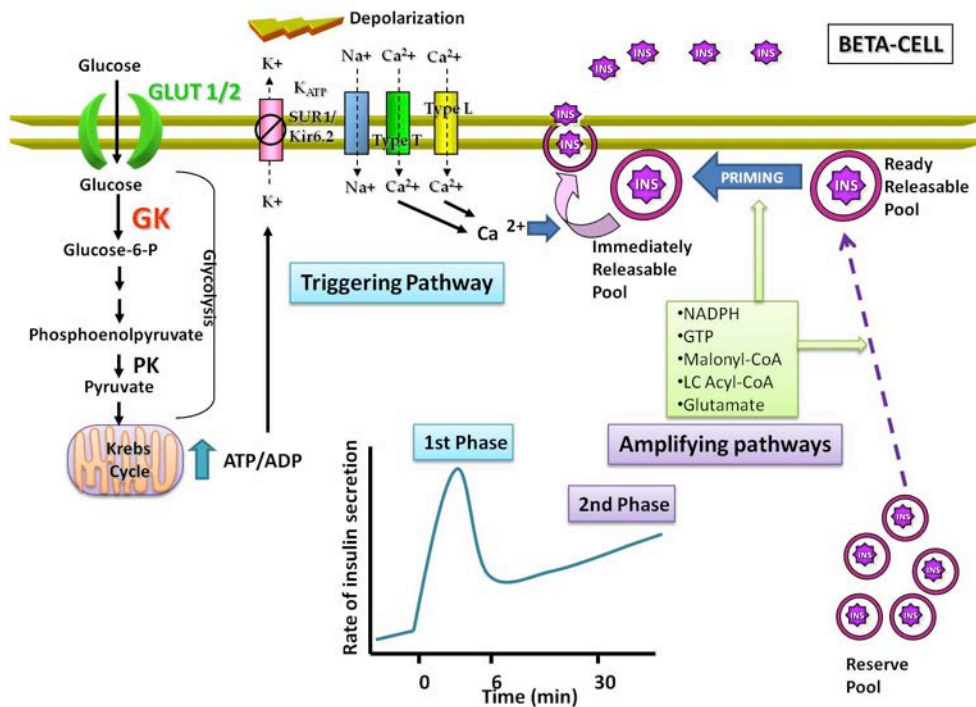


Figura 1-10: Mecanisme de la secreció bifàsica d'insulina estimulada amb glucosa (Lazo de la Vega-Monroy and Fernandez-Mejia 2011).

La segona fase de la secreció d'insulina es deu a la via independent dels canals KATP, i actua per potenciar l'efecte de la via dependent dels canals KATP. No es coneixen els mecanismes

mitjançant els quals s'activa la via independent dels canals KATP. No obstant això, la seva funció principal és incrementar la velocitat de transferència dels grànuls ancorats als grànuls ancorats immediatament alliberats (Taguchi, Aizawa et al. 1995, Aizawa, Komatsu et al. 1998, Wiser, Trus et al. 1999, Straub and Sharp 2004).

Les incretines són hormones peptídiques secretades a l'intestí, que actuen en teixits perifèrics promovent l'absorció i l'emmagatzematge d'energia. El polipèptid insulinoatròpic dependent de la glucosa (GIP) i el pèptid similar al glucagó-1 (GLP-1) són les hormones incretines més importants secretades al tracte gastrointestinal, que potencien la secreció d'insulina estimulada per glucosa (GSIS) postprandial. Les incretines estimulen la secreció d'insulina a través de la modulació de l'activitat dels canals KATP, la qual cosa incrementa el flux de calci (Drucker 2007, McIntosh, Widenmaier et al. 2009, Jitrapakdee, Wutthisathapornchai et al. 2010, McIntosh, Widenmaier et al. 2010).

1.4.2 Electrofisiologia de la cèl·lula beta pancreàtica

Les cèl·lules beta són excitables elèctricament, i d'aquesta manera es regula la secreció d'insulina. En aquest procés de secreció d'insulina hi ha un nombre elevat de canals d'ions, bombes i transportadors que contribueixen a la regulació del calci intracel·lular i al potencial de membrana (V_m). El potencial de les cèl·lules beta de ratolí en estat basal és aproximadament -70 mV, quan la glucosa extracel·lular és 3 mM, gràcies al canal KATP. L'augment de la concentració de glucosa per sobre dels 8 als 10 mM condueix a la despolarització de la cèl·lula beta (Sherman, Rinzell et al. 1988, Sherman 1996, Bertram, Previte et al. 2000, Fridlyand, Tamarina et al. 2003, Houamed, Fu et al. 2004).

1.4.3 Regulació del gen de la insulina

La insulina s'uneix a receptors específics que són presents a les superfícies cel·lulars, de manera que s'activen les cascades de senyalització anabòliques, captació de nutrients, emmagatzematge d'energia i creixement. Quan els nivells de glucosa en sang són baixos, hi ha una disminució dels nivells d'insulina, la qual cosa resulta amb l'alliberament de l'energia emmagatzemada i la síntesi de glucosa pel fetge, o gluconeogènesi hepàtica (Figura 1-11) (German 2004).

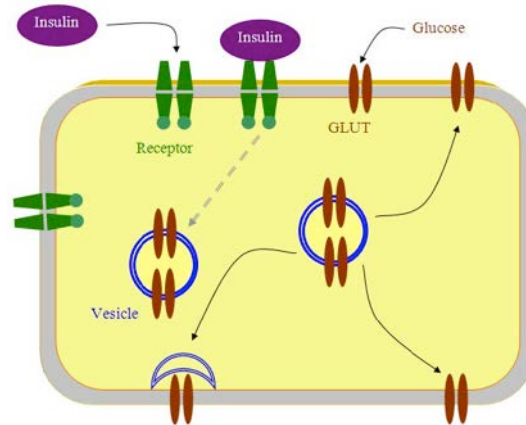


Figura 1-11: L'hormona insulina indueix la recepció de la glucosa a l'interior de les cèl·lules (Wiltgen and Tilz 2012).

El gen de la insulina humana (INS) es localitza al cromosoma 11p15.5; conté 3 exons i 2 introns, i el transcrit d'RNA missatger final (mRNA) té una llargada de 446 bp, el qual codifica per al pèptid de la preproinsulina. La glucosa estimula la transcripció del gen de la insulina indirectament a través dels productes finals del seu catabolisme, com ara l'ATP o els derivats de l'acil-CoA. La fase limitant de la glicòlisi en la cèl·lula beta és la fosforilació de la glucosa a glucosa-6-fosfat mitjançant la glucocinasa. Quan la freqüència de la fosforilació de la glucosa augmenta, s'accelera la glicòlisi i s'activa el promotor de la insulina (German 1993, German 2004).

1.4.4 Processament de la molècula d'insulina

La insulina humana biològicament activa consisteix en 2 cadenes polipeptídiques, la cadena A (21 aminoàcids) i la cadena B (30 aminoàcids), unides entre si mitjançant 2 ponts de disulfur (Figura 1-12) (Steiner, Chan et al. 1985).

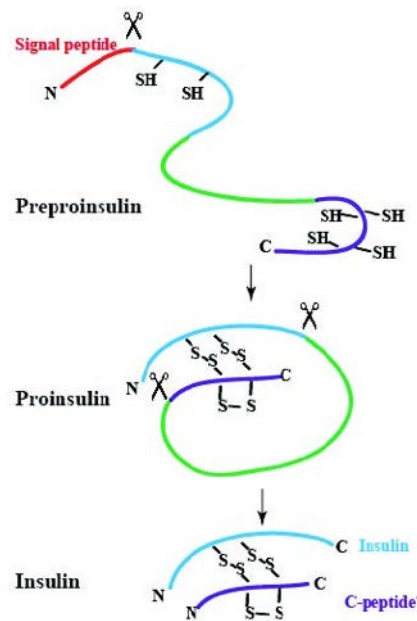


Figura 1-12: Biosíntesi de la insulina en la cèl·lula beta (Zhong 2013).

La molècula precursora de la insulina és la preproinsulina, que està composta per un pèptid senyal hidrofòbic a la part N-terminal de 24 aminoàcids, seguit de la cadena d'insulina B, una seqüència Arg-Arg, 31 aminoàcids del pèptid connector (pèptid-C), una seqüència Lys-Arg, i després, la cadena de la insulina A. El pèptid senyal facilita la translocació de la preproinsulina del citoplasma (on s'inicia la biosíntesi) a través de la membrana del reticle endoplasmàtic rugós (RER). El pèptid senyal s'elimina a mesura que el pèptid nou es va sintetitzant i transposant al lumen del RER, i genera la molècula precursora proinsulina (Chan, Keim et al. 1976, Bell, Pictet et al. 1980, Pfeffer and Rothman 1987).

La proinsulina, correctament plegada, pot passar a l'aparell de Golgi des del RER en vesícules de transport. El transport a través de l'aparell de Golgi dona com a resultat un grànul beta immadur que comença un procés de maduració. Els grànuls beta madurs contenen insulina cristal·litzada i pèptid C soluble, i es mantenen en una reserva intracel·lular esperant un senyal que en mobilitza el transport cap a la membrana plasmàtica per a la seva exocitosi (Kemmler and Steiner 1970, Howell 1972, Kelly 1985, Burgess and Kelly 1987, Orci, Ravazzola et al. 1987, Rhodes, Lucas et al. 1987, Hurtley and Helenius 1989).

1.4.5 Altres hormones

Les cèl·lules alfa secreten glucagó en resposta a la hipoglucèmia. El glucagó i l'epinefrina eleven els nivells de glucosa en plasma mitjançant l'estimulació de la gluconeogènesi hepàtica. Quan tots dos, glucagó i epinefrina, són absents i la insulina és present es dona a terme un estat d'hipoglucèmia (Tse, Clutter et al. 1983, Rosen, Clutter et al. 1984, Boyle, Shah et al. 1989, Hirsch, Marker et al. 1991, Marker, Hirsch et al. 1991, Dobbins, Davis et al. 1998, Taborsky, Ahren et al. 1998).

1.4.6 Transport de glucosa

La insulina regula la captació de glucosa pels teixits perifèrics a través del transportador de glucosa GLUT-4, també anomenat transportador de glucosa sensible a la insulina, que es localitza en membranes intracel·lulars de múscul i teixit adipós en condicions basals. L'acció de la insulina en aquests teixits redistribueix aquests transportadors intracel·lulars a la membrana plasmàtica, on poden catalitzar l'absorció de glucosa extracel·lular (Cushman and Wardzala 1980, Suzuki and Kono 1980).

1.4.7 Estrès, mort beta cel·lular i tolerància immunològica induïts per citocines

La IL-1 β , l'IFN γ i el TNF α exerceixen una varietat d'efectes en les cèl·lules beta (Figura 1-13). Augmenten l'apoptosi de les cèl·lules beta mitjançant l'expressió de proteïnes proapoptòtiques, com ara el receptor Fas. Afavoreixen la resposta autoimmune mitjançant la secreció de quimiocines per part de les cèl·lules beta, de la qual cosa resulta el reclutament constant de cèl·lules T autoreactives. A més a més, les citocines proinflamatòries causen estrès a les cèl·lules beta, de manera que al final s'activa la maquinària de mort cel·lular (Stassi, De Maria et al. 1997, Frigerio, Junt et al. 2002, Vincenz, Szegezdi et al. 2011).

La IL-1 β induïx el receptor Fas (CD95) en cèl·lules beta de ratolins i humans *in vitro* (Stassi, Todaro et al. 1995, Yamada, Takane-Gyotoku et al. 1996). La unió dels receptors Fas amb els seus lligands (FasL), expressats en limfòcits T activats, condueix a la mort cel·lular de les cèl·lules que expressen els receptors Fas (Nagata and Golstein 1995). Els limfòcits T CD4⁺ requereixen Fas per a la seva acció diabetogènica (Wen, Green et al. 2011).

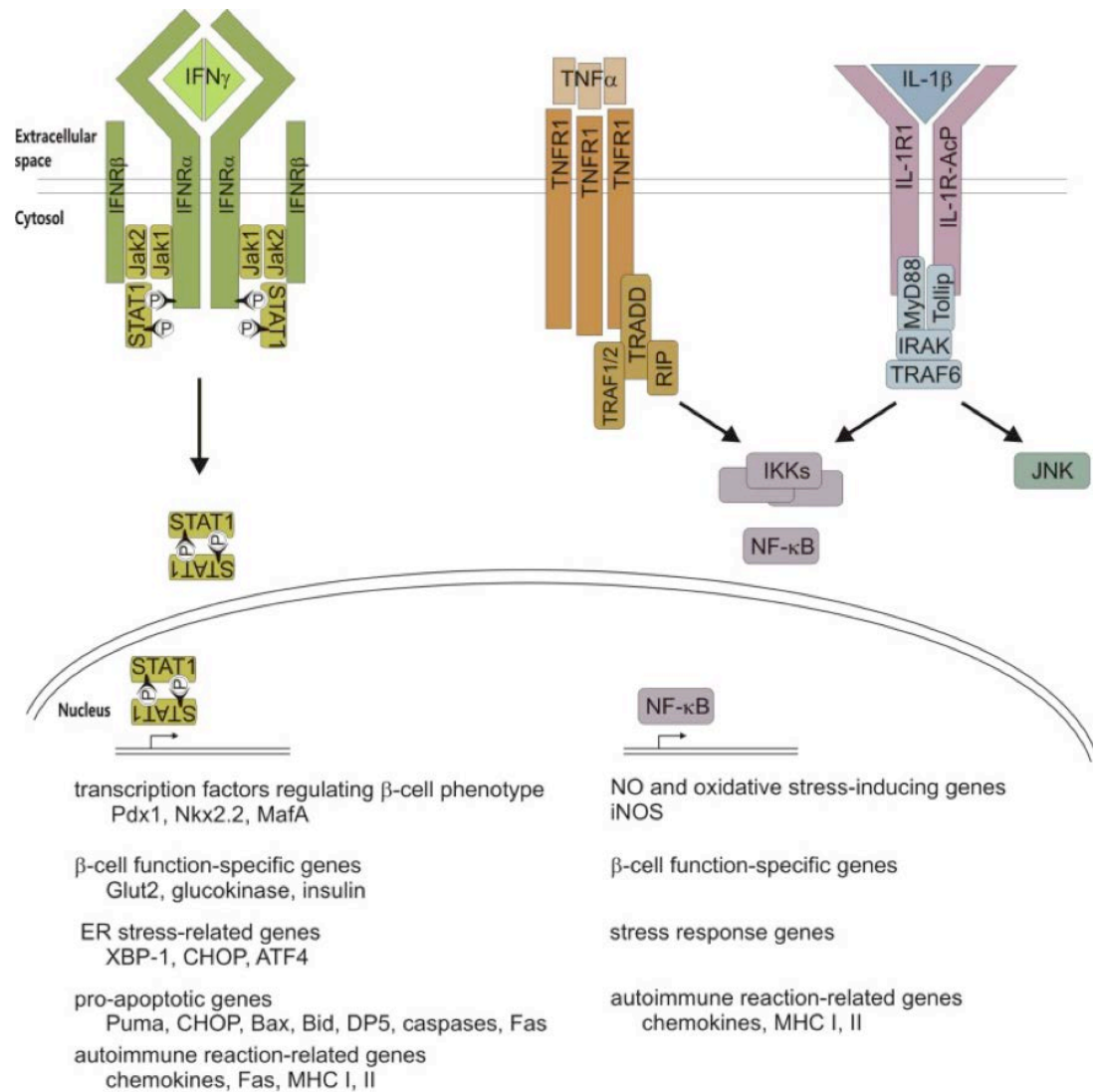


Figura 1-13: Senyalització de les citocines a les cèl·lules beta pancreàtiques (Vincenz, Szegezdi et al. 2011).

És important destacar que les citocines proinflamàtores, de manera aïllada, tenen efectes limitats, però quan actuen en combinació tenen efectes sinèrgics que culminen amb la mort cel·lular (Vincenz, Szegezdi et al. 2011). A més a més, el nostre grup ha demostrat que la inflamació provoca la disminució de l'expressió de la ciclina D3 a les cèl·lules beta del ratolí NOD, la qual cosa en provoca l'apoptosi i en compromet la funcionalitat sense afectar la seva activitat de proliferació (Saavedra-Ávila, Sengupta et al. 2014).

El mediador més important en la ruta de senyalització de la IL-1β i el TNFα és el factor de transcripció nuclear kappa B (NF-κβ). L'activació de l'NF-κβ tant per TNFα com per IL-1β té un

efecte proapoptòtic en cèl·lules beta pancreàtiques de rata i ratolí. Aquest efecte és més pronunciat en la resposta a IL-1 β que a TNF α (Kwon, Corbett et al. 1995, Flodstrom, Welsh et al. 1996, Eldor, Yeffet et al. 2006, Ortis, Cardozo et al. 2006, Ortis, Pirot et al. 2008). L'NF- κ B és el regulador per excel·lència dels processos inflamatoris, és un complex multiproteic i un factor de transcripció que regula l'expressió de més de 200 gens (Igoillo-Esteve, Gurzov et al. 2011). Curiosament, el promotor de la ciclina D3 conté llocs d'unió a NF- κ B (Wang, Sicinski et al. 1996).

Els efectes de l'IFN γ en les cèl·lules beta estan transmesos principalment per STAT-1, a través del qual controla processos clau que culminen en la pèrdua de la funció de la cèl·lula beta, estrès i finalment mort (Takeda and Akira 2000, Moore, Naamane et al. 2011).

Durant el desenvolupament de la T1D hi ha 2 onades de mort beta cel·lular. En rosegadors, a les 2–3 setmanes d'edat, hi ha un remodelatge fisiològic del teixit del pàncrees que pot induir la diabetis. Tot i que la mort cel·lular programada associada amb el remodelatge del teixit no indueix inflamació, si les cèl·lules mortes no són ràpidament eliminades per fagocitosis, poden alliberar el contingut cel·lular, la qual cosa desencadena la inflamació (Turley, Poirot et al. 2003, Kim, Han et al. 2007). Aquesta primera onada d'apoptosi es duu a terme mitjançant mecanismes passius. Durant el procés de neteja de les cèl·lules apoptòtiques es produeixen citocines associades amb la inducció de tolerància, com ara el TGF- β . El TGF- β és una citocina immunosupressora essencial per a la diferenciació de les cèl·lules Treg que pot ser produïda per cèl·lules apoptòtiques, però que sobretot és secretada per DC o macròfags que han fagocitat cèl·lules apoptòtiques (Hodge, Hodge et al. 2002, Kleinclaus, Perruche et al. 2006, Horwitz, Zheng et al. 2008, Nacu, Luzina et al. 2008, Curotto de Lafaille and Lafaille 2009, Zhang, Xu et al. 2011). La segona onada de mort cel·lular és un procés continu i gradual que va destruint massa cel·lular mitjançant l'atac autoimmune (mecanismes actius). L'apoptosi i, en certes condicions, la necrosi són els mecanismes d'inducció de mort cel·lular que condueixen al fenotip diabètic (Vincenz, Szegezdi et al. 2011).

L'apoptosi és induïda mitjançant l'acció de la família de les caspases. Les caspases són cisteïna–proteases que poden dividir-se en inductores i executores de l'apoptosi i es poden activar per 2 mecanismes: la via extrínseca i la via intrínseca. La via extrínseca és causada per un estímul proapoptòtic extracel·lular, que s'uneix a un receptor proapoptòtic de la superfamília dels TNFR o Fas. Aquestes caspases activades activen efectors que donen la subseqüent proteòlisi que desmantella la cèl·lula. D'altra banda, la via intrínseca s'inicia en l'àmbit

mitocondrial quan hi ha estrès intracel·lular. Aquests orgànuls alliberen citocrom c, que s'associa amb altres efectors, es forma l'apoptosoma i s'activa la caspasa-9. La caspasa-9 activada, condueix a la mateixa cascada de caspases de la via extrínseca, que culmina amb la mort cel·lular. El procés intrínsec està controlat pels membres de la família de les proteïnes Bcl-2. (Samali, Zhivotovsky et al. 1999, Riedl and Salvesen 2007, Vincenz, Szegezdi et al. 2011).

La producció intracel·lular de ROS i NO, induïda per citocines, causa l'estrès i mort beta cel·lular necròtica i apoptòtica en models animals de rosegadors (Welsh, Eizirik et al. 1994, Hoorens, Stange et al. 2001, Holohan, Szegezdi et al. 2008).

Les citocines inflammatòries indueixen estrès al reticle endoplasmàtic (RE) a través de diferents mecanismes, incloent-hi les espècies reactives de l'oxigen (ROS), NF- κ B i JNK. Les cèl·lules beta pancreàtiques tenen un RE molt desenvolupat, a fi de dur a terme la seva funció biològica de secretar insulina i altres glicoproteïnes, la qual cosa causa una gran sensibilitat de la cèl·lula beta a l'estrès del RE (Laybutt, Preston et al. 2007, Malhotra and Kaufman 2007, Eizirik, Cardozo et al. 2008).

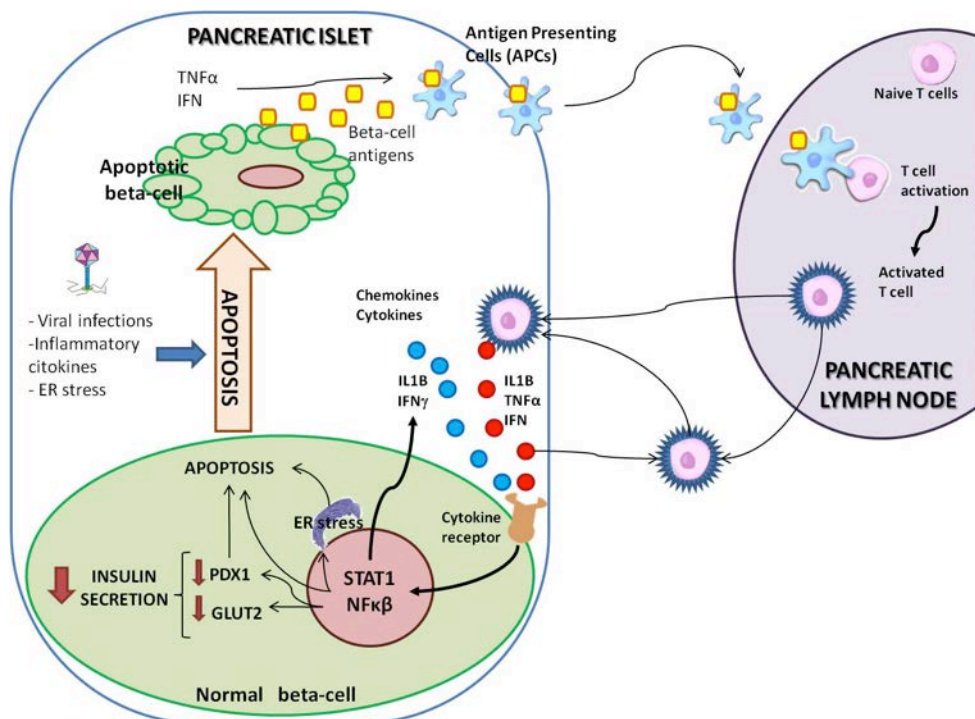


Figura 1-14: Inducció i progressió de la insulinitis (Lazo de la Vega-Monroy and Fernandez-Mejia 2011).

Resumint, tant la via extrínseca com la intrínseca, així com la necrosi, es troben en la base de la patogènia de la T1D, i l'apoptosi és la més rellevant (Figura 1-14).

1.4.8 Generació de massa beta

Els 3 principals mecanismes de regeneració de la massa beta són la proliferació de cèl·lules beta ja existents, la neogènesi a partir de precursors que no són cèl·lules beta i la transdiferenciació d'un altre tipus cel·lular a cèl·lules beta (Figura 1-15).

La vida mitjana de les cèl·lules beta en rosegadors d'edat jove és de 30 a 60 dies. La taxa de replicació de les cèl·lules beta dels illots humans adults s'ha estimat que és 10 vegades més baixa, comparada amb la dels ratolins adults. A més a més, en humans, la freqüència de replicació de les cèl·lules beta és aproximadament 150 cops més elevada en cèl·lules beta prenatales, comparada amb illots adults (Finegood, Scaglia et al. 1995, Butler, Janson et al. 2003, Butler, Meier et al. 2007, Kohler, Olewinski et al. 2011).

La transformació de les cèl·lules adultes diferenciades en altres tipus cel·lulars s'anomena transdiferenciació o reprogramació cel·lular. Thorel et. al. van trobar que el pàncrees adult de rosegadors pot regenerar cèl·lules beta a partir de la reprogramació de cèl·lules alfa, quan hi ha un pèrdua gairebé total de la massa beta pancreàtica (Thorel, Nepote et al. 2010). Les cèl·lules alfa no són l'únic tipus cel·lular que pot donar lloc, mitjançant reprogramació, a cèl·lules beta. Les cèl·lules acinars, o teixit exocrí (Zhou, Brown et al. 2008), i les cèl·lules delta (Chera, Baronnier et al. 2014) també estan involucrades en aquest procés de plasticitat cel·lular.

El concepte de neogènesi fa referència a la formació de noves cèl·lules a partir de progenitors més o menys indiferenciats o cèl·lules mare. Com han demostrat Bonner-Weir et. al., la formació de cèl·lules beta a partir de progenitors de teixit pancreàtic no endocrí (cèl·lules precursoras del conducte pancreàtic) també és possible en rosegadors (Bonner-Weir, Li et al. 2010).

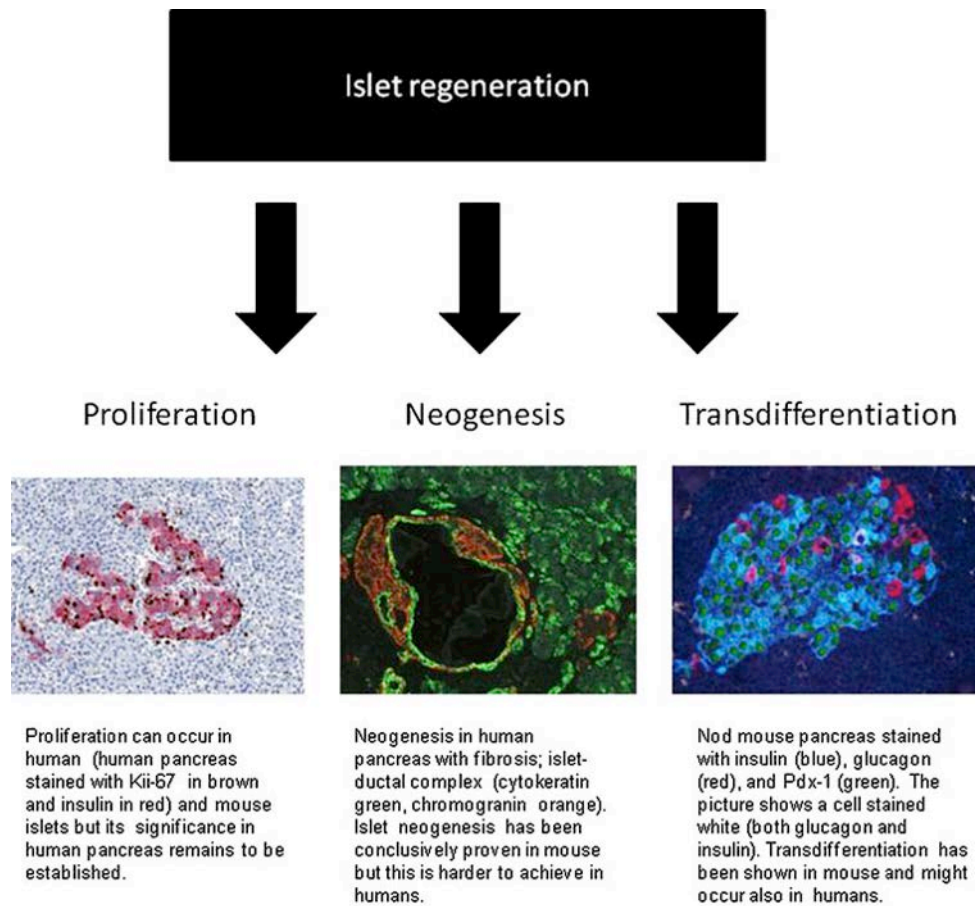


Figura 1-15: Resum dels 3 principals mecanismes involucrats en la regeneració dels illots pancreàtics (Gianani 2011).

1.5 Teràpies actuals de la T1D

1.5.1 Teràpia amb insulina exògena

Actualment la teràpia amb insulina és el *sine qua non* del tractament de la diabetis de tipus 1. No obstant això, continua tenint els seus desavantatges:

- Distribució imprecisa de la insulina subcutàniament (Brink 2004).
- Efectes del com, quan i en quines quantitats són ingerits els menjars; efecte de l'activitat física i de l'estrès quotidià (Brink 2004).
- Mètode dolorós, cosa que el fa dissuasiu per a molts pacients (Zambanini, Newson et al. 1999).

- Manifestació d'anormalitats en el metabolisme, mesurades com a nivells per sobre dels normals d'hemoglobina glicosilada.
- Complicacions relacionades amb la T1D, com ara malalties vasculars, retinopatia i neuropatia.
- Existència de pacients amb baix control de la glucèmia.

1.5.2 Trasplantament de pàncrees

La diabetis afecta la funció del sistema renal, i molts pacients tindran una història de diàlisi, la qual cosa requereix un trasplantament de ronyó. El trasplantament de pàncrees simultàniament amb el trasplantament de ronyó, ha donat millores significatives en els pacients (Jahansouz, Kumer et al. 2011).

Avantatges del trasplantament de pàncrees:

- El trasplantament de pàncrees és un procediment ben establert (Gruessner and Sutherland 2001).
- Un sol pàncrees normalment és suficient per induir insulino independència (Jahansouz, Kumer et al. 2011).
- El pacient és normoglicèmic i els seus nivells d'hemoglobina glicosilada són normals (Morel, Goetz et al. 1991, Robertson, Sutherland et al. 1999).

Desavantatges del trasplantament de pàncrees:

- Mortalitat de l'empelt més alta (Gruessner 2011).
- Requeriment d'immunosupressió.

1.5.3 Trasplantament d'illots pancreàtics

El problema més gran en el trasplantament d'illots és l'aïllament viable i funcional dels illots quan són alliberats del teixit acinar que els envolta, ja que només comprenen l'1 o 2% del total de la massa del pàncrees. A més a més, la massa òptima d'illots sovint sobrepassa el nombre d'illots obtinguts d'una sola glàndula pancreàtica. S'han estudiat unes quantes localitzacions per a la implantació dels illots trasplantats, però la tècnica més utilitzada és la punció percutània i infusió

a la vena portal del fetge. Tot i així, encara no s'ha pogut aconseguir la duració i la freqüència d'èxit que es té amb el trasplantament de pàncrees sencer (Pileggi, Alejandro et al. 2004).

Els avantatges d'aquest tractament comparat amb les injeccions d'insulina són (Paty, Ryan et al. 2004):

- Control de la glucosa en sang quasi normal, mitjançant la secreció fisiològica d'insulina.
- Prevenció de les complicacions agudes i cròniques de la diabetis.
- Deslliurament de les injeccions d'insulina i testos de glucosa capil·lar.

Els avantatges del trasplantament d'illots comparat amb el trasplantament del pàncrees són:

- Procés molt menys invasiu, per tant, més segur i menys costós (Robertson, Davis et al. 2000).
- Els illots aïllats tenen un poder antigènic més baix que els òrgans sencers, la qual cosa afavoreix la supervivència del trasplantament, i poden ser manipulats *in vitro* molt més fàcilment (Ranuncoli, Cautero et al. 2000).
- Els principals donants són illots cadavèrics, però existeixen recursos alternatius, com ara cèl·lules mare o cèl·lules beta clonades, que poden arribar a ser una font no limitada (Lumelsky, Blondel et al. 2001, Wakayama, Tabar et al. 2001, Bonner-Weir and Sharma 2002).

Tot i els avantatges esmentats, es continua depenent de l'obtenció d'un donant adequat i d'una immunosupressió crònica, tant en el trasplantament d'illots com en el de pàncrees (Paty, Ryan et al. 2004).

1.6 Cicle cel·lular

El conjunt d'esdeveniments que són responsables de la duplicació de la cèl·lula s'anomena cicle cel·lular (Figura 1-16). Existeixen 2 processos importants en el cicle de les cèl·lules eucariotes: la fase S (replicació dels cromosomes) i la fase M (segregació del material replicat en 2 nuclis fills). Aquests 2 esdeveniments s'ordenen en un procés cíclic que permet duplicar i dividir correctament els components cel·lulars. Abans de la fase S hi ha l'espai G1 (fase de creixement cel·lular) i abans de la fase M hi ha l'espai G2 (preparació de la mitosi) (Nurse 1994).

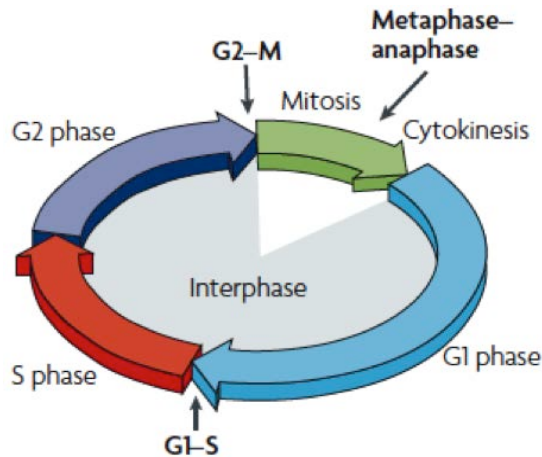


Figura 1-16: Les cèl·lules passen per 3 grans fases durant el cicle cel·lular. El començament de la fase S ve marcat per la replicació del DNA; la fase M comença amb el trencament de l'embolcall nuclear i la condensació dels cromosomes, mentre que la segregació de les cromàtides germanes marca la transició de la metafase a l'anafase (Hohegger, Takeda et al. 2008).

1.6.1 Ciclines i cinases dependents de ciclines (CDK)

L'activació i inactivació seqüencial de les cinases dependents de ciclines (CDK) permet la progressió de les cèl·lules eucariotes a través de les fases del cicle cel·lular mitjançant la fosforilació de substrats específics d'aquestes cinases. Les CDK són una família de proteïnes cinases serines/treonines molt presents al món eucariota que, a més a més d'organitzar la progressió a través del cicle cel·lular, reben i integren els senyals reguladors del creixement. En fase G1, les cèl·lules eucariotes expressen un quantitat relativament baixa d'activitat CDK que augmenta progressivament a mesura que les cèl·lules avancen a través del cicle cel·lular, fins que arriba a un pic màxim i després decau ràpidament durant la mitosi (Figura 1-17). Les CDK s'uneixen a subunitats reguladores, anomenades ciclines, per tal d'incrementar la seva activitat cinasa. Les proteïnes ciclines són més variables entre espècies, que les CDK (Hunter and Pines 1994, Lees 1995, Morgan 1995, Nigg 1995, Morgan 1997). La unió de les ciclines causa un canvi estructural, que condueix a la seva activació. La seva activitat es veu altament incrementada després de la fosforilació d'un residu de treonina en el domini VIII de tots els membres de la família CDK. Aquest residu és fosforilat mitjançant una cinasa activadora de CDK (CAK) (Solomon, Lee et al. 1992, Clarke 1995). S'ha vist que diferents ciclines poden unir-se a la

mateixa CDK. L'especificitat d'aquesta unió ve determinada per una regió de 16 aminoàcids, anomenada PSTAIRE, en les CDK. L'abundància de les ciclines oscil·la durant el cicle cel·lular, com a resultat d'una síntesi i degradació programada, i limita d'aquesta manera el rang d'activació de les CDK. La degradació de les ciclines es duu a terme mitjançant el sistema ubiquitina–proteasoma (Ohtsubo and Roberts 1993, Quelle, Ashmun et al. 1993, Resnitzky, Gossen et al. 1994, Tyers and Jorgensen 2000).

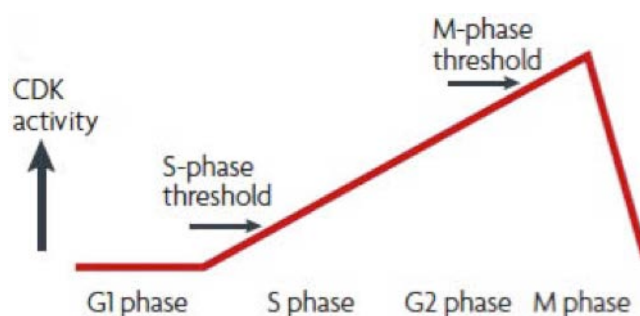


Figura 1-17: Model de llindar mínim per al control del cicle cel·lular (Hochegger, Takeda et al. 2008).

El "punt de restricció" és el control primari del cicle cel·lular, passat el qual les cèl·lules estan destinades a una nova ronda de divisió cel·lular. El punt de restricció està sota control dels complexos de ciclines de tipus E i D (Sherr 1993). Les ciclines de tipus D formen complexos amb CDK4 i CDK6 i estan regulades per senyals extracel·lulars, com ara factors de creixement, factors antimitògens, inhibició per contacte, etc. En canvi, la ciclina E, la ciclina A i la B són regulades periòdicament durant tot el cicle cel·lular. La proteïna del retinoblastoma (pRB) és una proteïna supressora de tumors fosforilada pels complexos ciclina D/CDK al punt de restricció, i la seva fosforilació en causa la inactivació. Aquesta inactivació provoca l'alliberament de les proteïnes E2F, proteïnes reguladores dels factors de transcripció del cicle cel·lular, que permeten la transcripció de gens que promouen l'entrada en fase S. El complex ciclina E/CDK2 contribueix a la fosforilació de la pRB al final de la fase G1 i es creu que participa en la replicació del DNA (Pardee 1974, Ewen, Sluss et al. 1993, Kato, Matsushime et al. 1993, Sherr and Roberts 1995, Dyson 1998).

Després de passar el punt de restricció, es fosforilen i activen les proteïnes necessàries per a la replicació del DNA gràcies als complexos ciclina/CDK de la fase S (Figura 1-18). Les ciclines E i

A activen seqüencialment la CDK2, considerada la proteïna clau en la iniciació de la replicació del DNA, per tal de conduir les cèl·lules a la fase S (Girard, Strausfeld et al. 1991, Dulic, Lees et al. 1992, Koff, Giordano et al. 1992, Pagano, Pepperkok et al. 1992, Zindy, Lamas et al. 1992).

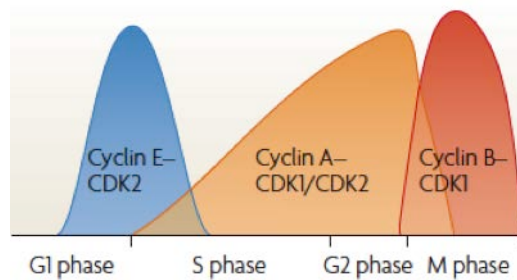


Figura 1-18: Segons el model clàssic del control del cicle cel·lular, les ciclines de tipus D i la CDK4 o CDK6 regulen els esdeveniments de l'inici de la fase G1 (no es mostra en la gràfica); la ciclina E-CDK2 dona lloc a la fase S; la ciclina A-CDK2 i la ciclina A-CDK1 regulen la finalització de la fase S, i la CDK1-ciclina B és la responsable de la mitosi (Hochegger, Takeda et al. 2008).

Una cascada de proteïnes cinases i fosfatases regula la iniciació de la fase M, on la CDK1 forma complexos amb diferents ciclines mitòtiques (A i B). El complex ciclina B/CDK1 cinasa augmenta al límit G2/M. L'activació d'aquesta cinasa és necessària però no suficient per a la finalització de la mitosi, ja que la destrucció d'aquests complexos mitòtics és imprescindible per sortir de la mitosi. El pas d'un estadi del cicle cel·lular al següent estadi està extremadament controlat mitjançant la transcripció dels gens de les ciclines, la degradació d'aquestes i la fosforilació de les subunitats de les cinases (Nurse 1994).

1.6.2 Inhibidors del cicle cel·lular

Existeixen 2 famílies de proteïnes inhibidores del cicle cel·lular que són capaces d'inactivar les cinases i el seu procés d'activació. Els membres de les famílies Cip/Kip s'uneixen i inhibeixen el complex actiu ciclina-CDK, mentre que els membres de la família INK4 utilitzen una estratègia indirecta, de manera que s'uneixen a la CDK aïllada i n'eviten l'associació amb la ciclina i, per tant, l'activació. No obstant això, aquestes últimes també es poden unir i inhibir el complex ciclina-CDK sense dissociar-ne la ciclina, la qual cosa suggereix múltiples mecanismes d'acció.

Els inhibidors INK4 són específics de la fase G1; en canvi, els inhibidors Cip/Kip tenen un espectre més ampli d'acció (Figura 1-19) (Sherr and Roberts 1995, Serrano 1997, Pavletich 1999).

Els membres de la família Cip/Kip són la p21^{WAF1/CIP1}, la p27^{Cip2} i la p57^{KIP2}. S'han identificat 4 membres de la família INK4: p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} i p19^{INK4d} (Sherr and Roberts 1999, Vidal and Koff 2000).

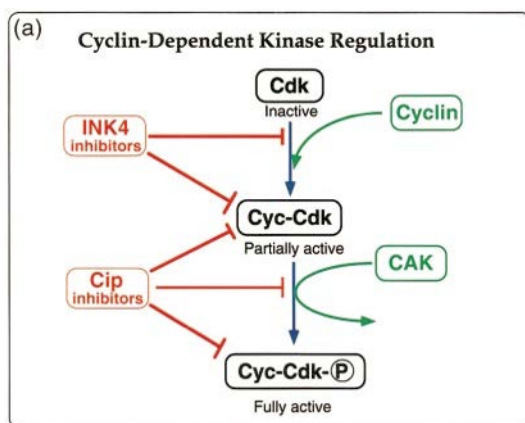


Figura 1-19: Esquema dels mecanismes principals reguladors de les CDK. CAK és una cinasa activadora de CDK, i la P indica un grup fosfat (Pavletich 1999).

1.6.3 Proteïnes i gens de la CDK11

Les diferents isoformes de la família de les proteïnes cinases CDK11/PITSLRE estan codificades per 2 gens diferents, Cdc2L1 i Cdc2L2, situats al cromosoma 1p36.3 en humans. Els 2 gens Cdc2L són actius i expressen proteïnes i mRNA gairebé idèntics de manera ubíqua en tots els òrgans humans testats. Es generen més de 20 mRNA i proteïnes de la CDK11 diferents en cèl·lules humanes, gràcies a la combinació de 2 promotors diferents per a la transcripció i de l'*splicing* alternatiu en l'extrem 5'. L'*splicing* alternatiu només inclou exons que codifiquen per al domini aminoterminal, però no per al domini catalític de la proteïna cinasa, la qual cosa dona com a resultat l'expressió d'un grup d'RNA d'una mida molt similar (Xiang, Lahti et al. 1994, Gururajan, Lahti et al. 1998, Trembley, Loyer et al. 2004).

Aquests mRNA codifiquen per a 2 grups de proteïnes, CDK11^{p110} i CDK11^{p58} (Figura 1-20). La isoforma gran, CDK11^{p110}, s'expressa de manera ubiqua en totes les línies cel·lulars i constantment durant tot el cicle cel·lular. En canvi, la isoforma petita, CDK11^{p58}, es genera a causa de l'ús d'un lloc intern d'entrada al ribosoma (IRES), localitzat a la seqüència codificant de l'mRNA de la CDK11^{p110}, específicament durant la fase G2/M. Entre els 2 gens *Cdc2L*, s'expressen múltiples variants de la CDK11^{p110}, ja que tant l'*splicing* alternatiu com la transcripció iniciada des de 2 promotors diferents afecten només l'extrem 5' dels mRNA, mentre que només es generen 2 variants de la CDK11^{p58} (Xiang, Lahti et al. 1994, Gururajan, Lahti et al. 1998, Cornelis, Bruynooghe et al. 2000).

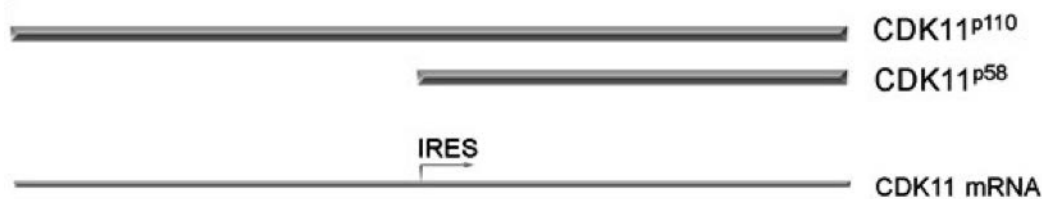


Figura 1-20: Representació esquemàtica dels productes gènics resultants de la traducció de l'mRNA de la CDK11.

Durant l'apoptosi induïda per Fas, el factor de necrosi tumoral o l'estaurosporina, es generen una tercera i una quarta isoforma mitjançant el trencament per caspases de les 2 CDK11^{p110} i CDK11^{p58}. Un fragment té 46–50 kDa i produeix la CDK11^{p46}. Aquest trencament es produeix més avall de la primera metionina de la CDK11^{p58}, s'eliminen 52 aminoàcids de la part N-terminal i deixa intacte el domini catalític, que resta actiu durant l'apoptosi. El segon fragment té 60 kDa de mida i conté el domini regulador de la CDK11 (Lahti, Xiang et al. 1995, Beyaert, Kidd et al. 1997, Feng, Ariza et al. 2005).

1.6.4 CDK11^{p46}

L'expressió de la CDK11^{p46} està associada amb l'activació de caspases i el trencament de la CDK11^{p110} durant l'apoptosi. La CDK11^{p46} participa en el procés apoptòtic fosforilant proteïnes implicades en la senyalització apoptòtica i la síntesi proteica. El factor d'iniciació eucariòtic 3 (eIF3) és el factor d'iniciació de la traducció més gran, que s'uneix als ribosomes 40S i promou la unió del metionil-tRNA i de l'mRNA. La CDK11^{p46} fosforila l'eIF3f (subunitat F del factor d'iniciació eucariòtic), de manera que inhibeix la traducció i indueix l'apoptosi. També s'ha demostrat

l'associació del fragment CDK11^{p46} amb 2 proteïnes més, la cinasa activada p21 (PAK) i la proteïna de xoc tèrmic (Hsp90) durant l'apoptosi. Totes aquestes evidències relacionen l'activitat de la CDK11^{p46} amb l'apoptosi (Chen, Yin et al. 2003, Mikolajczyk and Nelson 2004, Shi, Hershey et al. 2009).

1.6.5 CDK11^{p60}

Durant l'apoptosi, la CDK11^{p60} es redistribueix del nucli al mitocondri. L'expressió ectòpica de la CDK11^{p60} pot trencar parcialment el potencial de membrana mitocondrial, induir l'alliberament del citocrom c i la consegüent mort cel·lular (Feng, Ariza et al. 2005).

1.6.6 CDK11^{p58}

La CDK11^{p58} és una isoforma de la CDK11 implicada en la regulació de la mitosi. És necessària per a la duplicació dels centríols, la maduració del centrosoma, el muntatge bipolar del fus mitòtic, el manteniment de la cohesió de les cromàtides germanes i la citocinesi (Petretti, Savoian et al. 2006, Hu, Valentine et al. 2007, Wilker, van Vugt et al. 2007, Franck, Montembault et al. 2011). S'ha demostrat que una mínima sobreexpressió de la CDK11^{p58} en cèl·lules d'ovari d'hàmsster xinès (CHO) dona com a resultats aneuploidies, nombres augmentats de cèl·lules que mantenen unions postmitòtiques i apoptosi (Bunnell, Heath et al. 1990, Lahti, Xiang et al. 1995). Una disminució severa de CDK11^{p58} mitjançant siRNA condueix a un alineament defectiu dels cromosomes en el fus mitòtic, separació prematura de les cromàtides germanes, parada mitòtica permanent en la fase G2/M i mort cel·lular. Per tant, es pot concloure que la CDK11^{p58} és necessària per a la cohesió cromosòmica i la compleció de la mitosi (Hu, Valentine et al. 2007). El paper de la CDK11^{p58} en el procés de duplicació dels centríols és el reclutament dels reguladors implicats en aquest procés, especialment les cinases Plk1 (serina/treonina proteïna cinasa 1) i Plk4 (serina/treonina proteïna cinasa 4) (Franck, Montembault et al. 2011). A més a més, la CDK11^{p58}, gràcies a la seva activitat cinasa, disminueix els nivells de Bcl-2 (cèl·lula B limfoma 2), proteïna antiapoptòtica, la qual cosa dona com a resultat un augment de l'apoptosi en cèl·lules d'hepatocarcinoma (Yun, Wu et al. 2007). Per altra banda, la ciclina D3, ciclina de la fase G1, interacciona i regula la CDK11^{p58}, CDK de la fase G2/M, en el nucli cel·lular. Aquesta interacció només s'observa en la fase G2/M del cicle cel·lular i incrementa significativament l'activitat cinasa de la CDK11^{p58} (Zhang, Cai et al. 2002).

1.6.7 CDK11^{p110}

La CDK11^{p110} és la isoforma de la CDK11 més estudiada, i les dades recollides demostren la seva funció en la transcripció i l'*splicing* del pre-mRNA. Es localitza en els compartiments dels factors de *splicing* i en el nucleoplasma. S'han identificat diferents proteïnes associades amb la CDK11^{p110}, com ara els factors de *splicing* RNPS1 (proteïna d'unió a l'RNA amb un domini ric en serina 1) i 9G8, i el factor d'elongació transcripcional ELL2 (Loyer, Trembley et al. 1998, Trembley, Hu et al. 2002, Hu, Mayeda et al. 2003). La CDK11^{p110} està associada amb la subunitat gran de l'RNAP II (RNA polimerasa 2) i amb els factors d'elongació transcripcional TFIIF (factor de transcripció 2F), TFIIS (factor de transcripció 2S) i FACT (facilita la transcripció de la cromatina). Els factors d'elongació transcripcionals es poden agrupar en 3 classes. La primera classe inclou els factors que prevenen l'aturada de l'RNAP II (TFIIS). La segona classe inclou els factors que prevenen una pausa transitòria de l'RNAP II (ELL, ELL2 i TFIIF). La tercera classe inclou els factors que promouen l'elongació transcripcional mitjançant la modificació de l'estructura de la cromatina (FACT). És interessant remarcar que la proteïna cinasa CDK11^{p110} s'associa amb factors d'elongació transcripcional de les 3 classes. També hi ha una interacció directa entre la caseïna cinasa 2 (CK2) i la CDK11^{p110}. La CK2, i no la CDK11^{p110}, és la cinasa responsable de la fosforilació de l'RNAP II, a més a més, de la fosforilació de la CDK11^{p110}. S'ha demostrat que la CHK2 (cinasa del punt de control 2) s'uneix i fosforila la CDK11^{p110} de manera independent al dany en el DNA, i aquesta fosforilació promou l'*splicing* del pre-mRNA. La CHK2 és una proteïna implicada en la reparació del DNA, l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi, quan hi ha un dany en el DNA (Choi, Choi et al. 2014). A més a més, les ciclines L1 α i L2 α coimmunoprecipiten amb la CDK11^{p110}. La ciclina L1 és una proteïna nuclear associada amb la forma hiperfosforilada de l'RNAP II i factors de *splicing*. També s'ha demostrat que la CDK11^{p110}, la ciclina L1 α i el factor de *splicing* 9G8 formen un complex ternari en què la CDK11^{p110} fosforila a 9G8 (Hu, Mayeda et al. 2003, Yang, Li et al. 2004). Aquestes dades donen suport al paper de la CDK11^{p110} en la regulació de l'expressió gènica en l'àmbit transcripcional i de *splicing* (Trembley, Hu et al. 2002, Sachs and Vaillancourt 2003, Trembley, Hu et al. 2003). Per altra banda, la CDK11^{p110} és responsable de l'estabilització dels microtúbuls mitjançant la producció de Ran-guanosina trifosfat (RanGTP) als cromosomes, i aquesta estabilització local és essencial per a les proporcions normals de muntatge i funcionament del fus mitòtic en *Xenopus laevis*. La RanGTP controla la nucleació i l'estabilització de l'extrem positiu dels microtúbuls (Yokoyama, Gruss et al. 2008).

Les proteïnes cinases CDK11^{p110/p58} són essencials per a la supervivència de la cèl·lula i per al seu desenvolupament. La disrupció del locus *cdc2l*, amb la consegüent pèrdua de les cinases CDK11^{p110/p58}, dona lloc a mort embrionària en etapes inicials. Les cèl·lules de blastocist E3.5 CDK11^{p110/p58} nul·les no són viables i moren a causa de l'apoptosi induïda per una fallada en la proliferació i aturada mitòtica (Li, Inoue et al. 2004).

2 HIPÒTESI

El cicle cel·lular és un procés altament regulat que dona lloc a la replicació del DNA i finalment a la divisió cel·lular o citocinesi. Les 2 famílies de proteïnes més importants implicades en aquest procés són les ciclines i les cinases dependents de ciclines. Les ciclines actuen com a molècules reguladores de l'activitat i/o de la localització nuclear de les cinases. Aquestes cinases estan regulades mitjançant diferents mecanismes, com ara inhibició per fosforilació, associació amb altres molècules reguladores (ciclines, proteïnes inhibidores) i localització subcel·lular.

La CDK11 és una cinasa dependent de ciclina que codifica per a 2 grups de proteïnes, CDK11^{p110} i CDK11^{p58}. La isoforma gran, CDK11^{p110}, s'expressa de manera ubíqua i constant durant tot el cicle cel·lular, i està majoritàriament implicada en la transcripció i maduració, o *splicing* del pre-mRNA. D'altra banda, la CDK11^{p58} és específica de la mitosi i es genera per l'entrada ribosomal en un punt intern alternatiu del missatger (IRES, o *internal ribosoma entry sequence*) durant la fase G2/M, i està implicada en la regulació de la mitosi. No obstant això, durant l'apoptosi es generen més isoformes (CDK11^{p60} i CDK11^{p46}) per trencament de les 2, CDK11^{p110} i CDK11^{p58}, per caspases. Aquestes isoformes (CDK11^{p60} i CDK11^{p46}) que es produeixen durant l'apoptosi estan altament implicades en la seva amplificació i promoció.

El nostre grup va trobar que els nivells d'expressió de l'mRNA de la CDK11 estaven disminuïts en les cèl·lules endocrines d'illots pancreàtics que han sofert infiltració leucocítica en el model NOD durant la progressió de l'atac autoimmunitari, en comparació amb els nivells presents al ratolí lliure de limfòcits del mateix fons genètic, NODSCID.

Tenint en compte el paper de la CDK11 tant en la transcripció de l'mRNA i la mitosi com en l'apoptosi, i el fet que se'n vegi disminuïda l'expressió durant la progressió de la diabetis autoimmunitari, la nostra hipòtesi de treball en aquesta tesi va ser:

- Durant la infiltració de l'illot es crea un ambient hostil que afavoreix el trencament de la CDK11 per caspases en les seves isoformes, CDK11^{p60} i CDK11^{p46}, implicades en l'apoptosi.
- La disminució de la CDK11 és un mecanisme protector davant de la infiltració i la generació de les isoformes CDK11^{p60} i CDK11^{p46}, implicades en l'apoptosi.

3 OBJECTIUS

3.1 Objectiu principal

Determinar si existeix una relació causal entre la disminució de l'expressió de la CDK11 i el debut diabètic en el model NOD de T1D.

3.2 Objectius específics

- Generar la soca NODCDK11 β KO, per tal d'estudiar l'efecte de la deleció de la CDK11 *in vivo* en l'homeòstasi de la massa de la cèl·lula beta i el desenvolupament de la T1D.
- Estudiar la massa beta cel·lular del ratolí hemideficiënt per a la CDK11 comparada amb la del ratolí NOD salvatge.
- Estudiar l'activitat proliferativa i mort per apoptosi de les cèl·lules beta dels ratolins NOD hemideficients en CDK11 en comparació amb els dels seus germans salvatges.
- Estudiar el metabolisme de la glucosa i la secreció d'insulina en els ratolins hemideficients per a la CDK11.
- Estudiar la diabetogenicitat del repertori immune dels ratolins NOD hemideficients en CDK11.
- Caracteritzar les poblacions de la infiltració limfocítica als illots pancreàtics, als ganglis regionals i a la melsa de ratolins hemideficients en CDK11.
- Determinar els nivells d'activació del repertori immune, així com la presència de poblacions T reguladores als illots pancreàtics, als ganglis regionals i a la melsa de ratolins hemideficients en CDK11.

4 MATERIALS

4.1 Materials per a les tècniques *in vivo* i *in vitro*

Taula 4-1: Taula de materials usats per a les tècniques *in vivo* i *in vitro*.

Reactiu	Casa comercial
Acrilamida/Bis 30% 29:1	Biorad Laboratories, CA, EUA
Albúmina bovina 96–99%	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Ampicil·lina	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Aprotinina	Roche, Alemanya
Blau de bromofenol (sal sòdica)	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Brilliant Blue R	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
CFSE	Life Technologies
Cloroform	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Col·lagenasa P	Roche, Alemanya
Coomassie Blue	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Concanavalina A	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Cromogen FastRed (pastilles)	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
DEPC (aigua tractada)	Thermo Scientific, Rockford, EUA
DMEM (medi)	Lonza, Verviers, Bèlgica
DMSO	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
PBS	Lonza, Verviers, Bèlgica
DPX (medi de muntatge)	CTL Scientific Supply Corp., NY, EUA
EDTA	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
ELISA de glucagó	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
ELISA d'insulina	Mercodia, Uppsala, Suècia
Enzim restricció Alul	Thermo Scientific, Rockford, EUA
Eosina	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Etanol 100%	Panreac, Barcelona, Espanya
Etanol 96%	Panreac, Barcelona, Espanya
FBS	Lonza, Verviers, Bèlgica
Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent	eBioscience
Fura-2 AM	Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA
GAD65 p35	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Geneticina G418	PAA, Pasching, Àustria
Gentamicina 1,21 mM	BioSera, Boussens, França
Glicerol	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Glicina	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA

Glutamina 100 X	BioSera, Bousens, França
HBSS	Lonza, Verviers, Bèlgica
Hematoxilina de Harris	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
HEPES	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
IL-1 β	Prospec, Passaic County, NJ, EUA
Inhibidor de proteases (pastilla còctel)	Santa Cruz Biotechnology, inc.
Insulina	Dako, Glostrup, Dinamarca
Insulina recombinant humana	Actrapid, Novo Nordisk, Dinamarca
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Hercules, CA, EUA
Isoflurà	Abbot Laboratories, Madrid, Espanya
Isopropanol	Panreac, Barcelona, Espanya
Kit de detecció d'Annexin-V	BD Biosciences
Kit de síntesi de cDNA iScript	Bio-Rad
KLH	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Llet descremada	Central Lechera Asturiana
Marcador de DNA λ	Thermo Scientific, Rockford, EUA
Marcador de pes molecular DNA 100 bp	Thermo Scientific, Rockford, EUA
Marcador de pes molecular DNA 1 kb	Thermo Scientific, Rockford, EUA
Medi-Test Glucose 3	Macherey-Nagel, Düren, Alemanya
Membrana de PVDF	Millipore, Bedford, MA, EUA
Menjar rosegadors – dieta de cria Rata/Ratolí 2018 S Autoclavable	Harlan Ibérica
Metafectene® Pro	Biontex, San Diego, EUA
Metanol	Panreac, Barcelona, Espanya
Mowiol	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Nunc Immuno Plate (442404)	Thermo Scientific
OligodT	Invitrogen
OPD (pastilles Sigma FAST OPD)	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
PageRuler™	Fermentas
Paraformaldehid	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Pel·lícules de raig X	G.E. healthcare, Buckinghamshire, Regne Unit
Penicil·lina-estreptomina 100 X	BioSera, Bousens, França
Pentobarbital sòdic	Vétoquinol, Espanya
Permeabilization Buffer 10 X	eBioscience
Persulfat d'amoni	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Pierce™ ECL substrat de Western blot	Thermo Scientific, Rockford, EUA
Poli-L-lisina	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Portaobjectes adherents	Klinipath Good(s) in pathology, Països Baixos
Proteinasa K	Invitrogen

rhINS	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
RPMI	Lonza, Verviers, Bèlgica
Salí fisiològic	Baxter, Espanya
SDS	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Seprin	UCB Pharma
Superscript III transcriptasa inversa	Invitrogen
SuperSignal™ West Femto substrat de màxima sensibilitat	Thermo Scientific, Rockford, EUA
Tampó RIPA (sc-24948)	Santa Cruz Biotechnology, inc.
Tampó Tris en pastilles	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
TBE 10 X	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
TEMED	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Tires de detecció Glucocard G	A. Menarini Diagnostics
Tripsina/EDTA	Lonza, Verviers, Bèlgica / GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, EUA
Tris	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemanya / Sigma Aldrich, St Louis, EUA
Tritó X-100	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Trizma Base	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
TRizol	Invitrogen
TUNEL Assay Kit	Roche
Tween-20	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
β-mercaptoetanol	Invitrogen / Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
2-propanol	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA

4.2 Anticossos

Taula 4-2: Taula d'anticossos.

Anticòs	Clon/Referència	Dilució	Casa comercial
Annexin-V conjugada amb FITC	1-65874X	5 µL en 195 µL	BD Biosciences
Anti-conillet d'Índies biotinitat – Super Sensitive Multilink	HK3400706	1 gota	Biogenex, Califòrnia, EUA
Anti-conillet d'Índies-IgG-Cy3	706-165-148	1:500	Jackson ImmunoResearch laboratories, West Grove, PA, EUA
Anti-conillet d'Índies-IgG-Cy2	706-225-148	1:100	Jackson ImmunoResearch laboratories, West Grove, PA, EUA
Anti-conillet d'Índies d'insulina	A0564	1:1.000	Dako, Califòrnia, EUA

poli-clonal			
Anti-conill IgG TrueBlot®	18-8816	1:10.000	eBioscience
Anti-humà Ki67 de ratolí V450	B56	1:20	BD Biosciences
Anti-rata Ki67 de ratolí monoclonal	TEC-3	1:50	Dako, Califòrnia, EUA
Anti-ratolí alfa-actina	1A4	1:5.000	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Anti-ratolí beta-actina	AC-74	1:2.000	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Anti-ratolí CCR7	4B12	1:100	eBioscience
Anti-ratolí CD11c	HL3	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD16/CD32 en rata (Fc Block de ratolí) [™]	93	1:100	eBioscience
Anti-ratolí CD19	1D3	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD25	PC61	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD3	145-2C11	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD3	2C11	1 µg/mL	BD Biosciences
Anti-ratolí CD4	RM4-5	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD45	HI30	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD62L	MEL-14	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD69	H1.2F3	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD8	53-6.7	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD80	16-10A1	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD86	GL1	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí-IgG-CF [™] 405S	SCJ4600013	1:200	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Anti-ratolí-IgG-Cy2	715-225-150	1:100	Jackson Immunoresearch laboratories, West Grove, PA, EUA
Anti-ratolí-IgG-Cy3	715-165-150	1:100	Jackson Immunoresearch laboratories, West Grove, PA, EUA
Anti-ratolí FoxP3	FJK-16S	1:100	eBioscience
Anti-ratolí glucagó	K79bB10	1:2.000	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Anti-ratolí GLUT-2 biotinilat	205115	1:50	R&D Systems
Anti-ratolí GLUT-4	ab654	1:2.500	Abcam
Anti-ratolí IgG TrueBlot®	88-7788	1:10.000	eBioscience
Anti-ratolí MAC-3	M3/84	1:100	BD Biosciences
Anti-rmIFN γ (anticòs de captura)	554431	2 mg/mL	BD Biosciences

Anti-rmIL-2 (anticòs de captura)	JES6-1A12	10 mg/mL	BD Biosciences
Anti-rmIFN γ biotinitat (anticòs de detecció)	XMG1.2	5 mg/mL	BD Biosciences
Anti-rmIL-2 biotinitat (anticòs de detecció)	JES6-5H4	5 mg/mL	BD Biosciences
BioMag [®] Goat Anti-Rat IgG	310107	500 μ L per mostra	Qiagen
Estreptavidina-APC	31274246	1:300	Immunotools, Friesoythe, Alemanya
Estreptavidina-PE	554061	1:500	BD Biosciences
Estreptavidina-avidina unit a alcalina fosfatasa – SS Label	HK3310906	1 gota	Biogenex, Califòrnia, EUA
Estreptavidina-HRP	552576	1:1.000	BD Biosciences
Hoechst 33342 1 mg/mL	B 2261	1:200	Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA
Iodur de propidi	51-66211E	10 μ L en 190 μ L (20 μ g/mL)	BD Biosciences

4.3 Aparells i programari

Taula 4-3: Taula d'aparells i programari.

Aparell/Programari	Casa comercial
Càmera Hamamatsu digital C9100	Hamamatsu Photonics, Barcelona, Espanya
Espectrofotòmetre Nanodrop (ND-1000)	Thermo Scientific, Rockford, EUA
FACSCanto II	BD Biosciences
Filtres de pas de banda de 10 nm per 340 nm i 380 nm	Omega Optics, Madrid, Espanya
Glucòmetre Glucocard G Sensor	Arkray Inc., Shiga, Japó
Màquina reveladora	Optimax X-Ray Film Processor, Alemanya
Microscopi d'epifluorescència	Zeiss, Axiovert 200M
Microscopi òptic Leica DM R	Leica Microsystems
Roda amb filtre dual	Sutter Instrument CO, CA, EUA
Programari Aquacosmos	Hamamatsu Photonics, Barcelona, Espanya
Programari ImageJ	NIH, Bethesda, MD, EUA
Programari SigmaPlot	SigmaPlot, Jandel Scientific

4.4 Oligonucleòtids per a la PCR

Taula 4-4: Taula de primers.

Primer	Seqüència 5' - 3'	Ús
CDK11cloF	GATTAACAAGATTTTCAAGGACCTGGGTACTCCTAG	PCR
CDK11cloR	GCCACGTCCATCAAGCCGACCGCGGCCGCTCGAGTCAGAACT TGA	PCR
CDK11F2	CCTGCTGAGCCATGCTGGC	PCR
CPfr	CTCAGACAACGCCTGCCTGAGC	PCR
CPrev	CAA GAG AAG CCT GAG CAA ATAG	PCR
Cre1	GGCCCCATGGCATCCAATTTACTGACCGTACAC	PCR
Cre2	TCGCTCGAGGTGATCGCCATCTTCCAGCAG	PCR
Ealb1	CGGCGTTCTACAACATTGCG	PCR
E α	GCG GAA GAG GTG ATC GTC CCT C	PCR
GlucgFw	ACACCAAGAGGAACCGGAAC	qPCR
GlucgRv	ACTGGCACGAGATGTTGTGAA	qPCR
HPRT1	GTTGGATACAGGCCAGAvCTTTGTTG	PCR
HPRT2	GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT	PCR
mCDK11BFwRT	TCTGCACATCACCGTACCAT	qPCR
mCDK11BRvRT	CTGGTTTTCTCTCGCTGTC	qPCR
Mp70	GAG ATA CTC TTT ACA TGC CAA CC	PCR
oIMR803	GGA AAA GAA TTG GTA TCC AC	PCR
oIMR804	AGTTAT AAC AGC TGG GTT GGC	PCR
β -actinFw	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA	qPCR
β -actinRev	TAAAACGCAGCTCAGTAAGAGTCC	qPCR

5 MÈTODES

5.1 Estudis *in vitro*

Tots els experiments de cultius en van dur a terme incubant les cèl·lules en una atmosfera humida (5% CO₂, 95% humitat relativa i 37 °C).

5.1.1 Sobreexpressió de la CDK11 a la línia NIT-1 d'insulinoma murí NOD

La línia cel·lular d'insulinoma NIT-1 (ATCC® CRL-2055™) va ser proporcionada pel Dr. J. Verdaguer. El medi de cultiu usat per mantenir la línia cel·lular era DMEM amb glucosa 22,7 mM i L-glutamina 2 mM, suplementat amb FBS 10%, penicil·lina-estreptomicina 1% i β-mercaptoetanol 5 μM.

5.1.2 Subclonatge de la CDK11^{p58} i la CDK11^{p130} per transfectar

Es van subclonar els cDNA de ratolí de la CDK11^{p58} i la CDK11^{p130} respectivament sota el control del promotor de la insulina de rata (RIP) en un plasmidi derivat del pBluescript SK (Stratagene) anomenat pBSK-Neo, que confereix resistència a la neomicina (Figura 5-1). Es van transfectar cèl·lules amb el vector pBSK-Neo sense cap insert de cDNA, com a control negatiu. Eα és una seqüència genòmica que prové del gen I-Eα^d (el gen I-Eα codifica per a la subunitat α del locus E de l'MHC classe II de ratolí; la subunitat E codifica per a glicoproteïnes de membrana, i l'haplotip d prové de la soca de ratolins DBA/2). Al contrari de la majoria de soques de ratolí, els ratolins NOD no expressen I-E (només I-A).

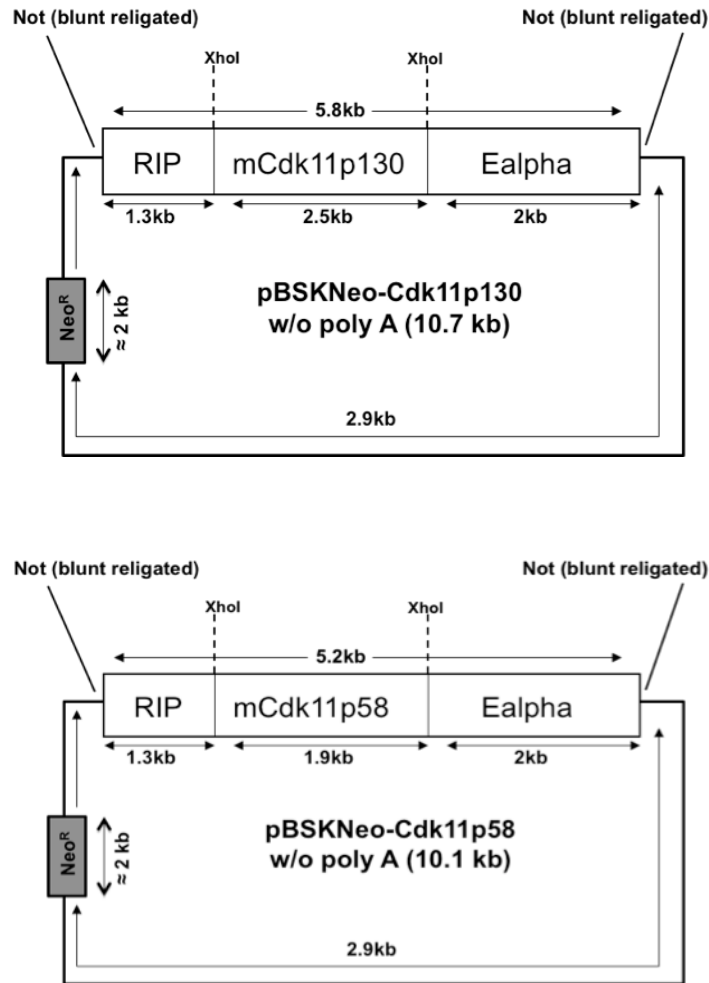


Figura 5-1: Vectors pBSK-Neo-CDK11^{p130} i pBSK-Neo-CDK11^{p58}.

5.1.3 Transfecció de la línia cel·lular NIT-1

Es van transfectar alternativament les cèl·lules NIT-1 mitjançant electroporació i Metafectene® Pro (Biontex) amb el plasmidi pBSK-Neo, que contenia els transgens CDK11^{p58} o CDK11^{p130}, respectivament, o el plasmidi buit com a control. Es van seleccionar les cèl·lules transfectades NIT-1 estables mitjançant 0,4 mg/mL de geneticina activa (G418).

5.1.4 Anàlisi de l'expressió de l'mRNA del transgèn CDK11^{p58} i CDK11^{p130}

Es va aïllar RNA de les línies cel·lulars transfectades NIT-1 utilitzant TRIzol (Invitrogen), segons les instruccions del fabricant, i es va determinar la concentració final d'RNA de les mostres mitjançant un espectrofotòmetre Nanodrop (ND-1000) llegint a 260nm. Es va retrotranscriure l'mRNA a cDNA (65 °C, 5 min; en gel, 5 min; 55 °C, 1 h, i 70 °C, 15 min) fent servir oligodT i la

Superscript III transcriptasa inversa (Invitrogen) i seguint les instruccions de la casa comercial. Es van fer servir controls negatius, que contenien els mateixos reactius menys la Superscript III, per tal de comprovar que les mostres d'RNA no estiguessin contaminades amb DNA.

El cDNA resultant de la retrotranscripció es va fer servir com a plantilla per a la subseqüent amplificació per PCR dels transgens en qüestió. Les seqüències de primers per a l'rT-PCR van ser dissenyats o bé al nostre laboratori (CDK11cloF_GATTAACAAGATTTTCAAGGACCTGGGTACTCCTAG, Ealb1_CGGCGTTCTACAACATTGCG, CDK11F2_CCTGCTGAGCCATGCTGGC) o bé van ser extrets de la literatura (HPRT1_GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG, HPRT2_GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT) (Reiner, Zheng et al. 1993). Es va utilitzar el gen constitutiu (o *house-keeping*) de la hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HPRT1/HPRT2) com a control positiu de la síntesi del cDNA.

5.1.5 Estudis d'apoptosi mitjançant Annexin-V

Per estudiar l'apoptosi induïda per citocines en la seva fase primerenca, es van posar en cultiu 100.000 cèl·lules per pou en plaques de 96 pous el dia 0. El dia 1, es va afegir IL-1 β en una concentració final de 50 U/mL. El dia 2, es van recollir les cèl·lules i es van analitzar amb tinció d'Annexin-V (cèl·lules apoptòtiques) i iodur de propidi (PI) (cèl·lules necròtiques), seguint les instruccions del kit de detecció d'Annexin-V (BD Biosciences).

De manera resumida, es van resuspendre les cèl·lules en 195 μ L de tampó d'unió 1 X, inclòs en el kit, s'hi va afegir 5 μ L d'Annexin-V-FITC i el conjunt es va incubar durant 10 min a temperatura ambient a la foscor. Es van rentar les cèl·lules en 200 μ L de tampó d'unió 1 X. Es van resuspendre en 190 μ L de tampó d'unió 1 X i s'hi va afegir 10 μ L de iodur de propidi (20 μ g/mL, concentració final). Es va detectar l'emissió de fluorescència mitjançant citometria de flux. Des del moment d'incubar amb Annexin-V fins a la lectura en el citòmetre no havia de transcórrer més d'una hora.

5.1.6 Proliferació dels limfòcits

Es van obtenir, en condicions estèrils, leucòcits de la melsa i dels ganglis limfàtics pancreàtics (PLN) de ratolins NOD HTZ i WT de 7 setmanes mitjançant disrupció física, fent servir portaobjectes esmerilats i medi de cultiu RPMI 1640 suplementat amb FBS 10%, gentamicina 1,21 mM i β -mercaptoetanol 0,2 mM. Es van lisar els eritròcits mitjançant xoc hipotònic amb 900 μ L d'aigua pura i es va tornar a la isotonicitat inicial mitjançant l'addició de 100 μ L de PBS 10 X. Seguidament s'hi van afegir 10 mL d'RPMI suplementat i es van rentar les cèl·lules amb salí fisiològic (0,9% NaCl) per eliminar-ne el FBS.

Es van resuspendre les cèl·lules en una concentració de 20×10^6 cèl·lules per mL de PBS. S'hi va afegir el mateix volum de CFSE 5 μ M i es van incubar les cèl·lules a temperatura ambient durant 8 min a la foscor. Després de la incubació, es va interrompre la tinció amb 2–3 volums d'FBS i es van deixar reposar les cèl·lules durant 5 min. Després de fer un rentat, es van resuspendre 1×10^6 leucòcits/mL de medi RPMI suplementat. Es van cultivar les cèl·lules en plaques de 12 pous (1×10^6 cèl·lules / 1 mL per pou) en presència de l'anticòs anti-CD3 1 μ g/mL o concanavalina A 0,003 μ g/mL com a estímuls policlonals. També es van utilitzar com a antigens específics la insulina recombinant humana (rhINS); el pèptid de la cadena B que comprèn dels aminoàcids 12 al 25 de la d'insulina (INSB12-25); el pèptid de la descarboxilasa de l'àcid glutàmic 65 (GAD65) anomenat GAD65p35, i l'hemocianina de *Megathura crenulata* (*Keyhole limpet* o KLH), com a antigen no propi, a una concentració de 25 g/mL. Una part de les cèl·lules es van cultivar sense estímulo per tal de tenir controls negatius de proliferació. Les plaques es van incubar en una atmosfera humida amb 5% CO₂, 37 °C, durant 72 h.

5.1.7 Producció d'IL-2 i IFN γ per cultius de leucòcits

Es van obtenir leucòcits de la melsa i dels PLN de ratolins NOD HTZ i WT de 7 setmanes. 1×10^6 cèl·lules per mL de medi RPMI suplementat es van resuspendre i es van cultivar en plaques de 12 pous (1×10^6 cèl·lules / 1 mL per pou) en presència d'anticòs anti-CD3 1 μ g/mL. Per a cada subjecte, es van cultivar una part de les cèl·lules sense estimulació. Es van incubar les plaques en una atmosfera humida amb 5% CO₂ a 37 °C durant 48 h i es va recollir el sobrenedant dels cultius cel·lulars.

Les citocines produïdes es van mesurar mitjançant la tècnica d'ELISA en Sandwich utilitzant els anticossos anti-IL2 i anti-IFN γ de ratolí de la manera descrita a continuació. Es van fer servir els anticossos de captura de ratolí antirecombinant-IL2 (10 mg/mL) i antirecombinant-IFN γ (2 mg/mL). Es va afegir 100 μ L d'anticòs diluït en solució d'unió (Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 9,0) als pous d'una placa ELISA preparada per unir proteïnes (Nunc Immuno Plate, Thermo Scientific). Es va incubar la placa tapada durant la nit a 4 °C i, després de la incubació, la solució d'anticòs es va eliminar i es va bloquejar la placa afegint-hi 200 μ L de tampó de bloqueig (FBS 10% en PBS) per pou. Es van incubar les plaques a temperatura ambient durant 1 h 30 min, i a continuació, sense eliminar-ne l'excés de líquid, s'hi van afegir 100 μ L per pou d'estàndards (200 pg/mL IL2 i 200 U/mL IFN γ ; concentracions superiors) i de mostres (diluïdes en tampó de bloqueig + Tween-20 0,05%). Es va incubar la placa a temperatura ambient durant 4 h i es va rentar 4 cops amb PBS + Tween-20 0,05%. Tot seguit, s'hi van afegir 100 μ L d'anticòs de detecció (biotinilat) 5 mg/mL diluït en tampó de bloqueig/Tween-20 0,05%, es va incubar la placa a temperatura ambient durant 1 h 30 min i es va rentar 6 cops amb PBS/Tween. Es va afegir 100 μ L d'estreptavidina-HRP (1:1000) en tampó de bloqueig/Tween, es va incubar a temperatura ambient durant 1 h i es va rentar 8 cops amb PBS/Tween. Finalment, es va fer servir el kit de pastilles Sigma FAST OPD i se'n va llegir la densitat òptica (OD) a 450 nm.

5.2 Estudis *in vivo*

5.2.1 Ratolí model usat per estudiar la diabetis de tipus 1

- Tots els procediments experimentals amb animals utilitzats durant l'estudi van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Lleida, d'acord amb les regulacions d'experimentació animal europees i dels Estats Units d'Amèrica.
- Tots els animals s'han mantingut en condicions lliures de patògens específics (SPF).
- Tots els resultats obtinguts mitjançant animals d'experimentació es van realitzar amb ratolins femelles.
- Els ratolins tenien accés a menjar autoclavat, dieta de cria Rata/Ratolí 2018 S Autoclavable (Harlan Ibèrica) i aigua *ad libitum* en caixes microaïllades amb pressió positiva d'aire HEPA, a 21 °C i 40–60% d'humitat, en cicles de 12 h de llum/foscor.

- El personal al càrrec del manteniment dels ratolins portava sempre roba de laboratori esterilitzada. Es feien totes les manipulacions dels animals en campanes de flux laminar i s'esterilitzava tot el menjar, aigua i material en contacte amb els ratolins mitjançant autoclavament (esterilització per calor).
- La colònia de ratolins NOD, model usat per estudiar la diabetis de tipus 1, deriva de la colònia del laboratori de Charles A. Janeway, Jr., secció d'immunologia, de la Facultat de Medicina de l'estabulari de la Universitat de Yale.
- Es va transferir la mutació SCID al fons NOD i es van mantenir els ratolins amb una barreja d'antibiòtic Septrin (trimetoprim 0,24 g/L i sulfametoxazole 1,2 g/L) en règim setmanal (1 setmana amb Septrin i 1 setmana sense).
- La Dra. Jill M. Lahti de l'hospital St. Jude Children's de Memphis ens va proporcionar els ratolins heterozigots (HTZ) per a la deficiència de la CDK11 en un fons genètic mixt 129SvxC57BL/6. També ens va proporcionar els ratolins WT (salvatges) amb el gen CDK11 flanquejat pels llocs loxP, en el mateix fons genètic mixt 129SvxC57BL/6.
- Vam retrocreuar aquests ratolins amb el fons genètic *non-obese diabetic* (NOD) per 15 generacions successives, genotipant i seleccionant per indicadors homozigots pels al·lels Idd de la soca NOD.
- El Dr. Ed Leiter, de The Jackson Lab Main, ens va proporcionar molt generosament els ratolins NOD RIPCre^{ins}, els quals expressen la recombinasa Cre sota el control del promotor de la insulina, la qual s'expressa específicament en cèl·lules beta pancreàtiques.

5.2.2 Generació de la soca NODCDK11 β KO

Les cèl·lules del blastocist E3.5 homozigotes per l'al·lel CDK11^{p110/p58} nul·les no són viables i moren a causa de l'apoptosi induïda per una fallada en la proliferació i aturada mitòtica (Li, Inoue et al. 2004). Per aquest motiu, es va utilitzar el sistema de la recombinasa Cre expressada sota el control del promotor de la insulina, per tal d'eliminar el gen de la CDK11 que està flanquejat per les seqüències de recombinació loxP de manera selectiva en les cèl·lules beta pancreàtiques. D'aquesta manera s'obtenia 1 KO (organisme genoanul·lat) condicional de CDK11 en les cèl·lules beta pancreàtiques.

Vam obtenir, de manera paral·lela, els ratolins loxP CDK11 i CDK11 HTZ (heterozigots) en el fons genètic NOD (NODloxPCDK11 i NODCDK11HTZ, N15). Tot seguit vam intercreuar els

ratolins NOD CDK11 HTZ amb el gen CDK11 flanquejat pels llocs loxP, amb els ratolins NOD RIPCre^{ins}. D'aquesta manera, vam aconseguir tots els genotips representats en la taula inferior en el fons genètic NOD.

Taula 5-1: Soques del ratolins NOD CDK11.

Genotip resumit	Genotip detallat	
KO CDK11	Δ /flox cre/+	KO combinat*
	Flox/flox cre/+	KO total en cèl·lules beta pancreàtiques
HTZ CDK11	Δ /+ +/+	Anomenats HTZ (KO parcial a tots els teixits)
	Δ /+ cre/+	KO parcial a tots els teixits
	+/flox cre/+	KO parcial només en cèl·lules beta pancreàtiques
	Δ /flox +/+	KO parcial a tots els teixits
WT	+/+ +/+	Anomenats WT
	+/+ cre/+	
	+/flox +/+	
	Flox/flox +/+	

Δ = gen CDK11 eliminat (o nul)

flox = gen CDK11 flanquejat pels llocs loxP

cre = recombinasa Cre expressada sota el control del promotor de la insulina

+ = gen WT

*KO combinat = KO total en cèl·lula beta + KO parcial a la resta de teixits

5.2.2.1 Anàlisi de la deleció genòmica de la CDK11 en ratolins NOD/RIPcreFloxCDK11

Es va aïllar el DNA genòmic de melsa, timus i illots pancreàtics de ratolins RIPcre⁺FloxCDK11 i RIPcre⁻FloxCDK11, per tal d'examinar la deleció de teixit específica del gen de la CDK11 controlada per la recombinasa Cre.

Taula 5-2: Primers usats per genotipar la soca NOD CDK11.

Detecció	Primers	Seqüència
Δ	CPrev	CAA GAG AAG CCT GAG CAA ATAG
	Mp70	GAG ATA CTC TTT ACA TGC CAA CC
Cre	Cre1	GGCCCCATGGCATCCAATTTACTGACCGTACAC
	Cre2	TCGCTCGAGGTGATCGCCATCTTCCAGCAG
Flox	CPfr	CTCAGACAACGCCTGCCTGAGC
	CPrev	CAA GAG AAG CCT GAG CAA ATAG

5.2.3 Generació de la soca NOD/SCID CDK11

Es van comprar els ratolins NOD/SCID a The Jackson Laboratories. Per tal de genotipar la mutació SCID, es va fer servir el protocol de PCR recomanat per The Jackson Lab (94 °C, 1 min 30 s + [94 °C, 30 s + 53 °C, 30 s + 72 °C, 30 s] 30 cicles + 72 °C, 2 min + 4 °C) (Forward-olMR803: GGA AAA GAA TTG GTA TCC AC i Reverse-olMR804: AGTTAT AAC AGC TGG GTT GGC). Es va digerir el producte resultant de la PCR mitjançant l'enzim de restricció Alul a 37 °C i es van córrer en un gel d'agarosa al 4%. La mida esperada dels productes de la PCR eren: mutant (38 bp, 28 bp i 11 bp), HTZ (68 bp, 38 bp – 28 bp i 11 bp) i WT (68 bp i 11 bp).

5.2.4 Aïllament d'illots pancreàtics

Es van sacrificar els ratolins per dislocació cervical i es van aïllar els illots mitjançant digestió amb col·lagenasa P (Roche Diagnostics). Es va injectar cada pàncrees amb 5 mL de solució de digestió (5 mg de col·lagenasa P en 7 mL de Hank's Balanced Salt Solution [HBSS]) a través del conducte biliar comú o colèdoc. Després de la injecció, se'n va extreure el pàncrees i es va incubar amb 3 mL de solució de digestió durant 7 min a 37 °C. Es van disgregar els teixits mecànicament amb una pipeta Pasteur i es va parar la digestió afegint-hi 45 mL de HBSS – BSA 0,1%. Es van mantenir els tubs en gel durant 5 min i es va descartar la capa de lípids que hi va quedar sobrenedant. S'hi va afegir HBSS – BSA 0,1% fins a 45 mL i se'n van recollir els illots manualment amb una micropipeta sota una lupa binocular, en 2 torns (22,5 mL cadascun).

5.2.5 Separació magnètica de cèl·lules pancreàtiques endocrines (fracció CD45⁻)

Es van aïllar els illots pancreàtics i es van disgregar mitjançant digestió amb tripsina. La suspensió cel·lular resultant es va incubar amb l'anticòs anti-ratolí CD45 i seguidament amb anticòs anti-rata unit a boles magnètiques. Es va descartar la fracció positiva per CD45 (infiltrat limfocític) mitjançant un imant i se'n van guardar les fraccions negatives (cèl·lules endocrines).

5.2.6 Expressió de l'mRNA de la CDK11 i del glucagó

Es van aïllar els illots de ratolins NOD/SCID de 6, 9 i 11 setmanes; NOD d'11 setmanes, i NOD/SCID CDK11 HTZ i WT de 6 setmanes. Es van tripsinitzar els illots per tal d'obtenir cèl·lules

beta aïllades. En les cèl·lules aïllades de ratolins NOD, es va procedir a la separació magnètica detallada en l'apartat anterior. Es va fer servir el reactiu TRIzol per aïllar l'RNA, segons les instruccions del fabricant, i es va determinar la concentració final d'RNA en les mostres mitjançant un espectrofotòmetre Nanodrop (ND-1000). Es va retrotranscriure l'mRNA a cDNA fent servir el kit de síntesi de cDNA iScript de Bio-Rad. Es va fer servir el producte resultant de cDNA com a plantilla per a la subseqüent amplificació per a PCR a temps real (qPCR). Es va utilitzar la β -actina com a control intern per normalitzar l'expressió genètica, i les dades obtingudes es van calcular mitjançant el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Taula 5-3: Primers usats per a la qPCR.

CDK11	mCDK11BFwRT	TCTGCACATCACCGTACCAT
	mCDK11BRvRT	CTGGTTTTTCCTCTCGCTGTC
Glucagó	GlucgFw	ACACCAAGAGGAACCGGAAC
	GlucgRv	ACTGGCACGAGATGTTGTGAA
β -actina	β -actinFw	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA
	β -actinRev	TAAAACGCAGCTCAGTAAGAGTCC

5.2.7 Monitoratge de la diabetis

Cada setmana es revisaven els animals en observació mitjançant tires reactives d'orina, Medi-Test Glucose 3, des de la setmana 12 fins a la 30, en el cas de la història natural. En el cas de les transferències adoptives, es monitoraven els animals 1 cop per setmana, fins a les 17 setmanes després de la transferència adoptiva.

Quan la glicosúria sortia positiva, es mesurava la glicèmia en sang a partir d'un tall petit a la cua del ratolí. S'utilitzaven les tires de detecció Glucocard G, i el corresponent glucòmetre Glucocard G Sensor, per mesurar la glucosa en sang. Vam considerar que nivells de glucosa en sang per sobre els 200 mg/dL eren hiperglucèmics i, per tant, es diagnosticava l'animal com a diabètic.

Per tal de determinar l'etiologia de la diabetis mellitus, es mataren els ratolins hiperglucèmics i es comprovava immunohistoquímicament la infiltració dels illots per leucòcits.

5.2.8 Anàlisi immunohistoquímica de la infiltració pancreàtica

Es van sacrificar els ratolins a les 5, 8 i 10 setmanes d'edat, i se'n van extreure el pàncrees i la melsa. Tot seguit es van submergir els teixits en paraformaldehid al 4% en PBS durant 3 h a temperatura ambient. Es van deshidratar els teixits seguint el següent procediment: 50 min etanol 70%; 2 cops, 50 min etanol 96%; 3 cops, 50 min etanol 100%, i finalment, 40 min en xilè. Es van incubar els teixits en parafina durant 3 h a 60 °C i es van formar blocs de parafina amb els teixits inclosos en parafina. Se'n va tallar seccions de 10 µm de gruix i es van col·locar en portaobjectes adherents. Es van deixar assecar les seccions de teixit durant la nit a 37-40 °C, en una placa calenta.

El procés de desparafinització per a la posterior tinció, es detalla a continuació: es van col·locar els portaobjectes 10 min en una estufa a 60 °C. Tot seguit, es van posar, 3 cops, 10 min en xilè; 2 cops, 5 min en etanol 100%; 2 cops, 5 min en etanol 95%; 2 cops, 5 min en etanol 60%, i en aigua destil·lada durant almenys 10 min.

Es van contratenyir les seccions de parafina mitjançant hematoxilina i eosina: 1 bany de 23 min amb hematoxilina de Harris, 1 rentat amb aigua destil·lada per eliminar l'excés d'hematoxilina, 10 segons amb alcohol àcid, 10 min amb aigua corrent de l'aixeta, i 1 bany d'eosina durant 1–2 min.

Tot seguit, es van tornar a deshidratar els teixits mitjançant un rentat d'etanol 70%, 1 rentat d'etanol 96%, 1 bany d'etanol 96% durant 30 segons, 2 banys d'etanol 100% durant 5 min i 3 banys de xilè durant 5 min.

Els portaobjectes es van muntar amb DPX i es van obtenir imatges de les seccions per realitzar estudis d'infiltració amb un microscopi òptic.

Per tal de puntuar la infiltració dels illots pancreàtics, es van assignar uns valors: 0 per a illots no infiltrats, 1 per a lesions periinsulítiques, 2 per a insulitis intrainsulars amb menys del 50% de l'àrea de l'illot infiltrada, i 3 per a insulitis amb més del 50% de l'àrea de l'illot infiltrada. Per tal d'estudiar la infiltració pancreàtica, es va utilitzar un mínim de 6 ratolins per grup experimental i es va examinar un mínim de 8 seccions per ratolí a 4 nivells diferents (>180 illots per ratolí). Es va aplicar la fórmula de sota per a cada ratolí individual, per tal de calcular la puntuació de la infiltració, i després es va fer la gràfica de la mitjana ± SEM per a cada genotip.

$$\frac{(0 \times n^{\circ} \text{ illots valor } 0) + (1 \times n^{\circ} \text{ illots valor } 1) + (2 \times n^{\circ} \text{ illots valor } 2) + (3 \times n^{\circ} \text{ illots valor } 3)}{n^{\circ} \text{ illots totals}}$$

5.2.9 Transferències adoptives de diabetis

Els experiments de transferències adoptives es van fer per tal d'estudiar i caracteritzar la diabetogenicitat dels limfòcits de donants dels diferents genotips possibles. Es van aïllar els leucòcits de la melsa o dels PLN i es van lisar els eritròcits. Se'n van comptar les cèl·lules i es van transferir a recipients NOD/SCID de diferents genotips en relació amb la CDK11 (10 milions de cèl·lules per recipient / 200 µL de salí fisiològic) via injecció intravenosa retroorbital.

- I. Es van fer servir femelles NOD/SCID CDK11 WT o HTZ (≥ 4 setmanes) com a recipients de les transferències adoptives de cèl·lules totals de melsa de donants NOD de 8–12 setmanes d'edat no diabètiques.
- II. Es van fer servir femelles NOD/SCID WT (≥ 4 setmanes) com a recipients de les transferències adoptives de cèl·lules totals de melsa de donants NOD CDK11 WT i HTZ de 9 setmanes d'edat no diabètiques.
- III. Es van fer servir femelles NOD/SCID WT (≥ 4 setmanes) com a recipients de les transferències adoptives de leucòcits totals de ganglis limfàtics pancreàtics de donants NOD CDK11 WT i HTZ de 9 setmanes d'edat no diabètiques.

5.2.10 Test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (IPGTT)

Es van deixar en dejú, durant 16 h, ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 6 i 10 setmanes d'edat. Tot seguit, els ratolins es van anestesià amb pentobarbital sòdic (60 mg/kg) i se'ls va injectar intraperitonealment 2 g de glucosa per kg de pes corporal. El grup control no rebia la injecció intraperitoneal de glucosa, sinó de salí fisiològic (0,9 g NaCl / 100 mL). Després de la injecció, es mesurava la glicèmia i la insulinèmia a diferents temps (0, 15, 30, 60 i 120 min). Es va determinar la glicèmia com s'ha descrit anteriorment, i la insulinèmia mitjançant el kit d'ELISA d'insulina de Mercodia.

5.2.11 Test intraperitoneal de tolerància a la insulina (IPITT)

Es van anestesiari els ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 10 setmanes d'edat (alimentats) amb pentobarbital sòdic (60 mg/kg). Tot seguit, es va injectar intraperitonealment 1 U/kg d'insulina recombinant humana per kg de pes corporal. El grup control no rebia la injecció intraperitoneal d'insulina, sinó de salí fisiològic. Després de la injecció, es va mesurar la glicèmia, com s'ha descrit anteriorment, a diferents temps (0, 15, 30, 60 i 120 min).

5.2.12 Lectura de glucagó en plasma de ratolí

Es va dur a terme un IPGTT però només s'analitzava la glicèmia i s'agafava sang a 0, 60 i 120 min. S'havia de recollir tanta sang com fos possible i mantenir els tubs en gel en tot moment. Es van centrifugar els tubs a 10.000 rpm durant 10 min a 4 °C i es va recollir el sobrenedant (plasma) en tubs d'Eppendorf que contenien 1 µL d'aprotinina per cada 50 µL de plasma recuperat (2 µg/mL, concentració final). Es determinava la concentració de glucagó mitjançant un kit d'ELISA EIA de Sigma-Aldrich.

5.2.13 Obtenció de proteïnes de membrana i anàlisi del transportador de glucosa (GLUT-4) en teixit adipós i múscul esquelètic

Es va aïllar teixit adipós blanc de ronyó i múscul de 3 ratolins femelles NOD CDK11 WT i HTZ de 10 setmanes d'edat. Se'n van homogeneïtzar els teixits mitjançant un politró en 8 mL de tampó d'homogeneïtzació (Hepes 25 mM, EDTA 4 mM, aprotinina 1 U/mL, sacarosa 250 mM; pH 7,4), mentre es mantenien els tubs en gel durant tot el procés. Els homogenats se sotmetien a una primera centrifugació (10.000 x g, 10 min, 4 °C), se'n recollia el sobrenedant i se'n descartaven els precipitats. Es transferia el sobrenedant vers un tub d'ultracentrífuga a 200.000 x g 1 h 30 min a 4 °C. Se'n descartava el sobrenedant i se'n resuspensia el precipitat (proteïnes de membranes totals) en 100–500 µL de tampó d'homogeneïtzació. La valoració de proteïnes es feia pel mètode de Bradford (1976) i, seguidament, es va realitzar un Western blot per analitzar l'expressió de GLUT-4.

Taula 5-4: Anticossos usats per a l'anàlisi del transportador GLUT-4.

Anticòs	Clon	Dilució	Empresa
Anti-ratolí GLUT-4	ab654	1:2.500	Abcam
Anti-ratolí alfa-actina	1A4	1:5.000	Sigma Aldrich
Anti-ratolí beta-actina	AC-74	1:2.000	Sigma Aldrich

5.2.14 Lisi d'illots per a Western blot

Es van aïllar illots de ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ de 5–6 setmanes d'edat i es van guardar en precipitats secs a -80°C . Es va extreure la proteïna total dels precipitats secs mitjançant el tampó RIPA, seguint el protocol detallat a continuació. Es va afegir $1\ \mu\text{L}$ de tampó fred RIPA (Sigma-Aldrich) amb inhibidors de proteases per a cada 4 illots i es van realitzar 3 cicles de congelació/descongelació en gel sec / bany a 37°C . Es van tornar a incubar en gel durant 30 min més. Tot seguit, es van transferir en tubs de microcentrífuga i es van centrifugar a $14.000 \times g$ durant 20 min a 4°C . El lisat cel·lular és el sobrenedant resultant. Es va mesurar la concentració mitjançant el Nanodrop i va ser utilitzat com a substrat d' SDS-PAGE (gel al 10%).

5.2.15 Western blot

La quantificació proteica es va dur a terme mitjançant l'espectrofotòmetre Nanodrop (ND-1000) llegint a 280nm per a cada mostra. Es va carregar la mateixa quantitat de proteïna en els gels SDS-PAGE i es van fer servir gels de resolució del 10% i gels d'aglutinament al 5%. Es va dur a terme l'electroforesi a un corrent constant de 30 mA, i el voltatge es va mantenir en tot moment sota els 150 volts durant 1 h 30 min o fins que el front blau de bromofenol sortís del gel per a proteïnes de pes molecular superior a 30 kDa. Es van quantificar els nivells de β -actina per verificar la quantitat de proteïna carregada en cada carril.

Taula 5-5: Components del gel de resolució al 10%.

	Volum (mL)
H ₂ O	4
Acrilamida/Bis 30%	3,3
Tris 1,5 M, pH 8,8	2,5
SDS 10%	0,1
Persulfat d'amoni 10%	0,1
TEMED	0,004

Taula 5-6: Components del gel d'aglutinament al 5%.

	Volum (mL)
H ₂ O	2,1
Acrilamida/Bis 30%	0,5
Tris 1 M, pH 6,8	0,38
SDS 10%	0,03
Persulfat d'amoni 10%	0,03
TEMED	0,003

Es va fer servir el sistema humit de Bio RAD per fer la transferència de les proteïnes resoltes del gel a la membrana de PVDF. Es va activar la membrana de PVDF en metanol durant 2 min i es va dur a terme la transferència a 250 mA durant 1 h. Es va comprovar la transferència de la proteïna mitjançant la tinció del gel, després de la transferència, amb Coomassie Brilliant Blue. El gel posttransferència es va deixar durant la nit en solució de tinció. Tot seguit, es va fer servir una solució de destinció per tal de decolorar el gel, fins que es va deixar el gel transparent amb les bandes proteïques de color blau.

Taula 5-7: Solució de blau de Coomassie.

	Quantitats per a 1 L
Metanol	450 mL
Blau de Coomassie	0,5 g
Barrejar-ho bé fins a solubilitzar-ho i afegir-hi:	
H ₂ O	450 mL
Àcid acètic	100 mL
Filtrar-ho i conservar-ho a temperatura ambient.	

Taula 5-8: Solució de destenyiment.

	Quantitats per a 1 L
H ₂ O	500 mL
Metanol	50 mL
Àcid acètic	75 mL
Afegir-hi H₂O fins a un volum final d'1L.	

Quan es va acabar la transferència, es va fer el bloqueig de la membrana (per evitar unions inespecífiques de l'anticòs primari), utilitzant TBST (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; Tween-20 0,05%) + llet descremada en pols (Central Lechera Asturiana) al 5%, durant 30 min a temperatura ambient amb agitació moderada.

Es va realitzar la detecció immunològica fent servir els anticossos primaris apropiats en una incubació durant la nit a 4 °C amb agitació. Es van fer 4 rentats de 10 min amb TBST, es va diluir l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa i es va incubar amb agitació moderada durant 1 h 30 min a temperatura ambient.

Es van revelar els immunoblots per visualitzar els anticossos units amb Pierce™ ECL o SuperSignal™ West Femto. Es van preparar els substrats amb una ràtio 1:1 (reactius de detecció 1: solució estable de peròxid, i detecció 2: solució luminol/potenciador). Es va incubar la membrana durant 1 min amb el substrat i després es va exposar a una pel·lícula de raigs X autoradiogràfica durant diferents intervals de temps. Es va revelar la pel·lícula amb l'ajuda d'una màquina reveladora (Optimax X-Ray Film Processor).

5.2.16 Estudis morfològics

Partint de mostres incloses en parafina, es desparafinaven i es rehidrataven. S'incubaven les mostres, sempre en una càmera humida, en tampó Tris 0,1 M + Tritó 0,01%, pH 7,4 durant 10 min, i, tot seguit, es bloquejaven en tampó Tris 0,1 M + Tritó 0,01% + BSA 1%, pH 7,4 durant 30 min. Es van tenyir les seccions amb anticòs primari anti-conillet d'Índies insulina en solució de bloqueig durant 2 h a temperatura ambient. Es rentaven amb tampó Tris 0,1 M, pH 7,4 durant 15 min en agitació moderada, i es tenyien amb anticòs secundari anti-conillet d'Índies biotinitat durant 2 h a temperatura ambient. Es rentaven amb tampó Tris 0,1 M, pH 7,4 durant 15 min en agitació moderada, i s'hi afegia l'enzim alcalina fosfatasa unit a estreptavidina-avidina durant 30

min a temperatura ambient. Es rentaven amb tampó Tris 0,1 M, pH 7,4 durant 15 min en agitació moderada, i s'hi afegia el substrat de l'alcalina fosfatasa. Es va fer servir el cromogen SIGMA FAST Fast Red TR/Naftol AS-MX com a substrat de l'alcalina fosfatasa. Es va fer servir hematoxilina per contratenyir els illots i es va quantificar l'àrea de la cèl·lula beta a cegues amb un microscopi òptic i el programari ImageJ.

Es van utilitzar 6 ratolins NOD/SCID WT i HTZ de 8 setmanes d'edat per grup experimental i es van examinar 8 seccions per ratolí a 4 nivells diferents (≥ 180 illots comptats/grup).

Taula 5-9: Anticossos usats per a les anàlisis morfològiques.

Anticòs	Dilució	Empresa
Anti-conillet d'Índies policlonal d'insulina	1:1.000	Dako
Anti-conillet d'Índies biotinitat - Super Sensitive Multiink	1 gota	Biogenex
Estreptavidina-avidina unit a alcalina fosfatasa - SS Label	1 gota	Biogenex
SIGMA FAST Fast Red TR/Naftol AS-MX pastilles fosfat + pastilles tampó Tris	1 pastilla de cada en 10 mL	Sigma Aldrich

5.2.17 Estudis d'immunofluorescència per analitzar les cèl·lules secretores de glucagó (cèl·lules α)

Es van obtenir seccions de pàncrees de 5 ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ de 5 setmanes d'edat. Es van comptar un mínim de ≥ 80 illots per grup.

Es va seguir el següent protocol de tinció immunohistoquímica: es van submergir els teixits desparafinats 5 min en solució Tris (Tris 0,1 M, pH 7,4), 30 min en solució de permeabilització (Tris + Tritó X-100 1%), 5 min en solució Tris, 1 h en solució de bloqueig (Tris + Tritó-100 0,01% + BSA 3%), 5 min en solució Tris, i, tot seguit, es van incubar amb anticòs primari durant la nit a 4 °C en una càmera humida. Es van rentar els portaobjectes 3 cops, 5 min, en solució Tris i es van incubar amb anticòs secundari durant 2 h, en una càmera humida en solució de bloqueig. Finalment, es van rentar els portaobjectes 3 cops, 5 min, en solució Tris, es van muntar amb Mowiol i es van obtenir imatges d'epifluorescència.

Taula 5-10: Anticossos usats per analitzar les cèl·lules α .

Anticòs	Dilució	Empresa
Anti-conillet d'Índies policlonal d'insulina	1:1.000	Dako
Hoechst 333421 mg/mL	1:200	Sigma Aldrich
Anti-ratolí glucagó	1:2.000	Sigma Aldrich
Anti-conillet d'Índies-Cy3	1:500	Jackson Immunoresearch laboratories
Anti-ratolí-Cy2	1:100	Jackson Immunoresearch laboratories

5.2.18 Determinació d'apoptosi tardana (TUNEL)

Es va utilitzar l'assaig d'apoptosi tardana TUNEL (*dUTP nick end labeling*) de Roche. De manera resumida: es van desparafinar els teixits seguint el protocol prèviament descrit, es van submergir en una solució de tampó citrat 0,1M, pH 6 i es van irradiar al microones a 750 W durant 1 min. Es van refredar immediatament afegint-hi aigua destil·lada i transferint els portaobjectes a una solució de PBS. Tot seguit, es van submergir durant 30 min en Tris 0,1 M, pH 7,5 + BSA 3% + FBS 20%. Es van rentar els portaobjectes 2 cops amb PBS i es van incubar amb la barreja de la reacció TUNEL durant 1 h a 37 °C en una càmera humida a la foscor. Es va prosseguir amb el protocol de tinció immunohistoquímica detallat en l'apartat anterior.

Es van analitzar un mínim de 7 ratolins NOD i NOD/SCID WT i HTZ de 5 setmanes d'edat per grup experimental (≥ 180 illots comptats/grup).

Taula 5-11: Anticossos usats per a l'assaig TUNEL.

Anticòs	Dilució	Empresa
Anti-conillet d'Índies policlonal d'insulina	1:1.000	Dako
Hoechst 3342 1 mg/mL	1:200	Sigma Aldrich
Anti-conillet d'Índies Cy3	1:500	Jackson Immunoresearch laboratories

5.2.19 Tinció d'antígens de membrana de leucòcits per a citometria de flux

Es van extreure leucòcits de la melsa i dels PLN de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat. També es van aïllar illots dels mateixos ratolins, es van tripsinitzar els illots per obtenir les cèl·lules beta i es va analitzar la infiltració limfocítica dels illots pancreàtics. Es van tnyir les cèl·lules aïllades amb anticossos que detectessin les proteïnes de ratolí CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD11c, MAC-3, CD80, CD86, CD45, CD69, CD62L (BD Bioscience) i CCR7 (eBioscience), i es va dur a terme la citometria de flux utilitzant el citòmetre FACSCanto II (BD).

5.2.20 Tinció intracel·lular d'antígens leucocitaris per a citometria de flux

Per tal de tenyir el factor de transcripció FoxP3, es va fer servir el kit d'eBioscience per a la tinció simultània de molècules de superfície i antígens intracel·lulars. De manera resumida: es van tenyir els antígens de superfície durant 30 min a 4 °C i, després de l'últim rentat, s'hi va afegir 1 mL de solució FoxP3 Fixation/Permeabilization 1 X. Es van incubar les mostres a 4 °C durant 30 min i, sense rentar, es van afegir 2 mL de tampó de permeabilització 1 X. Tot seguit, es van centrifugar i es van resuspendre amb anti-ratolí FoxP3 diluït en 100 µL de tampó de permeabilització 1 X, es van incubar a temperatura ambient durant 30 min, es van fer 2 rentats i es van passar les cèl·lules pel citòmetre de flux.

Taula 5-12: Anticossos usats per a les tincions intracel·lulars.

Anticòs	Dilució	Empresa
Anti-ratolí CD25	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD3	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD4	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí CD45	1:100	BD Biosciences
Anti-ratolí Foxp3	1:100	eBioscience

5.2.21 Tinció de marcadors intracel·lulars de cèl·lules beta

Es van aïllar els illots i es van tripsinitzar amb 500 µL de tripsina/EDTA durant 5–7 min a 37 °C, per tal d'obtenir una suspensió cel·lular que es va fixar en metanol fred a –20°C durant 24 h. Es va centrifugar la suspensió cel·lular a 900 x g durant 5 min, es va descartar el sobrenedant i es van rentar les cèl·lules 2 vegades amb solució de bloqueig (PBS + FBS 1%). Tot seguit, es van permeabilitzar les cèl·lules amb PBS + Tritó X-100 0,01% i es van mantenir les cèl·lules en gel durant 5 min. Es van tenyir les cèl·lules, durant 30 min a 4 °C, amb anticòs primari en solució de bloqueig amb Tritó X-100 0,01%. Es van rentar les cèl·lules 2 vegades amb solució de bloqueig amb Tritó X-100 0,01%; es van incubar, durant 30 min a 4 °C, amb anticòs secundari amb solució de bloqueig amb Tritó X-100 0,01%, i es van rentar amb la mateixa solució. Es van adquirir les dades mitjançant el citòmetre de flux FACSCanto II.

Taula 5-13: Anticossos usats per a les tincions de marcadors intracel·lulars de cèl·lules beta.

Anticòs primari	Dilució	Empresa
Anti-ratolí GLUT-2 biotinilat	1:50	R&D Systems
Anti-humà Ki67 de ratolí V450	1:20	BD Biosciences
Anti-ratolí CD45 conjugat amb FITC	1:100	BD Biosciences
Anticòs secundari	Dilució	Empresa
Estreptavidina-PE	1:500	BD Biosciences

Taula 5-14: Anticossos usats per a les tincions de marcadors intracel·lulars de cèl·lules beta.

Anticòs primari	Dilució	Empresa
Anti-ratolí GLUT-2 biotinilat	1:50	R&D Systems
Anti-rata Ki67 de ratolí monoclonal	1:50	Dako
Anti-ratolí CD45 conjugat amb PE	1:100	BD Biosciences
Anticòs secundari	Dilució	Empresa
Anti-ratolí CF™ 405S	1:200	Sigma Aldrich
Estreptavidina-APC	1:300	Immunotools

5.2.22 Contingut d'insulina d'illots pancreàtics

Es van aïllar els pàncrees totals de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 10 setmanes d'edat i se'n va mesurar el pes per tal de normalitzar l'assaig. Es van submergir els pàncrees en 6 mL de solució àcid-ètanol (HCl 0,18 M en etanol 70%), es van homogeneïtzar mitjançant un polítró i es van incubar durant la nit a 4 °C amb agitació moderada. Després de centrifugar i purificar la proteïna del sobrenedant, es va mesurar el contingut d'insulina (ng insulina / ng pàncrees) mitjançant ELISA d'insulina de Mercodia.

5.2.23 Contingut d'insulina d'illots pancreàtics

Es van aïllar els illots de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 10 setmanes d'edat. Es van submergir grups de 15 illots (de mida semblant) en 50 µL de solució àcid-ètanol per tal d'obtenir un extracte total de proteïna dels illots, segons el protocol explicat en l'apartat anterior. Es van expressar els resultats en forma de contingut d'insulina (µg/mL) per cada 15 illots.

5.2.24 Mesura de canvis en la concentració de calci intracel·lular $[Ca^{2+}]_i$

Es van aïllar illots pancreàtics de 5 ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ de 6 a 8 setmanes d'edat, i es van deixar reposar 2 h en medi base (glucosa 3 mM) a 37 °C en una incubadora. Tot seguit, es van tenyir amb Fura-2 AM 5 μ M en DMSO durant almenys 1 h a temperatura ambient en una càmera humida. Es van col·locar els illots en un cobreobjectes tractat amb poli-L-lisina en una cambra de perfusió muntada en un microscopi d'epifluorescència. Es van usar preferiblement illots petits i arrodonits per mesurar els canvis de $[Ca^{2+}]_i$, i es va seleccionar l'àrea dels illots, sobre la pantalla de l'ordinador, per mesurar aquests canvis. Es van perfondre els illots a una velocitat de 3 mL/min amb una solució de Ringer modificada que contenia (en mM): NaCl 120, KCl 5, $NaHCO_3$ 25, $MgCl_2$ 2,5, $CaCl_2$ 2,5 (pH 7,4), gasejats amb O_2 95% i CO_2 5%. Se'n van obtenir les mesures mitjançant la captació d'imatges intracel·lulars de calci, cada 2 s, amb una càmera Hamamatsu digital C9100, fent servir una roda amb un filtre dual equipada amb filtres de pas de banda de 10 nm per 340 nm i 380 nm. Es van adquirir les dades fent servir el programari Aquacosmos de Hamamatsu i es van expressar els canvis de fluorescència en funció de la proporció de fluorescència a 340 nm i 380 nm (F340/F380). Es van perfondre els illots seqüencialment amb glucosa 3 mM, 8 mM i 16 mM, i al final, amb KCl 25 mM en glucosa 3 mM, en intervals de temps de 10 min. Es van recollir mesures individuals de cada illot.

5.2.25 Anàlisi estadística

Tots els resultats es van representar en mitjana \pm SEM. Es va utilitzar la prova t o l'ANOVA unidireccional per tal de comparar 2 o més grups de dades, respectivament. Es va fer servir la prova log-rang per analitzar les diferències entre corbes d'incidència acumulativa de diabètics. Es van obtenir totes les anàlisis mitjançant el programari estadístic GraphPad Prism (v5.0a), i es va establir un límit estadístic significatiu de $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ i $***p \leq 0,005$.

6 RESULTATS

6.1 L'expressió de l'mRNA de la CDK11 disminueix a conseqüència de l'infiltrat leucocitari prèviament a la mort beta cel·lular

Mitjançant la tecnologia dels microxips es va comparar el perfil d'expressió d'mRNA de cèl·lules endocrines pancreàtiques de ratolins femella NOD no diabètiques d'11 setmanes d'edat (en el punt de desenvolupar la malaltia) i cèl·lules provinents de ratolins femella NOD/SCID de la mateixa edat, els quals no tenen limfòcits i no desenvolupaven diabetis, per tal d'identificar gens diferencialment regulats pel nínxol inflamatori que envoltava les cèl·lules beta dels illots de ratolins NOD. Vam trobar que l'expressió de l'mRNA de la CDK11 estava disminuïda 2,4 vegades en les cèl·lules endocrines dels NOD respecte als nivells d'expressió en els NOD/SCID, la qual cosa evidencia que la infiltració pancreàtica que es produeix als illots pancreàtics durant la progressió de l'atac autoimmune tenia un efecte important sobre el perfil molecular de les cèl·lules beta (Apartat A.2.1, Annex A.2).

6.1.1 La disminució de l'expressió de la CDK11 no altera la proliferació de les cèl·lules beta

Es van aïllar illots pancreàtics de ratolins NOD/SCID i NOD d'11 setmanes d'edat, per tal de confirmar la disminució de l'expressió de la CDK11 durant la infiltració, mitjançant PCR a temps real (Figura 6-1a). Es va corroborar que l'expressió de la CDK11 estava 3 cops disminuïda en les cèl·lules endocrines (CD45) dels NOD, comparada amb els nivells d'expressió dels NOD/SCID durant la progressió de l'atac autoimmune, abans de desenvolupar la malaltia ($0,2234 \pm 0,047$ vs. $0,674 \pm 0,09$, respectivament), la qual cosa confirma els resultats obtinguts en els assajos de microxips. També es van aïllar illots de ratolins NOD/SCID de 6 i 9 setmanes, per comparar l'expressió de la CDK11 en 3 punts temporals diferents (Figura 6-1b). Els ratolins NOD/SCID augmenten l'expressió de la CDK11 en les cèl·lules endocrines dels illots pancreàtics a les 9 setmanes d'edat, comparat amb els ratolins de 6 setmanes ($2,29 \pm 0,67$ vs. $1,11 \pm 0,06$, respectivament). A les 11 setmanes d'edat, l'expressió de la CDK11 és la mateixa que a les 9 setmanes.

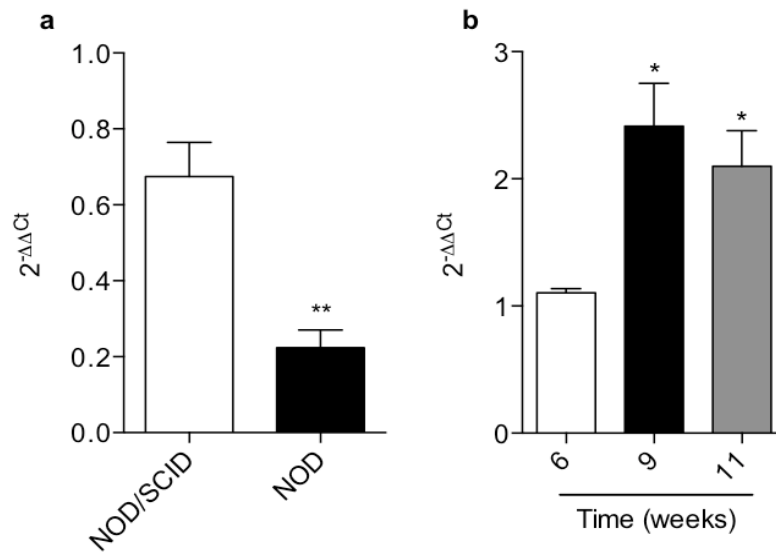


Figura 6-1: Nivells d'expressió de la CDK11 analitzats mitjançant qPCR, (a) de cèl·lules endocrines d'illots pancreàtics de ratolins NOD/SCID i NOD (CD45) d'11 setmanes d'edat, (b) de ratolins NOD/SCID de 6, 9 i 11 setmanes d'edat. Es van utilitzar ratolins NOD ($n = 6$) i NOD/SCID d'11 ($n = 10$), 6 i 9 ($n = 4$) setmanes. Es va dur a terme la prova t paramètrica (a) i Mann-Whitney (b).

Van estudiar-se els nivells de proliferació de les cèl·lules beta pancreàtiques de ratolins NOD i NOD/SCID d'11 setmanes d'edat, per tal de comprovar si la infiltració limfocitària alterava la proliferació cel·lular de les cèl·lules beta pancreàtiques dels ratolins NOD. Es van aïllar els illots pancreàtics i es van tripsinitzar les cèl·lules per tal d'obtenir una suspensió cel·lular. Es van tenir les cèl·lules utilitzant l'antigen Ki-67 (proteïna nuclear associada i necessària per a la proliferació cel·lular) com a marcador de proliferació (Figura 6-2a-d). En la Figura 6-2e es pot observar que no hi ha diferències de proliferació entre les cèl·lules beta pancreàtiques de ratolins NOD i NOD/SCID d'11 setmanes d'edat, la qual cosa indica que, malgrat la disminució de l'expressió de la CDK11, aquesta no implica canvis en la proliferació de les cèl·lules beta.

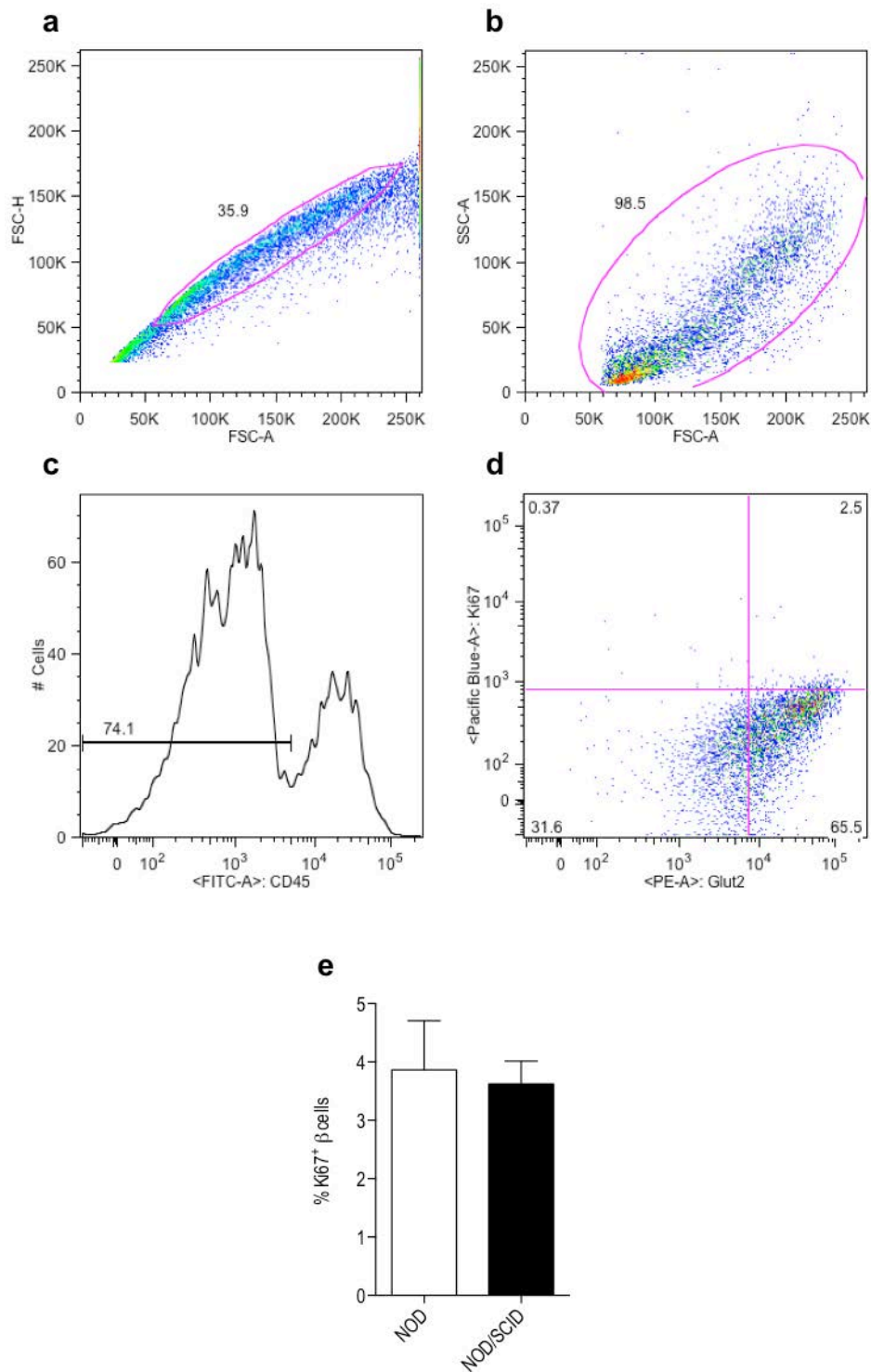


Figura 6-2: Activitat proliferativa en les cèl·lules beta pancreàtiques. Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que conté les cèl·lules en proliferació, Ki-67⁺. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular, per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant. A continuació (c i d), es van seleccionar cèl·lules CD45⁻ (d'origen no hematopoètic) que expressessin GLUT-2 (cèl·lules beta). De la fracció cel·lular (CD45⁻Glut2⁺), se'n va mesurar la població de cèl·lules en proliferació (Ki-67⁺). Finalment (e), es va obtenir el percentatge de cèl·lules beta en proliferació de ratolins NOD (n = 6) i NOD/SCID (n = 4) d'11 setmanes d'edat. Es va utilitzar la prova estadística Mann-Whitney.

La infiltració limfocitària dels illots pancreàtics dels ratolins NOD està causant la disminució de l'expressió de la CDK11. Per tal de comprovar la relació causal entre la disminució de l'expressió de la CDK11 i la severitat de la infiltració limfocítica, es van transferir 0, 1, 3, 5, 10 milions de leucòcits de melsa a ratolins NOD/SCID de manera intravenosa, i es van aïllar els illots al cap de 2 setmanes. Es va dur a terme una qPCR per tal d'analitzar els nivells d'expressió de la CDK11 de les cèl·lules beta pancreàtiques (CD45-) (Figura 6-3). Tot i que la CDK11 disminueix en funció inversa a la severitat de la infiltració dels illots, les cèl·lules beta no mostren una proliferació alterada (Annex A.2.2, Figura 8-3).

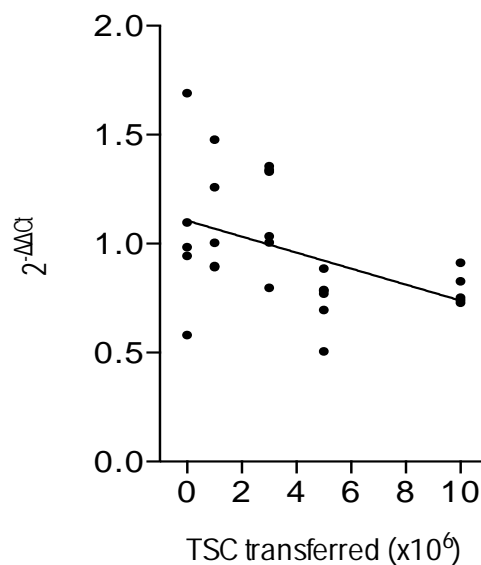


Figura 6-3: Determinació dels nivells d'expressió de l'mRNA de la CDK11 en cèl·lules beta de ratolins NOD/SCID, que van ser transferits de manera adoptiva amb diferents quantitats ($\times 10^6$) de leucòcits de melsa (TSC) (el nombre de ratolins recipients per condició era: 0 i 1, $n = 5$; 3 i 5, $n = 6$; 10, $n = 5$), 2 setmanes abans de l'extracció dels illots pancreàtics, a les 11 setmanes d'edat. Totes les comparacions es van fer en relació amb TSC (0). La regressió lineal es va dur a terme en condició a l'equació $y = -0,0367x + 1,106$, $p = 0,0177$.

6.2 Generació del model NODCDK11 β KO

Es van generar els ratolins NODCDK11 β KO, per tal d'estudiar l'efecte de la deleció de la CDK11 *in vivo* en l'homeòstasi de la massa de la cèl·lula beta i el desencadenament de la diabetis

autoimmune. Es va utilitzar el sistema de la recombinasa Cre sota el control del promotor de la insulina, per tal d'obtenir 1 KO condicional en les cèl·lules beta pancreàtiques que ens permetés estudiar l'efecte de la deficiència de la CDK11 a les cèl·lules beta en ratolins adults, ja que la deficiència total és letal a nivell embrionari (Figura 6-4).

Es va analitzar la presència genòmica de la CDK11 en melsa, timus i illots pancreàtics, per tal de comprovar la generació de la soca NODCDK11 β KO. Aquesta comprovació va ser realitzada prèviament per la Dra. Conchi Mora, i els resultats estan inclosos en l'Annex A.2.3.

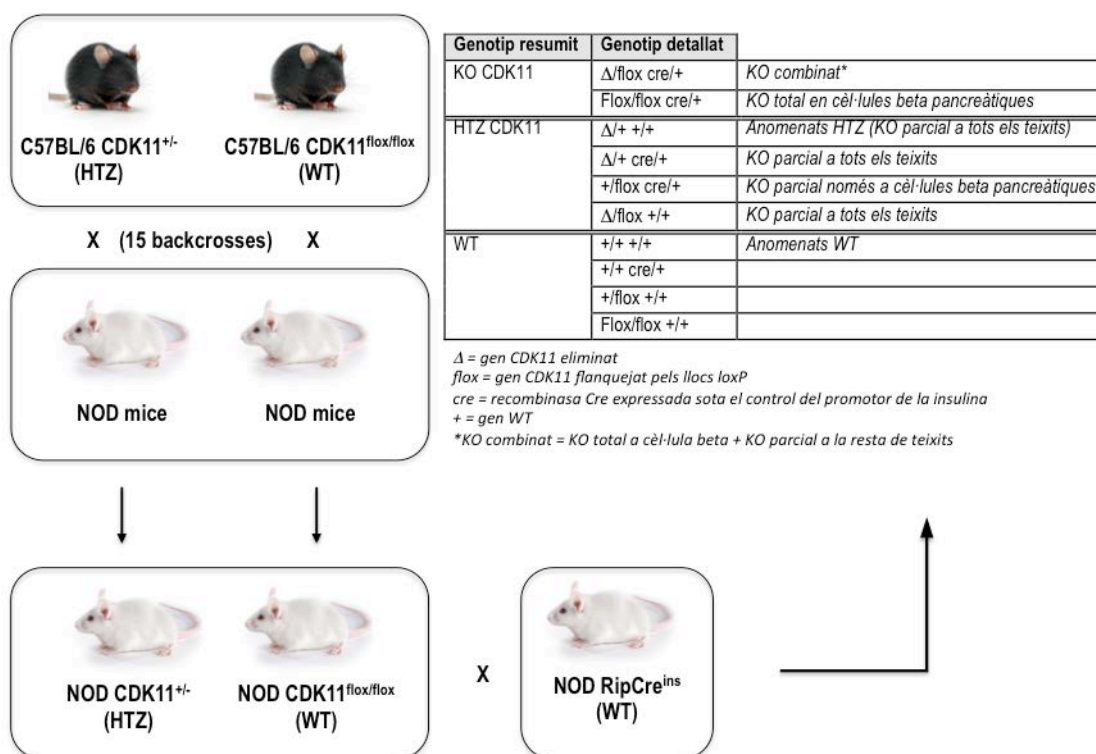


Figura 6-4: Representació esquemàtica de la generació de la soca NODCDK11 β KO. La Dra. Jill M. Lahti, de l'hospital St. Jude Children's de Memphis, ens va proporcionar els ratolins heterozigots (HTZ) per a la deficiència de la CDK11 en un fons genètic 129SvxC57BL/6; també ens va proporcionar els ratolins WT amb el gen CDK11 flanquejat per les seqüències loxP, en el mateix fons genètic. Vam retrocreuar aquests ratolins amb el fons genètic *non-obese diabetic* (NOD) per 15 generacions. El Dr. Ed. Leiter, de The Jackson Lab, ens va proporcionar molt generosament els ratolins NOD RipCre^{ins}, els quals expressen la recombinasa Cre sota el control del promotor de la insulina, amb expressió específica en cèl·lules beta pancreàtiques.

6.2.1 Fenotip del model CDK11 β KO. Les seqüències loxP afecten la incidència de la diabetis independentment de la presència o no de recombinasa

Es va estudiar la incidència espontània de la diabetis en ratolins femelles NOD deficients per a la CDK11 en cèl·lules beta (CDK11 β KO), comparats amb els HTZ o els WT, per tal de demostrar la

relació causal entre la deficiència de la CDK11 i la mort beta cel·lular *in vivo*. En la Figura 6-5a, s'hi pot observar que la incidència acumulativa de diabetis pot agrupar-se en 3 blocs. El primer grup no conté els llocs loxP (+/+ +/+, +/+ cre/+, Δ/+ +/+) i la incidència acumulativa a les 30 setmanes d'edat és la més elevada. El segon grup conté només 1 lloc loxP amb la recombinasa Cre o sense (+/flox +/+, +/flox cre/+, Δ/flox +/+, Δ/flox cre/+), i la incidència a les 30 setmanes d'edat és intermèdia. El tercer grup conté 2 llocs loxP al seu genoma (flox/flox +/+, flox/flox cre/+) i la incidència a les 30 setmanes d'edat és la més baixa. Els 3 grups estan formats per ratolins de diferents genotips; per tant, es pot concloure que la presència de seqüències loxP flanquejant el gen de la CDK11 afecta negativament la incidència de la diabetis. Per il·lustrar millor la influència dels llocs loxP en la incidència de diabetis, en la Figura 6-5b hi ha representada la incidència acumulativa de diabetis de 3 genotips de ratolins (+/+ +/+, +/flox +/+, flox/flox +/+), els quals són ratolins que presenten els 2 al·lells de la CDK11, però diferents dosis de llocs loxP; per tant, haurien de presentar la mateixa incidència de diabetis, però, com es pot observar, com més dosis de llocs loxP, la incidència és menor. Les corbes de supervivència són diferents estadísticament, i s'ha utilitzat la prova log-rang. El grup sense cap al·lel de la CDK11 flanquejat pels llocs loxP (+/+ +/+) presenta la incidència més elevada, amb un 76,36%; el grup que té 1 al·lel de la CDK11 flanquejat pels llocs loxP (+/flox +/+) presenta la incidència intermèdia del 44,67%, i finalment, el grup que té els 2 al·lells de la CDK11 flanquejats per llocs loxP (flox/flox +/+) presenta la incidència més baixa, amb un 18,59%. En la Figura 6-5c, s'hi pot observar el mateix efecte dels llocs loxP, però aquest cop representant en una mateixa gràfica ratolins de diferents genotips amb 1 sola dosi (+/flox +/+, +/flox cre/+, Δ/flox +/+, Δ/flox cre/+) o 2 dosis (flox/flox +/+, flox/flox cre/+) de llocs loxP. Els ratolins que conserven els 2 al·lells intactes de la CDK11 (+/flox +/+), 1 al·lel de la CDK11 eliminat a les cèl·lules beta pancreàtiques (+/flox cre/+), 1 al·lel eliminat a totes les cèl·lules del cos (Δ/flox +/+) i 1 al·lel eliminat a totes les cèl·lules més l'altre al·lel eliminat només a les cèl·lules beta pancreàtiques (Δ/flox cre/+), presenten una incidència de diabetis similar. D'altra banda, els ratolins que tenen els 2 al·lells de la CDK11 (flox/flox +/+), i els que tenen els 2 al·lells eliminats a les cèl·lules beta pancreàtiques (flox/flox cre/+), també presenten una incidència de diabetis similar. En conclusió, com més dosis de llocs loxP, la incidència de la diabetis disminueix. Finalment, per mostrar l'afectació de la recombinasa Cre en la incidència de diabetis, en la Figura 6-5d hi ha representada la incidència de diabetis de 2 genotips de ratolins (Δ/+ +/+, Δ/+ cre/+), els quals són ratolins que presenten només 1 al·lel de la CDK11 però diferents dosis de recombinasa Cre. Les corbes de supervivència no són diferents

estadísticament. En conclusió, els llocs loxP afecten clarament la incidència de la diabetis autoimmune, de manera que emmascaren l'efecte real entre la deficiència en la CDK11 i la mort beta cel·lular *in vivo*.

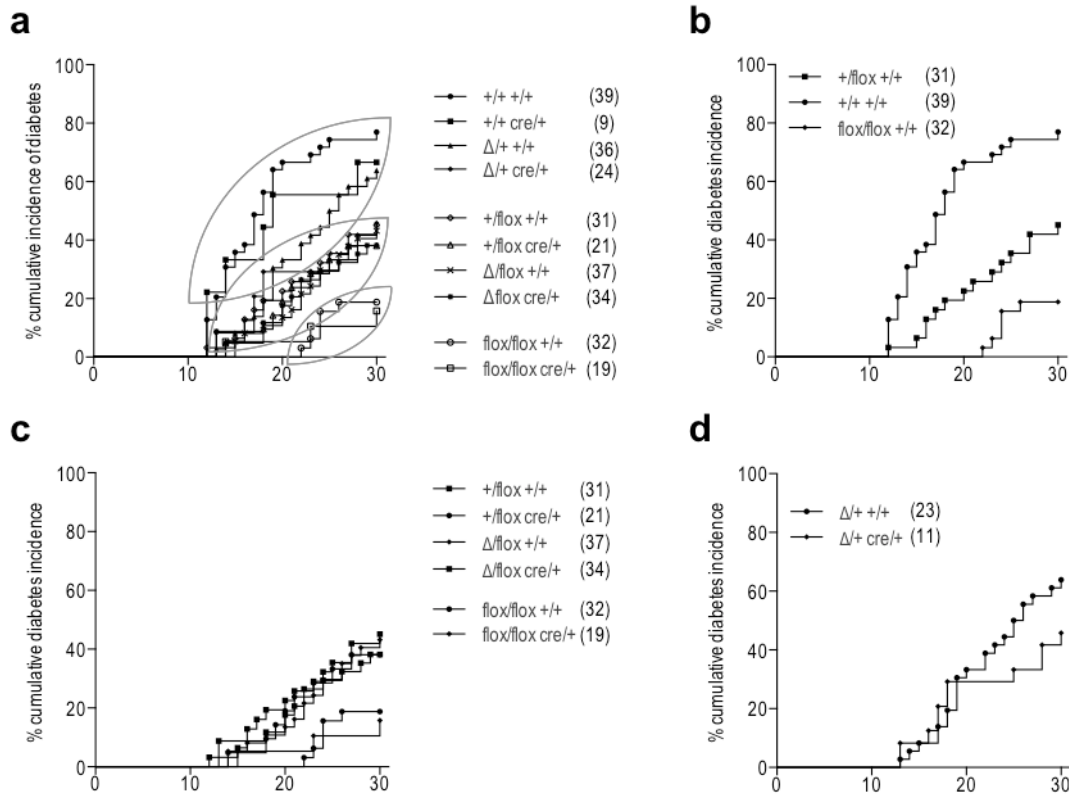


Figura 6-5: Els llocs loxP afecten la incidència de la diabetis autoimmune. (a) Incidència acumulativa de diabetis dels 10 genotips existents; (b) de ratolins amb el mateix genotip, WT, però diferent dosi de llocs loxP; (c) de ratolins amb la presència d'1 o 2 dosis de llocs loxP; (d) de ratolins amb el mateix genotip, HTZ, però diferent dosi de recombinasa Cre. El nombre d'animals estudiats està anotat al costat de cada genotip. La prova estadística utilitzada és la log-rang.

6.3 Resolució del model d'estudi de la CDK11

Es van eliminar tots els ratolins que tenien la recombinasa Cre i els llocs loxP, ja que aquests últims interferien en el diagnòstic de T1D. En la Figura 6-6a poden veure's els genotips seleccionats per estudiar la relació entre la CDK11 i la T1D: ratolins NOD HTZ (Δ /+) i WT (+/+) per a la CDK11. A més a més, es va generar la soca NOD/SCID CDK11 HTZ.

6.3.1 Caracterització fenotípica dels ratolins NOD hemideficients en CDK11

Per tal de comprovar la disminució de l'expressió de l'mRNA de la CDK11 en els ratolins NOD HTZ comparats amb els ratolins NOD WT, es van aïllar illots de ratolins NOD/SCID CDK11 HTZ i WT i es va determinar l'expressió de l'mRNA de la CDK11 mitjançant PCR a temps real (Figura 6-6b). Els ratolins NOD HTZ presentaven una disminució (1,5 vegades) de l'expressió de l'mRNA de la CDK11 ($0,66 \pm 0,07$, HTZ vs. $1,01 \pm 0,07$, WT). No hi havia diferències significatives entre el pes corporal dels ratolins dels 2 genotips (NOD HTZ i NOD WT) a les 10 setmanes d'edat (Figura 6-6c).

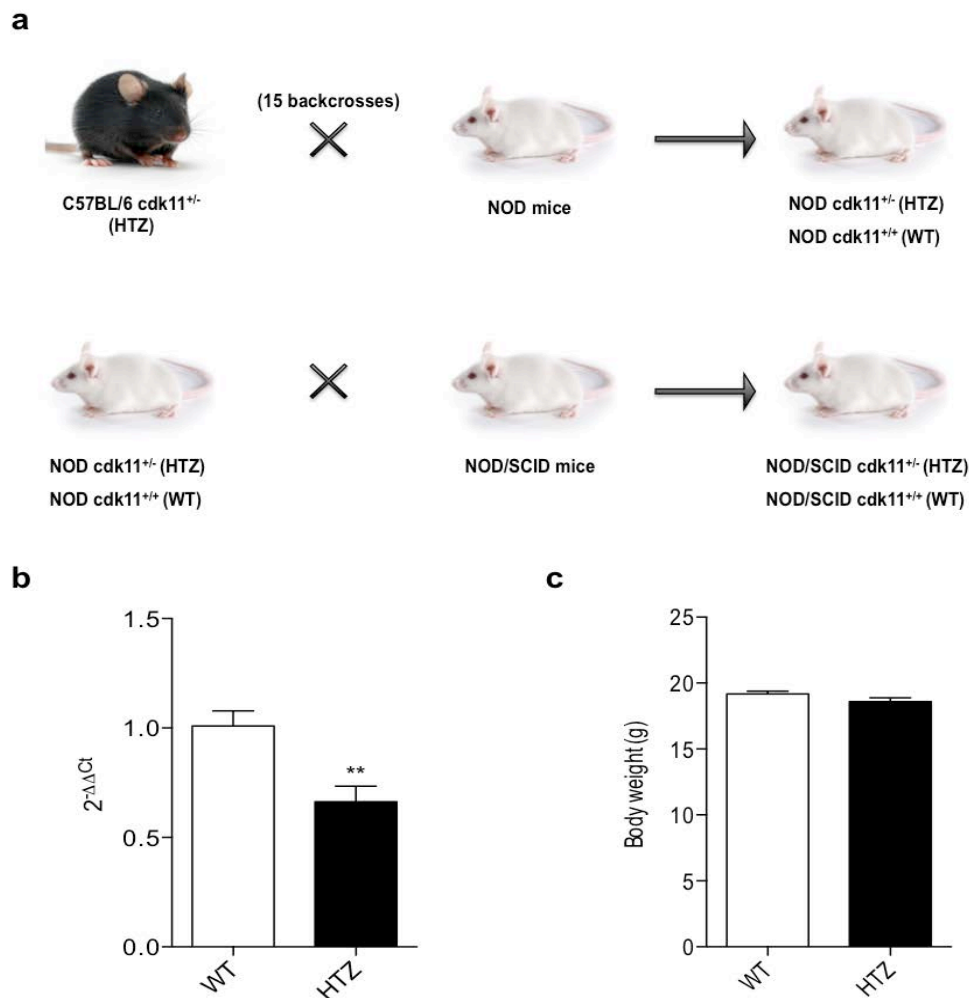


Figura 6-6: Esquema de la generació i caracterització de les soques NOD i NOD/SCID CDK11 HTZ. (a) La Dra. Jill M. Lahti, de l'hospital St. Jude Children's de Memphis, ens va proporcionar els ratolins heterozigots (HTZ) per a la deficiència de la CDK11 en un fons genètic 129SvxC57BL/6. Es van retrocreuar aquests ratolins al fons genètic *non-obese diabetic* (NOD) per 15 generacions. Seguidament, es van retrocreuar els ratolins NOD HTZ al fons genètic NOD/SCID. (b) Anàlisi dels nivells d'expressió de l'mRNA de la CDK11 en illots de ratolins NOD/SCID CDK11 HTZ i WT ($n = 5$) de 6 setmanes d'edat mitjançant PCR a temps real. (c) Pes corporal de ratolins NOD CDK11 HTZ ($n = 11$) i WT ($n = 17$) de 10 setmanes d'edat. Les dades es van analitzar aplicant la prova t paramètrica.

6.3.2 L'hemideficiència en CDK11 no altera l'àrea beta cel·lular per illot, però sí el nombre d'illots per ratolí

Es van fer seccions a partir de blocs inclosos en parafina de pàncrees de ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ de 8 setmanes d'edat i es van detectar les cèl·lules beta pancreàtiques mitjançant un anticòs antiinsulina (DAKO) revelat amb el cromogen SIGMA FAST Red TR/Naftol AS-MX com a substrat de l'alcalina fosfatasa (Figura 6-7a). Es va fer servir l'hematoxilina per contratenyir els illots pancreàtics i poder-ne estudiar el nombre i l'àrea. Per calcular l'àrea mitjana de la massa beta pancreàtica per a cada illot, es va mesurar l'àrea de la massa beta cel·lular de cada illot comptat, es va calcular la mitjana d'aquestes àrees per a cada ratolí, i seguidament es van representar en la Figura 6-7c. Tot i que l'àrea mitjana de la massa beta cel·lular dels illots pancreàtics es manté en els ratolins HTZ, el nombre d'illots comptats per cada ratolí és significativament més baix en els ratolins HTZ ($65,67 \pm 5,63$, HTZ vs. $85 \pm 3,87$, WT) (Figura 6-7b). Per tant, podem concloure que hi ha un defecte intrínsec de la massa beta cel·lular en els ratolins HTZ.

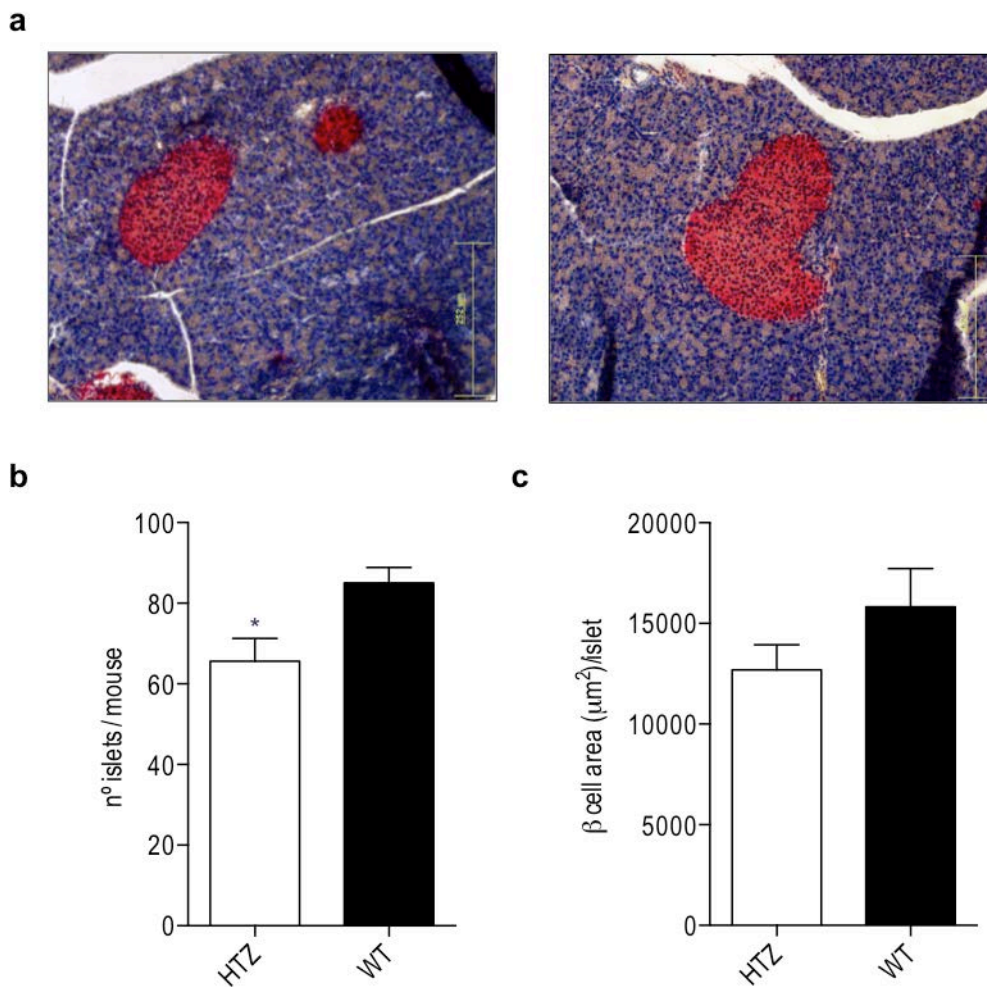


Figura 6-7: Àrea beta cel·lular a l'hemideficiència en CDK11. (a) Exemple d'imatges de microscòpia òptica de pàncrees de ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ de 8 setmanes d'edat. Els teixits van ser inclosos en parafina, i es van tenyir les cèl·lules beta pancreàtiques mitjançant la detecció d'insulina amb un anticòs específic (DAKO) com a substrat de la fosfatasa alcalina. (b) Representació d'illots comptats per cada ratolí. (c) Àrea mitjana de la massa beta cel·lular de cada ratolí. Es van utilitzar ratolins NOD/SCID WT i HTZ ($n = 6$) de 8 setmanes d'edat i es van examinar 8 seccions per ratolí a 4 nivells diferents (≥ 180 illots comptats/grup). La prova estadística utilitzada va ser la t paramètrica.

6.3.3 Els ratolins NOD CDK11 HTZ presenten una incidència de diabetis reduïda

La Figura 6-8a mostra la història natural dels ratolins NOD CDK11 HTZ i WT, a fi de demostrar la relació causal entre l'hemideficiència de la CDK11 i la mort beta cel·lular *in vivo*. Els ratolins NOD hemideficients en CDK11 (HTZ) presenten una incidència acumulativa de diabetis reduïda respecte als WT (70,83% vs. 81,39%, respectivament), així com un retard en la cinètica d'aparició de la malaltia. Es va dur a terme una tinció d'hematoxilina–eosina per tal d'estudiar si

la reducció de la incidència de diabetis observada en els ratolins HTZ estava associada a una infiltració limfocitària deficient dels illots pancreàtics comparada amb els ratolins WT. Es van analitzar pàncrees de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 5, 8 i 10 setmanes d'edat, que estaven inclosos en parafina (Figura 6-8c). D'aquesta manera també es va poder corroborar que la causa de la diabetis era autoimmune. La reducció de la puntuació d'infiltració dels ratolins HTZ no era significativa, però hi havia una tendència molt marcada en les 3 edats estudiades (Figura 6-8b).

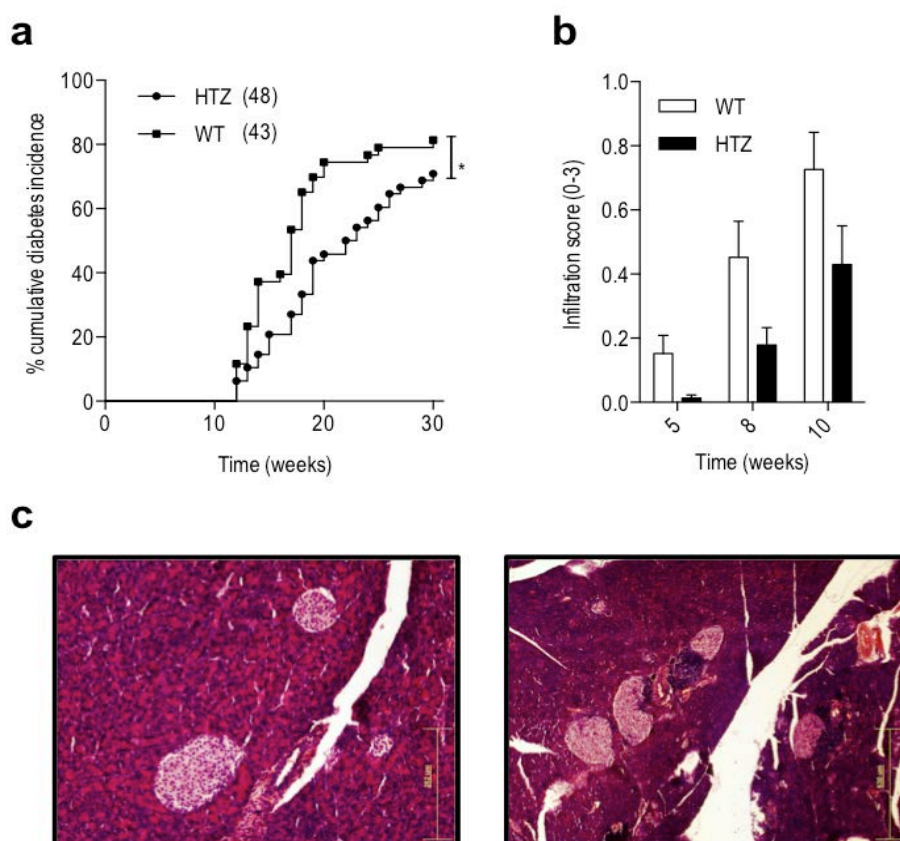


Figura 6-8: L'hemideficiència de la CDK11 retarda la malaltia i disminueix la incidència acumulativa de diabetis autoimmune. (a) Incidència acumulativa de ratolins NOD CDK11 HTZ i WT. Les corbes de supervivència són estadísticament significatives amb la prova de log-rang. El nombre d'animals estudiats està anotat al costat de cada genotip. (b) Puntuació d'infiltració de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 5, 8 i 10 setmanes d'edat. Es van assignar uns valors: 0 per a illots no infiltrats, 1 per a lesions periinsulítiques, 2 per a insulitis intrainsulars amb menys del 50% de l'àrea de l'illot infiltrada, i 3 per a insulitis amb més del 50% de l'àrea de l'illot infiltrada. (c) Exemple d'imatges de microscòpia òptica de pàncrees de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 8 setmanes d'edat. Els teixits van ser inclosos en parafina i es va dur a terme una tinció d'hematoxilina–eosina. Per tal d'estudiar la infiltració pancreàtica, es va utilitzar un mínim de 10 ratolins per grup experimental i es va examinar un mínim de 8 seccions per ratolí a 4 nivells diferents (>180 illots per ratolí). Es va utilitzar la prova de log-rang (a) i l'ANOVA bidireccional (b).

Es pot observar que els nivells d'infiltració dels illots pancreàtics en ratolins HTZ són iguals que els dels ratolins WT. Per tant, les diferències en la incidència de T1D espontània en els HTZ no són degudes a una insulinitis deficient.

6.3.4 La proliferació de la cèl·lula beta pancreàtica no es veu afectada per la reducció de la CDK11

Es va fer una tinció cel·lular per citometria de flux de la proteïna Ki-67, per tal d'estudiar si l'hemideficiència en la CDK11 alterava els nivells de proliferació de les cèl·lules beta (Figura 6-9a-d). Es van utilitzar ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ de 6–8 setmanes d'edat, es van aïllar els illots pancreàtics i es van tripsinitzar, per tal d'obtenir cèl·lules beta individuals. Com es pot veure en la Figura 6-9e, no hi havia diferències en els nivells d'expressió de Ki-67 dels ratolins HTZ comparats amb els ratolins WT. Els nivells de proliferació de les cèl·lules beta són similars en els 2 genotips, la qual cosa implica que la CDK11 exerceix una funció sobre la viabilitat de les cèl·lules beta que no depèn del cicle cel·lular.

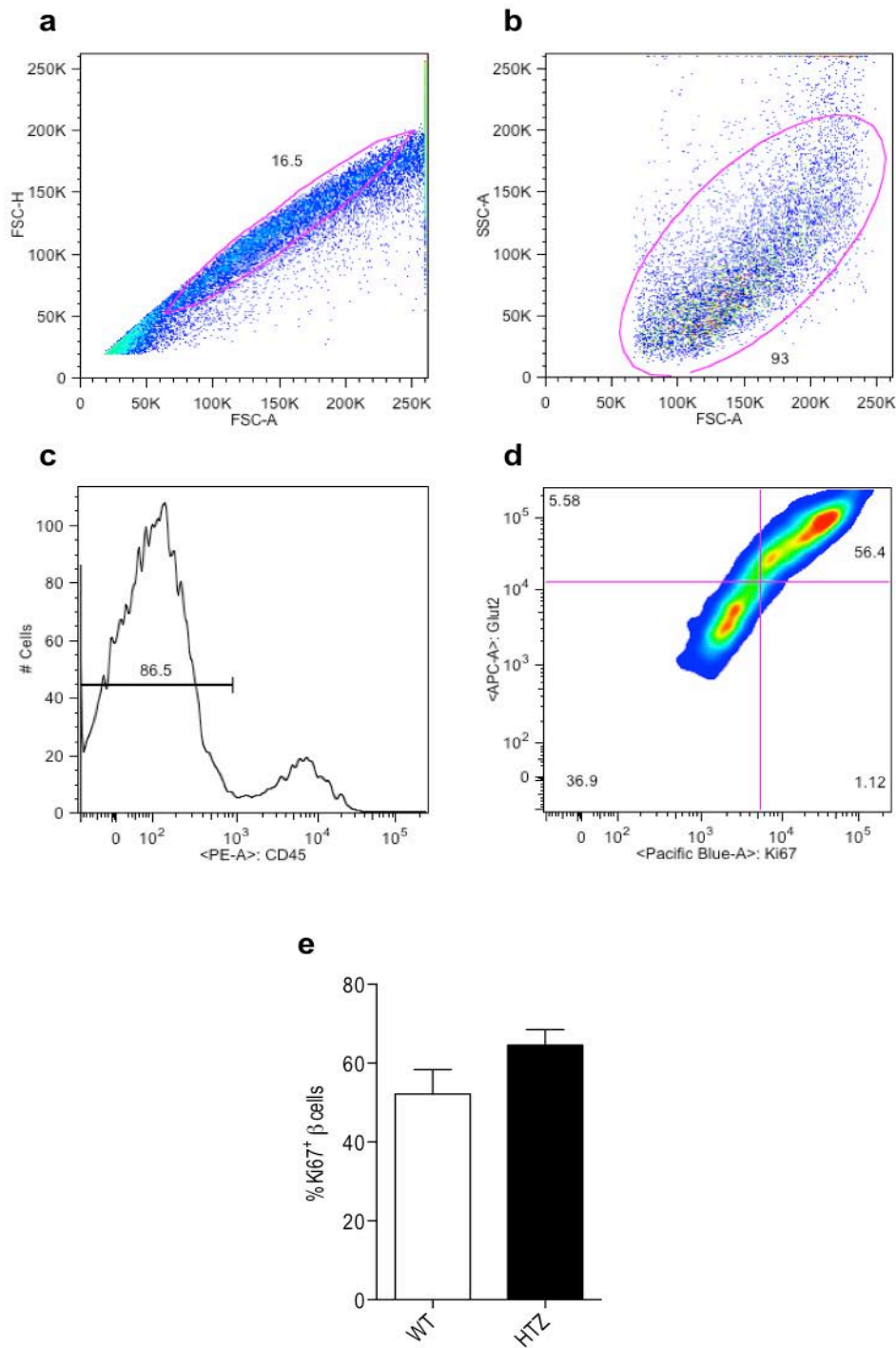


Figura 6-9: Nivells de proliferació de les cèl·lules beta pancreàtiques. Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que conté les cèl·lules en proliferació, Ki-67⁺. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular, per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant. Tot seguit (c), se'n van excloure les cèl·lules hematopoètiques (CD45⁺) i només es van seleccionar les cèl·lules beta (CD45-Glut2⁺). (d) De la fracció cel·lular (CD45-Glut2⁺), se'n va mesurar la població de cèl·lules en proliferació (Ki-67⁺). (e) Experiment representatiu de la fracció cel·lular en proliferació de cèl·lules beta de ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ ($n = 12$) de 6–8 setmanes d'edat. Es van dur a terme 3 experiments independents. Es va utilitzar la prova estadística t paramètrica.

6.3.5 La deleció parcial de la CDK11 com a mecanisme protector de l'apoptosi induïda per Fas

La supressió parcial de la CDK11 podria ser un mecanisme de protecció de l'apoptosi, tant induïda per Fas (Figura 6-10) com intrínseca, ja que la CDK11^{p60/46} té una funció important promovent l'apoptosi. Si aquest fos el motiu de la protecció vers la diabetis, els ratolins hemideficients en CDK11 haurien de presentar cèl·lules beta amb menys activitat apoptòtica.

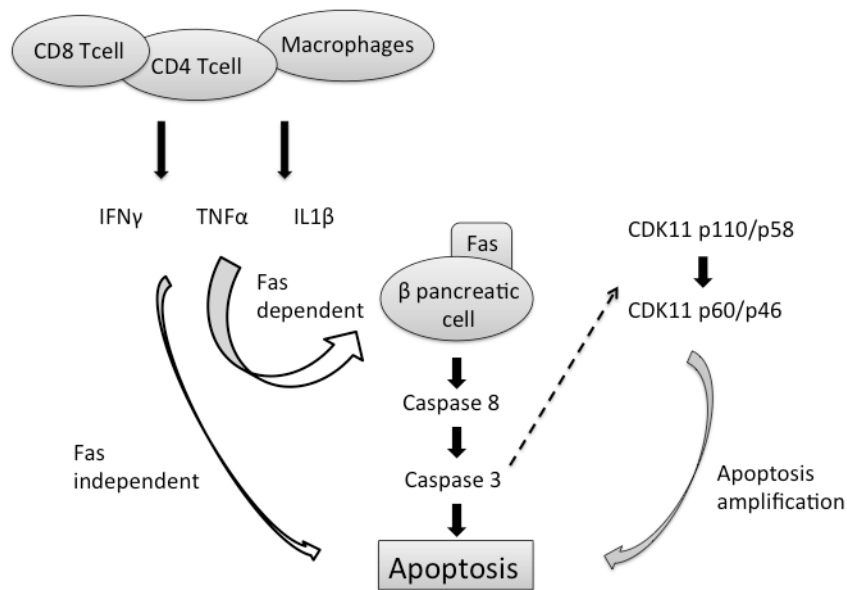


Figura 6-10: Esquema representatiu de la funció de la CDK11 en l'apoptosi induïda per Fas en les cèl·lules beta pancreàtiques. La infiltració limfocítica (cèl·lules T CD8, T CD4 i macròfags) secreta citocines proinflamàtores (IL1 β , IFN γ i TNF α) que promouen l'apoptosi independent de Fas o l'expressió de Fas en les membranes de les cèl·lules beta pancreàtiques, fet que activa la via de les caspases i condueix a l'apoptosi. La caspasa 3 talla la CDK11, la qual cosa dona lloc a la CDK11^{p46} (domini C terminal – catalític) i la CDK11^{p60} (domini N terminal – regulador), que ajuden a amplificar l'apoptosi.

6.3.6 Les cèl·lules beta pancreàtiques dels ratolins HTZ són resistents a l'apoptosi induïda per la infiltració limfocitària

Per tal d'estudiar si la disminució de la incidència de diabetis dels ratolins HTZ era deguda a una disminució de l'apoptosi de les cèl·lules beta pancreàtiques, es van agafar seccions de pàncrees de ratolins NOD i NOD/SCID CDK11 WT i HTZ de 5 setmanes d'edat i es van sotmetre a l'assaig de TUNEL, per quantificar-ne les cèl·lules beta apoptòtiques (Figura 6-11a). La reacció de TUNEL marca trencaments (*nicks*) en les cadenes de DNA que es generen durant l'apoptosi. Per tal d'analitzar el percentatge de cèl·lules apoptòtiques de cada genotip, es va calcular el nombre

de cèl·lules beta positives per a la reacció TUNEL de cada illot pancreàtic, normalitzat amb l'àrea de l'illot analitzat. Es van analitzar tant ratolins NOD (Figura 6-11b) com ratolins NOD/SCID (Figura 6-11c). El test histològic TUNEL està limitat pel petit nombre de cèl·lules beta que es troben en apoptosi en un temps determinat. El temps de duració de l'apoptosi, des del seu inici fins que es completa, pot durar només de 2 a 3 h. Tot i això, els ratolins NOD CDK11 WT presentaven un nombre de cèl·lules positives per TUNEL per àrea d'illot pancreàtic (10,8 cops) més elevat que els ratolins NOD CDK11 HTZ ($1,73 \times 10^{-3} \pm 0,69 \times 10^{-3}$ vs. $0,16 \times 10^{-3} \pm 0,09 \times 10^{-3}$, respectivament). Aquest resultat explicava per què en els ratolins HTZ la incidència espontània de diabetis era inferior que en els WT. En canvi, quan vam estudiar l'apoptosi de les cèl·lules beta en ratolins sense infiltració NOD/SCID CDK11 WT i HTZ, no hi havia diferències entre els 2 grups (Figura 6-11c). Aquest fet demostrava que la infiltració limfocitària era necessària per desencadenar la mort apoptòtica de la cèl·lula beta pancreàtica, de manera que una vegada l'illot pancreàtic començava a estar infiltrat, les cèl·lules beta dels ratolins NOD CDK11 WT es morien més ràpidament per apoptosi que les cèl·lules dels ratolins HTZ. Per tant, l'hemideficiència en CDK11 protegia la cèl·lula beta de l'apoptosi induïda per la insulinitis.

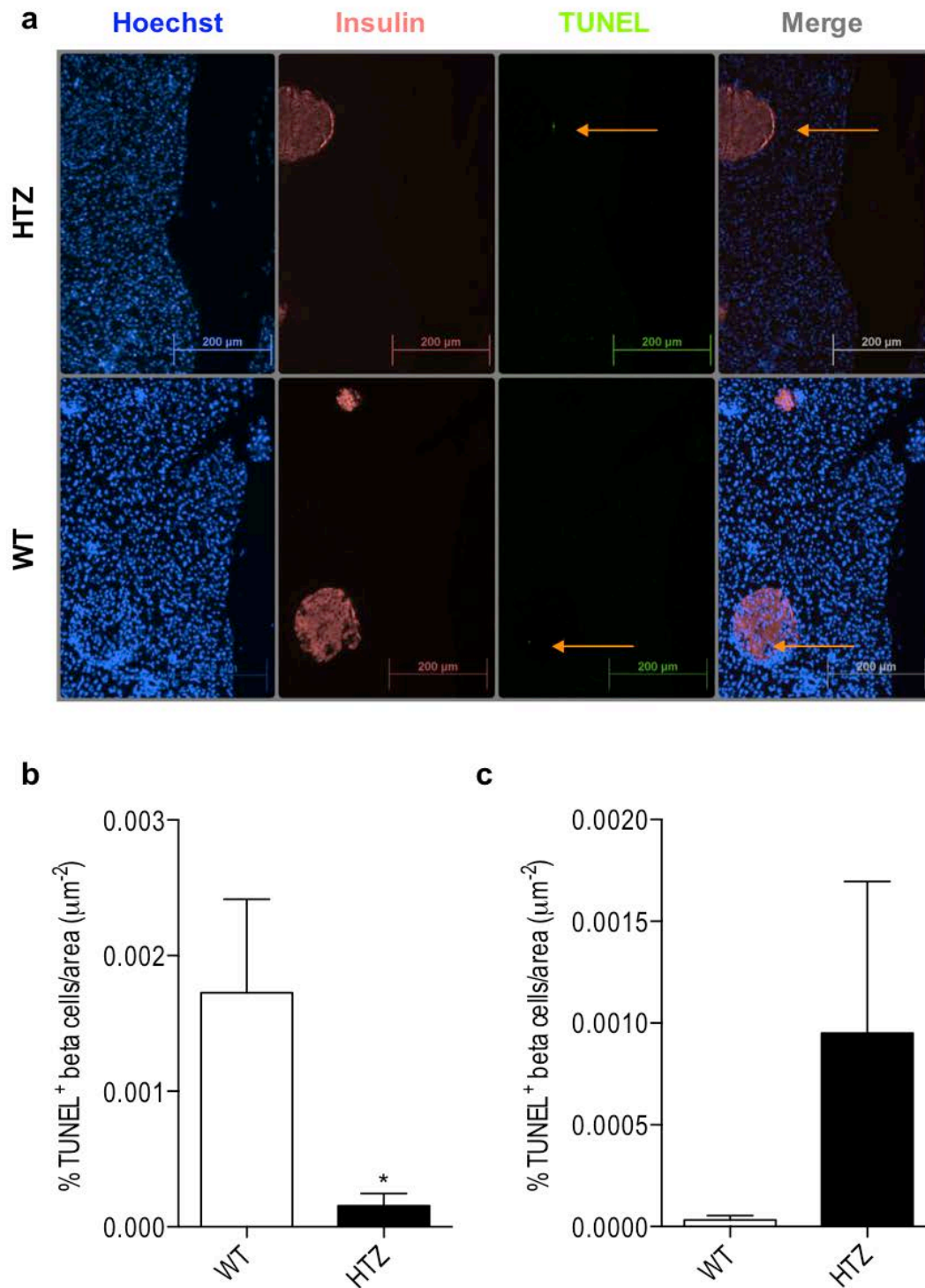


Figura 6-11: Quantificació de l'apoptosi de la cèl·lula beta pancreàtica en ratolins NOD i NOD/SCID HTZ i WT. (a) Exemple d'imatges de microscòpia de fluorescència per a l'assaig TUNEL de pàncrees de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 5 setmanes d'edat. Els teixits van ser inclosos en parafina, es van tenir els nuclis cel·lulars amb Hoechst; les cèl·lules beta pancreàtiques, amb antiinsulina, i les cèl·lules apoptòtiques, mitjançant la reacció TUNEL. (b) Percentatge del nombre de cèl·lules positives per la reacció TUNEL (apoptòtiques) de cada illot pancreàtic, normalitzat mitjançant l'àrea de l'illot analitzat, en ratolins NOD, i (c) en ratolins NOD/SCID. Es van utilitzar 7 ratolins de 5 setmanes d'edat per grup experimental (≥ 180 illots comptats/grup). Les dades es van analitzar mitjançant la prova estadística Mann-Whitney.

6.3.7 Estudis metabòlics de la glucosa en ratolins hemideficients en CDK11

L'homeòstasi de la glucosa en mamífers està altament regulada per la insulina. Els principals efectes de la insulina inclouen estimular la captació de glucosa, la síntesi de glicogen al fetge i múscul, la formació de triglicèrids que s'emmagatzemaran als adipòcits, i la síntesi proteica. Les cèl·lules beta pancreàtiques són les encarregades de secretar insulina, i aquesta secreció està regulada per la glicèmia. Una insuficiència en la secreció d'insulina provoca diabetis mellitus (Lazo de la Vega-Monroy and Fernandez-Mejia 2011).

6.3.7.1 Els ratolins HTZ tenen un contingut pancreàtic d'insulina disminuït

Per tal d'estudiar el contingut d'insulina, tant en pàncrees total com en illots pancreàtics, es van analitzar ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 10 setmanes d'edat, es van aïllar pàncrees i illots pancreàtics de diferents ratolins pels 2 estudis respectius, i es van seguir els protocols d'extracció d'insulina amb àcid-ètanol, detallats en l'apartat de mètodes. En la Figura 6-12a es pot observar que, malgrat que els 2 genotips presentaven el mateix pes de pàncrees total, el contingut d'insulina total d'aquests pàncrees es veia disminuït en els ratolins HTZ ($310,7 \pm 14,92$, HTZ vs. $375,4 \pm 24,01$, WT) (Figura 6-12b). Això es devia al fet que els ratolins HTZ tenen menys illots pancreàtics per pàncrees comparat amb els ratolins WT (Figura 6-7b), de manera que el contingut total d'insulina es veia disminuït. D'altra banda, no es veien diferències significatives en el contingut d'insulina per illot entre els 2 genotips, tant en l'anàlisi de grup d'illots de mida petita (Figura 6-12c) com en la de grup d'illots de mida mitjana (Figura 6-12d). Aquest fet ens permet concloure que els ratolins HTZ tenen un contingut d'insulina total de pàncrees disminuït com a conseqüència del fet que els pàncrees dels ratolins HTZ contenen menys illots, però si analitzem els illots individualment, aquests presenten el mateix contingut d'insulina en els 2 genotips.

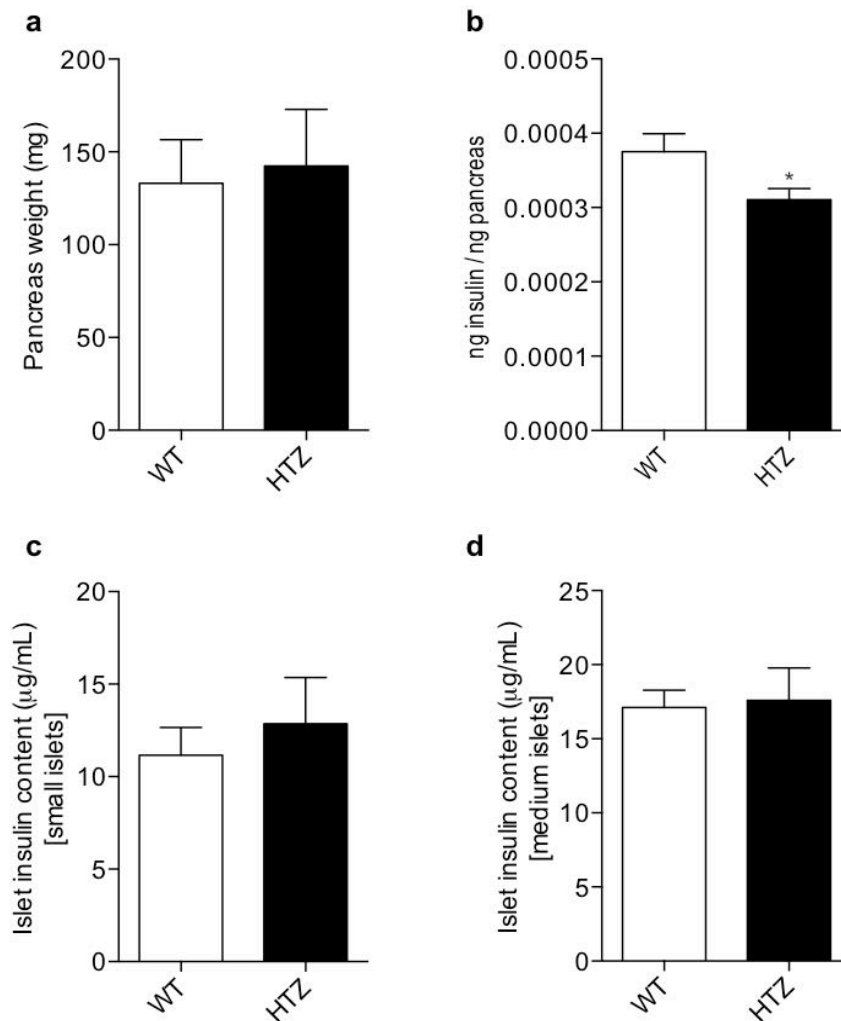


Figura 6-12: Contingut d'insulina per pàncrees i per illot pancreàtic. (a) Pes del pàncrees de ratolins NOD CDK11 WT ($n = 6$) i HTZ ($n = 7$) de 10 setmanes d'edat, i (b) contingut d'insulina total d'aquests pàncrees normalitzats pel seu pes total. (c) Contingut d'insulina d'illots de mida petita i (d) de mida mitjana de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 10 setmanes d'edat. En les gràfiques c i d es van analitzar grups de 15 illots de mida similar, utilitzant de 5 a 11 grups procedents de 2 a 4 ratolins diferents, segons el grup experimental. Se'n van analitzar les dades mitjançant la prova t paramètrica.

6.3.7.2 Els ratolins HTZ mostren fluctuacions de calci normals respecte a la glucosa en els seus illots

La secreció d'insulina pels illots pancreàtics controla l'homeòstasi de la glucosa. Els nutrients secretagogs (glucosa, alguns aminoàcids, etc.) afavoreixen la inducció de la secreció dels grànuls d'insulina de les cèl·lules beta pancreàtiques. La despolarització de les membranes, la

subseqüent mobilització del calci i l'activació de les vies de senyalització condueixen a l'exocitosi regulada dels grànuls d'insulina a través dels canals de calci dependents de voltatge (Hinke, Hellemans et al. 2004, Hiriart and Aguilar-Bryan 2008, Seino, Shibasaki et al. 2011, Hinke, Navedo et al. 2012). El Fura-2 AM és un indicador d'alta afinitat de calci intracel·lular que s'excita mitjançant llum UV. Per tal d'estudiar si els mecanismes associats amb la secreció d'insulina estaven alterats en els ratolins HTZ, es van aïllar illots de ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ de 6 a 8 setmanes d'edat i es van carregar amb Fura-2 AM. Es van perfondre els illots amb diferents concentracions de glucosa (3 mM, 8 mM i 16 mM) o amb KCl 25 mM en glucosa 3 mM. Es van obtenir les mesures mitjançant la captació d'imatges intracel·lulars de calci, seguint el procediment detallat en l'apartat de mètodes. En la Figura 6-13a es pot veure un exemple representatiu de les mesures obtingudes. Es començava perfonent els illots mitjançant glucosa 3 mM, fins que la proporció de fluorescència F340/F380 (proporció de fluorescència emesa a 340 nm i 380 nm a causa de la presència de Fura) s'estabilitzava. A continuació, es canviava a glucosa 8 mM durant 10 min. En un primer moment, la proporció F340/F380 disminuïa coincidint amb l'entrada de calci al reticle endoplasmàtic (RE) i, seguidament, apareixia un pic i una subseqüent fase estable (plató). El pic corresponia a una ràpida mobilització des de l'RE, la qual cosa causava un increment del calci citosòlic. La fase plató es caracteritzava per l'entrada de calci a través dels canals de calci, calci-dependents i independents de voltatge. Durant els 10 min de perfusió amb glucosa 8 mM, l'illot mostrava oscil·lacions als nivells de calci intracel·lular, fet que induïa la secreció d'insulina. Quan la concentració de glucosa augmentava a 16 mM, la proporció d'emissió entre F340/F380 augmentava, la qual cosa implicava un increment del calci intracel·lular i major secreció d'insulina. Finalment, es tornava a perfondre l'illot amb glucosa 3 mM per tal d'estabilitzar-lo i, a continuació, es canviava el medi de perfusió a KCl 25 mM en glucosa 3 mM, com a control positiu de despolarització, de manera que entrava potassi a l'interior cel·lular i despolaritzava la cèl·lula, cosa que provocava l'increment de calci a l'interior cel·lular de manera considerable. Del conjunt de totes les gràfiques obtingudes, és interessant analitzar l'àrea sota la corba (AUC) de la resposta a glucosa 8 i 16 mM (Figura 6-13b) ja que les anàlisis de l'AUC donen una estimació de l'entrada global de calci. Es pot observar que no hi havia diferències significatives entre l'AUC d'illots pancreàtics de ratolins HTZ i WT, de manera que el flux de calci no es veia alterat quan els illots estaven exposats a concentracions de glucosa 8 i 16 mM. La proporció basal F340/F380 a glucosa 3 mM (Figura 6-13c) també era similar, i indicava que el flux de calci basal a glucosa 3 mM no es veia afectat. A més a més,

l'amplitud del primer transitori (primera fluctuació de calci) i del pic de KCl (pic de fluctuació de calci a causa de la incubació de l'illot amb KCl, control positiu) tampoc no es veia alterada (Figura 6-13d-e). En conclusió, el flux de calci no es veia afectat en ratolins HTZ; per tant, la secreció d'insulina era similar entre els 2 genotips, almenys en resposta a glucosa per l'hemideficiència de CDK11.

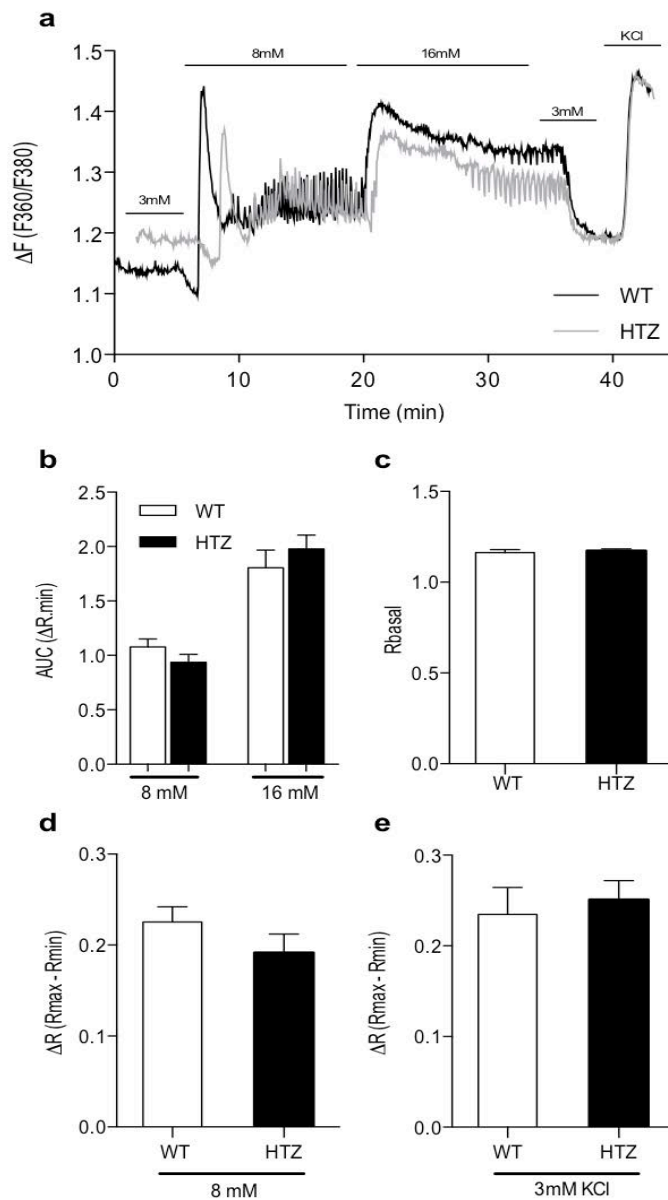


Figura 6-13: L'hemideficiència de la CDK11 no afecta les fluctuacions de calci intracel·lular. (a) Exemple representatiu de l'efecte que la perfusió amb glucosa 3 mM, 8 mM i 16 mM i de KCl 25 mM en glucosa 3 mM produeix en illots de ratolins NOD/SCID WT i HTZ de 6 a 8 setmanes d'edat, quant a la seva resposta en canvis de concentració intracel·lular de calci al llarg del temps. (b) Àrea sota la corba (AUC) de 10 min de resposta a glucosa 8 mM i 16 mM. (c) Proporció basal a 3 mM, que coincideix amb el temps just abans de canviar a glucosa 8 mM. (d) Variació dels valors màxim i mínim de l'amplitud del primer transitori, que succeeix en canviar la concentració de glucosa de 3 mM a 8 mM. (e) Variació dels valors màxim i mínim de l'amplitud del senyal degut a K^+ , que succeeix en perfondre l'illot amb glucosa 3 mM i KCl 25 mM després d'haver estat perfós amb glucosa 3 mM. Es van analitzar 14 i 15 illots procedents de ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ ($n = 5$), respectivament, de 6 a 8 setmanes d'edat. R, proporció de fluorescència emesa a 510nm quan s'excita a 340 nm i 380 nm (F340/F380); R, proporció F360/F380; ΔR , variació de la proporció F340/F380. Es va aplicar la prova ANOVA unidireccional (b) i la prova t paramètrica (c, d i e).

6.3.8 L'hemideficiència en CDK11 s'associa amb insulinèmies inferiors en resposta a estímuls de glucosa

Per tal d'estudiar si el metabolisme de la glucosa i la secreció d'insulina estaven alterats *in vivo* en ratolins HTZ, es va realitzar una prova de tolerància a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 10 (Figura 6-14a) i 6 (Figura 6-14c) setmanes d'edat, que havien estat en dejú durant 16 h. Al mateix temps que es prenen mostres de sang per analitzar-ne la glucèmia, també es recollia sang suficient per analitzar-ne la concentració d'insulina en sèrum mitjançant l'assaig d'ELISA (Figura 6-14b). Com es pot observar en la Figura 6-14a i en la Figura 6-14c, la disminució de la CDK11 en ratolins HTZ no alterava els nivells de glucosa en sang respecte a l'estímul de glucosa. En dejú, a temps 0, els 3 grups d'animals estudiats (WT, HTZ i controls; els últims no estaven estimulats amb glucosa, sinó injectats amb salí fisiològic) presentaven glicèmies similars. El pic màxim de glucosa en sang es donava als 60 min després de la injecció de glucosa i, a partir d'allí, els nivells començaven a disminuir. El grup control mantenia el rang de concentració de glucosa en sang baix en tot moment. En la Figura 6-14b es va analitzar la concentració d'insulina en sang després de l'estímul de glucosa. En dejú, a temps 0, just abans d'injectar l'estímul de glucosa, els 3 grups experimentals (WT, HTZ i controls) presentaven insulinèmies similars. No obstant això, als 60 min després de la injecció de glucosa, moment en què es produeix el pic màxim de glicèmia, els ratolins HTZ presentaven una insulinèmia més baixa, comparada amb els ratolins WT ($1,804 \pm 0,164$ vs. $2,879 \pm 0,33$, respectivament). Aquesta dada corrobora el fet que, tot i que els ratolins HTZ no tenen els mecanismes de secreció d'insulina alterats, com que tenen un nombre d'illots més reduït i, per tant, la insulina pancreàtica total està disminuïda, la insulina final secretada sigui menor. Per tant, els ratolins HTZ haurien de metabolitzar pitjor la glucosa, però, com es veu en l'IPGTT, no tenen alterada la resposta a l'estímul de glucosa. La conclusió més lògica és que els ratolins HTZ tenen una sensibilitat a la insulina més alta, almenys quan estan exposats a altes concentracions de glucosa, de manera que acabaven captant la glucosa amb la mateixa eficàcia que els ratolins WT. Finalment, a temps 120, no hi havia diferències significatives d'insulinèmia entre ratolins WT i HTZ.

Seguidament es va estudiar la sensibilitat perifèrica a la insulina. Es va injectar un *bolus* d'insulina a la cavitat intraperitoneal de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 10 setmanes d'edat, que estaven alimentats, i es va monitorar la glicèmia al llarg del temps. Els ratolins HTZ no

presentaven una sensibilitat a la insulina alterada quan estaven exposats a concentracions de glucosa normals (Figura 6-14d). En condicions d'alimentació normals, a temps 0, just abans d'injectar l'estímul d'insulina, els 3 grups experimentals presentaven glicèmies similars. Tot seguit, la glicèmia baixava tant en els grups que havien rebut insulina (WT i HTZ) com en el grup control, que havia rebut una injecció de salí fisiològic. Aquest fet possiblement era degut a l'estrès a què estava sotmès l'animal en el moment de la injecció, perquè després la glicèmia del grup control s'estabilitzava i els nivells de glucosa no baixaven més. No obstant això, en els grups WT i HTZ, els nivells de glucosa continuaven baixant fins a arribar a uns nivells mínims, aproximadament 60 min després de l'estímul. Seguidament, els nivells de glucosa començaven a pujar, i en cap moment hi havia diferències significatives entre els 2 genotips. Com que la sensibilitat a la insulina no es veia alterada en els ratolins HTZ, era necessari estudiar els nivells de glucagó en sang (glucagonèmia), per determinar si aquests es veien disminuïts; s'explicava així la normoglucèmia dels HTZ, malgrat produir menys insulina.

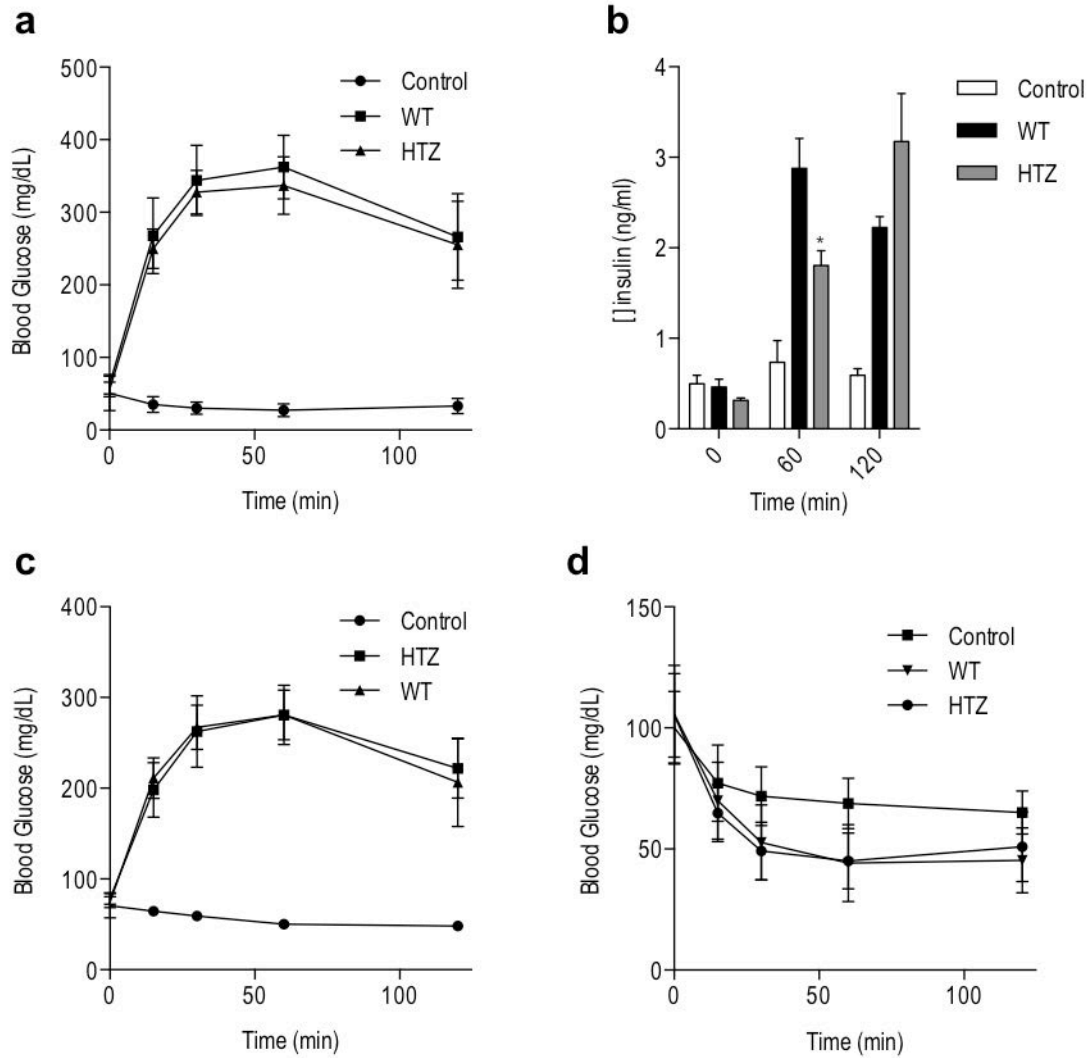


Figura 6-14: Estudis metabòlics dels ratolins HTZ en resposta a estímuls de glucosa i insulina. (a) Estudi IPGTT, en què es van injectar 2 g de glucosa per kg de pes corporal en ratolins de 10 setmanes privats de menjar durant 16 h. (b) Detecció d'insulina de sèrums dels animals estudiats en la gràfica a, mitjançant la tècnica d'ELISA. Es van utilitzar de 2 a 10 animals en els diferents grups experimentals. (c) Estudi IPGTT en ratolins de 6 setmanes d'edat. (d) Estudi IPITT, en què es va injectar 1 U d'insulina recombinant humana per kg de pes corporal en ratolins alimentats de 10 setmanes. Es van utilitzar ratolins NOD CDK11 WT i HTZ. Per a l'estudi IPGTT de 10 setmanes: WT ($n = 16$), HTZ ($n = 17$) i controls ($n = 5$). Per a l'estudi IPGTT de 6 setmanes: WT i HTZ ($n = 9$) i controls ($n = 4$). Per a l'estudi IPITT: WT i HTZ ($n = 16$) i controls ($n = 8$). Les mesures de glicèmia en sang es van dur a terme a temps 0, 15, 30, 60, 120 min. L'anàlisi d'insulina en sèrum es va dur a terme en les mostres de temps 0, 60, 120 min. Als ratolins control se'ls administrava una injecció intraperitoneal de salí fisiològic. Es va utilitzar la prova ANOVA unidireccional (a, c i d) i l'ANOVA bidireccional (b).

6.3.9 Els nivells de glucagó en sèrum de ratolins privats de menjar no estan alterats per l'hemideficiència en CDK11

El glucagó és una hormona peptídica de 29 aminoàcids que és processada a partir del proglucagó. El proglucagó s'expressa en diferents teixits (cervell, pàncrees i intestí) i es processa en múltiples pèptids per trencament proteolític. Se sintetitza a les cèl·lules alfa del pàncrees i se secreta al torrent sanguini quan els nivells de glucosa en sang són baixos, la qual cosa estimula la producció hepàtica de glucosa i n'eleva els nivells en sang, contràriament a l'efecte de la insulina. A més a més, el glucagó inhibeix l'alliberament d'insulina (Jiang and Zhang 2003). Es va estudiar si la població de cèl·lules alfa minvava en els ratolins HTZ mitjançant immunofluorescència (Figura 6-15a). Tot i que els nivells d'expressió de l'mRNA del glucagó es veien disminuïts en ratolins NOD/SCID HTZ de 6 setmanes d'edat (Annex A.3.1,), el nombre de cèl·lules alfa individuals per àrea d'illot pancreàtic no es veia alterat (Figura 6-15b). No obstant això, els ratolins HTZ tenien un nombre més baix d'illots pancreàtics per ratolí, cosa que fa pensar que el nombre total de cèl·lules alfa seria més baix en els ratolins HTZ. Per tant, si tenien una expressió dels nivells de l'mRNA disminuïda i un nombre d'illots més baix, seria d'esperar que la secreció del glucagó dels illots individuals i la del pàncrees total en ratolins HTZ també estigués disminuïda.

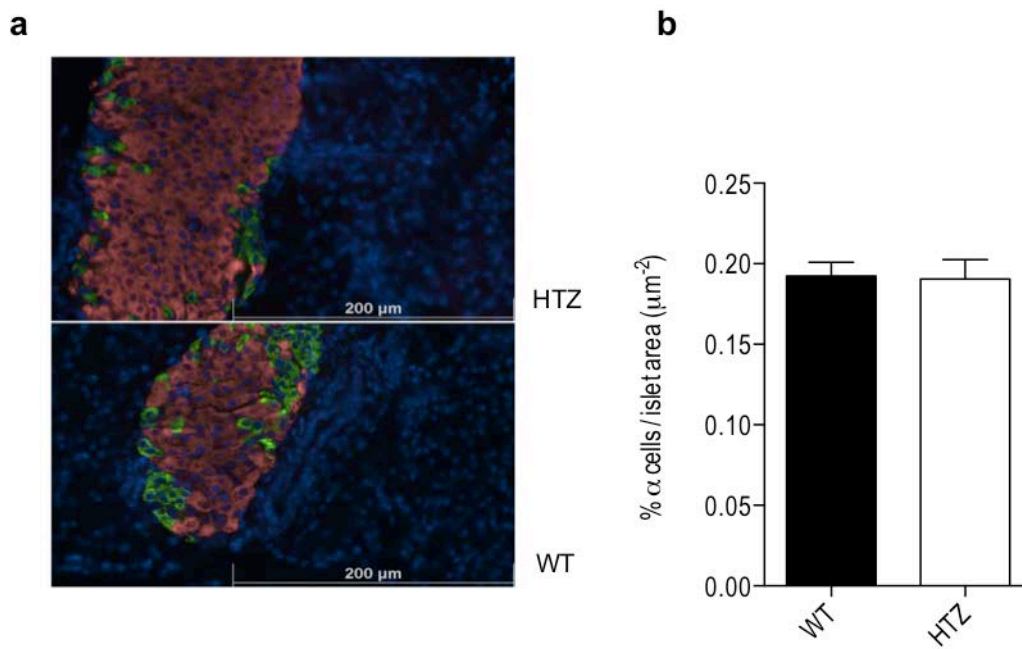
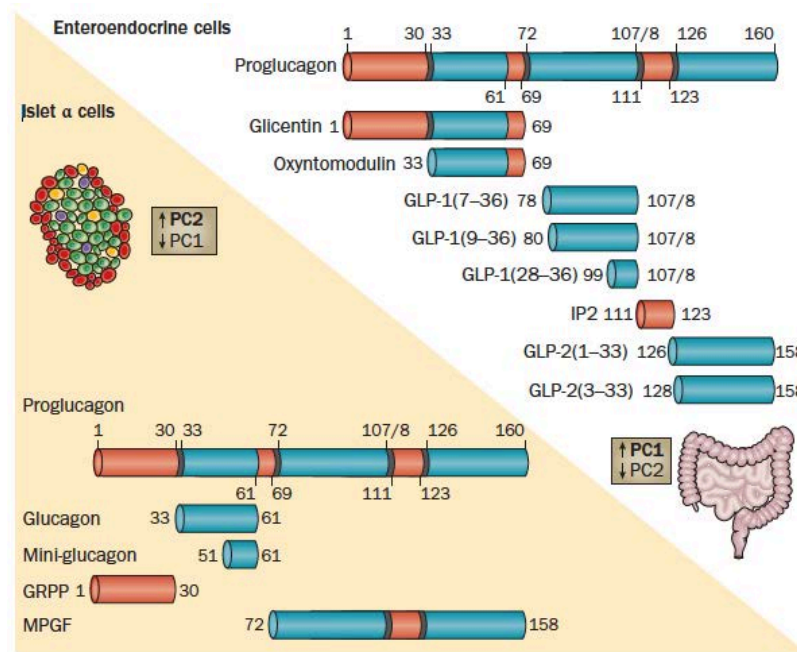


Figura 6-15: Quantificació del nombre de cèl·lules alfa. (a) Exemple representatiu d'una imatge d'immunofluorescència de cèl·lules alfa i beta d'illots pancreàtics. Seccions de pàncrees incloses en parafina es van tindre per glucagó (Cy2-verd), insulina (Cy3-roig), utilitzant anticossos específics vers aquests 2 antigens, i nucli (Hoechst-blau). (b) Percentatge de cèl·lules alfa individuals per àrea d'illot pancreàtic en ratolins NOD/SCID WT i HTZ ($n = 5$) de 5 setmanes d'edat (≥ 80 illots comptats per grup). Es va utilitzar la prova estadística Mann-Whitney.

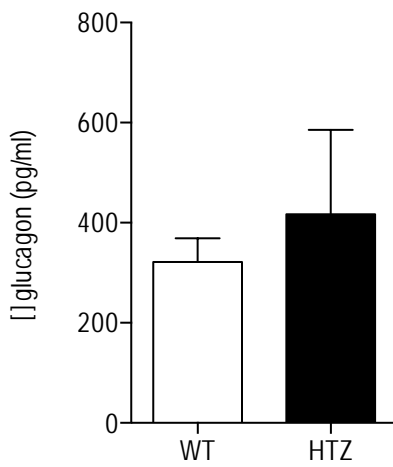
D'altra banda, les cèl·lules alfa dels ratolins HTZ podrien presentar una alteració en la secreció del glucagó. Per aquest motiu es van analitzar els sèrums obtinguts en l'IPGTT per mesurar els nivells de glucagó en sang en dejú i després d'un d'estímul de glucosa. Les hormones incretines són les hormones secretades a l'intestí involucrades en l'augment de la secreció de la insulina després de la ingestió de glucosa (Nauck, Homberger et al. 1986). El glucagó, la glicentina i l'oxintomodulina comparteixen seqüència d'aminoàcids (Figura 6-16a). Les 3 molècules se sintetitzen a partir del proglucagó i comparteixen els 29 aminoàcids de la seqüència del glucagó, però l'oxintomodulina té una extensió COOH-terminal i la glicentina té la mateixa extensió COOH-terminal a més a més d'una extensió NH₂-terminal (Holst 1980, Bataille, Tatemoto et al. 1982, Holst 2007). La glicentina i l'oxintomodulina són hormones incretines que se secreten a l'intestí quan hi ha una ingesta de menjar. L'oxintomodulina afavoreix la secreció d'insulina, mentre que la glicentina s'ha vist implicada en la secreció d'àcid gàstric (Unger, Ohneda et al. 1968, Kirkegaard, Moody et al. 1982, Baldissera, Holst et al. 1988, Cohen, Ellis et al. 2003). Després d'un IPGTT, la secreció d'insulina depèn altament de la secreció de les hormones incretines i de la seva acció (Faerch, Vaag et al. 2008). El kit d'ELISA Sigma-Aldrich per a la detecció del glucagó reconeix tant el glucagó com l'oxintomodulina, la glicentina i el proglucagó,

ja que l'anticòs de captura utilitzat va dirigit contra la regió central de la molècula de glucagó, la qual és compatible per aquestes 4 molècules. Com que l'estímul de glucosa s'havia injectat intraperitonealment i l'absorció intestinal de glucosa estimula la secreció de glicentina i oxintomodulina, aquest kit d'ELISA detectava les 3 molècules. A temps 0, just abans de la injecció de l'estímul de glucosa, feia 16 h que els ratolins estaven en dejú; per tant, la secreció de les cèl·lules L de l'intestí, encarregades de la secreció de glicentina i oxintomodulina, quedava reduïda a nivells basals, i s'estimulava la secreció de les cèl·lules alfa dels illots pancreàtics, de manera que l'estimació dels valors de glucagó seria la que predominava. De la mateixa manera, després de l'estímul de glucosa, se suprimia la secreció de les cèl·lules alfa i s'estimulava la secreció de les cèl·lules L de l'intestí, i l'estimació dels valors de glicentina i oxintomodulina predominava en l'ELISA. Si es duqués a terme un test intravenós de tolerància a la glucosa, la glicentina i l'oxintomodulina no es veurien estimulades i, consegüentment, mesurariem únicament glucagó en sang. No obstant això, els IPGTT són més fisiològics que els intravenosos, gràcies a l'efecte de les incretines (Cobelli, Toffolo et al. 2007). En la Figura 6-16b es pot observar que, en dejú, tant els ratolins WT com els HTZ presentaven uns nivells de glucagó similars. En la Figura 6-16c es pot observar la resposta de glicentina i oxintomodulina durant l'IPGTT a 60 i 120 min. Cal destacar que no hi havia diferències estadístiques entre els nivells de glicentina i oxintomodulina secretats pels ratolins WT i HTZ. En conclusió, tot i expressar nivells d'mRNA de glucagó en illots més baixos i tenir menys illots pancreàtics, quan els nivells de glucosa en sang són baixos, perquè els ratolins han estat privats de menjar durant 16 h, la glucagonèmia dels ratolins HTZ no es veia alterada.

a



b



c

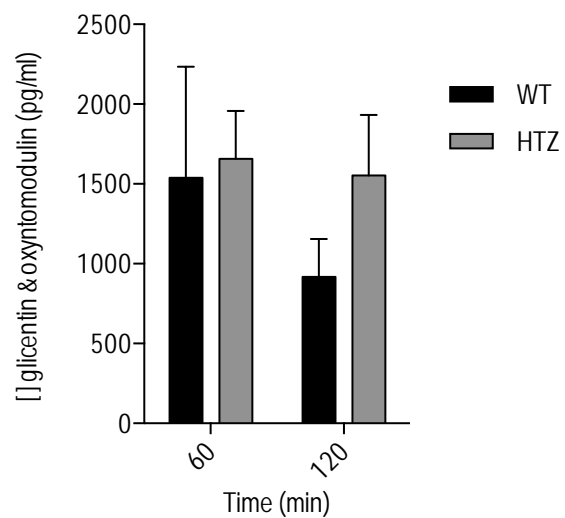


Figura 6-16: Concentració de glucagó, glicentina i oxintomodulina en sèrum de ratolins sotmesos a una IPGTT. (a) Peptidus derivats del proglucagó alliberats al pàncrees i tracte gastrointestinal (Campbell and Drucker 2015). (b) Concentració de glucagó pancreàtic en sèrum de ratolins WT i HTZ privats de menjar durant 16 h. (c) Concentració de glicentina + oxintomodulina en sèrum de ratolins WT i HTZ després de 60 i 120 min postestímul de glucosa intraperitoneal. Es van utilitzar ratolins NOD CDK11 WT i HTZ ($n = 3$) de 10 setmanes d'edat per als estudis de glucagó a temps 0 min, i de 4 a 7 ratolins en els diferents grups experimentals dels estudis de glicentina i oxintomodulina. Se'n van analitzar les dades mitjançant la prova estadística Mann-Whitney (b) i ANOVA bidireccional (c).

Els kits d'ELISA de detecció de glucagó tenen especificitats baixes, ja que interaccionen amb la glicentina i l'oxintomodulina. Per tal d'obtenir informació més específica s'haurien d'utilitzar anticossos que reaccionin exclusivament amb la regió COOH-terminal del glucagó. Aquests anticossos no reaccionarien contra la glicentina i l'oxintomodulina i, per tant, només mesurarien glucagó pancreàtic (Holst 1983). Aquests kits que detecten la part C-terminal de la molècula de glucagó igualment poden detectar formes truncades del glucagó o allargades per la part N-terminal. Per això s'ha vist que els kits més precisos són els ELISA en Sandwich que utilitzen la combinació d'anticossos contra la part N-terminal no modificada i la C-terminal. No obstant això, els kits ELISA en Sandwich que hi ha ara al mercat mostren, ni que sigui en poca quantitat, reactivitat creuada amb la glicentina (<2%) i l'oxintomodulina (<5%) (Wewer Albrechtsen, Hartmann et al. 2014). Tot i així, els valors obtinguts mitjançant el kit ELISA de Sigma-Aldrich són raonables, si es mesura glucagó en dejú i oxintomodulina–glicentina després d'un estímul de glucosa.

6.3.10 Els nivells d'expressió de GLUT-2 i GLUT-4 no es veuen afectats per l'hemideficiència en CDK11

GLUT-2 és un transportador de glucosa expressat majoritàriament en cèl·lules beta dins de l'illot, i està involucrat en el transport de glucosa de baixa afinitat i alta capacitat (Ahren 2009). Es van analitzar els nivells d'expressió de GLUT-2 a les cèl·lules beta pancreàtiques de ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ de 6 a 8 setmanes d'edat (Figura 6-17a-d). Com es pot observar en la Figura 6-17e, els nivells d'expressió de GLUT-2 no es veien alterats en ratolins HTZ.

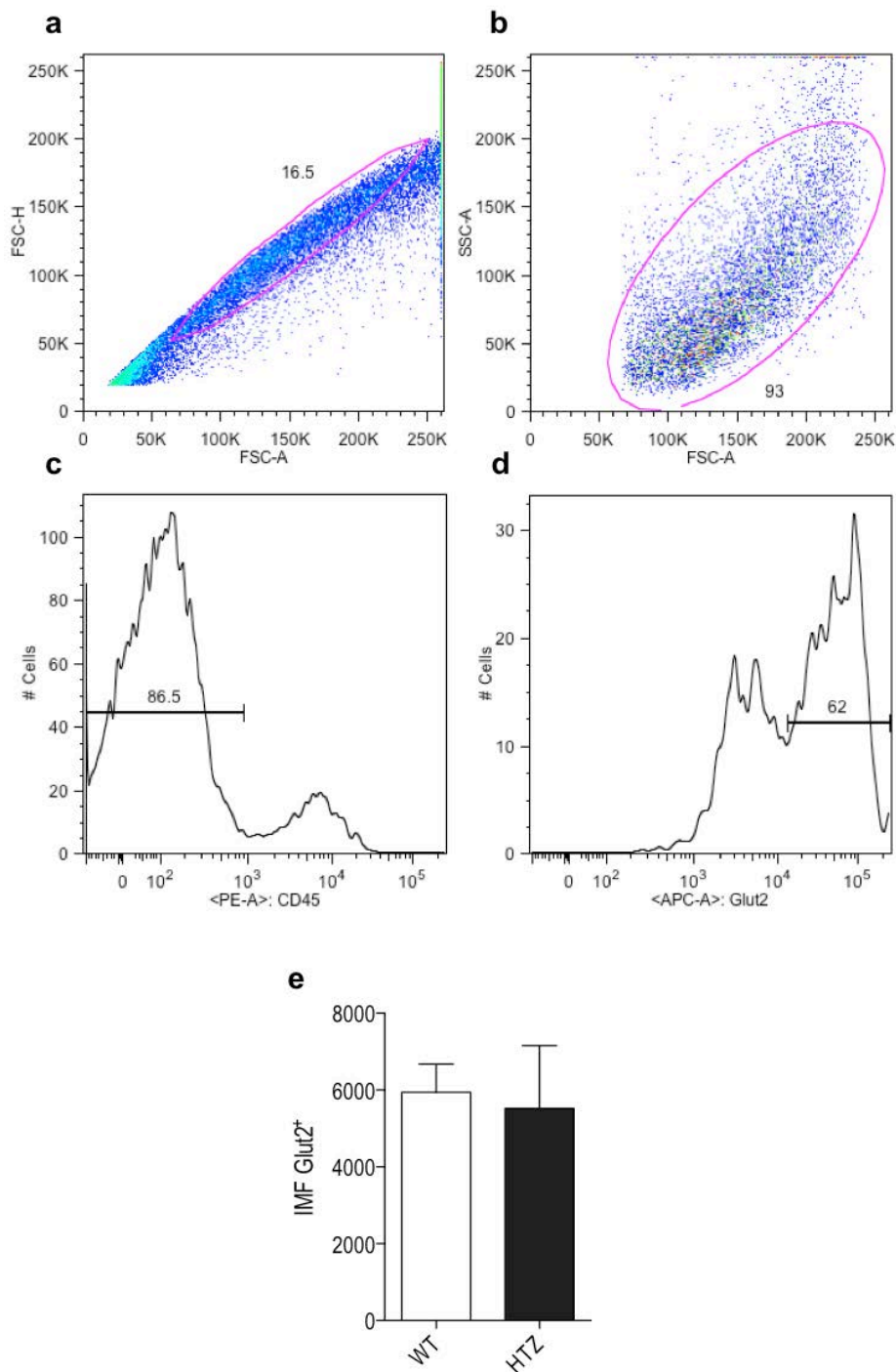


Figura 6-17: Intensitat mitjana de fluorescència (IMF) de GLUT-2 en les cèl·lules beta pancreàtiques de ratolins HTZ vs. WT. Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que conté les cèl·lules GLUT-2+. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant; tot seguit (c), se'n van excloure les cèl·lules hematopoètiques (CD45⁺), i (d) només es van seleccionar les cèl·lules beta (CD45⁻Glut2⁺). (e) Gràfica representativa de la intensitat mitjana de fluorescència de GLUT-2 en cèl·lules beta de ratolins NOD/SCID CDK11 WT (n = 12) i HTZ (n = 13) de 6 a 8 setmanes d'edat. Es van dur a terme 3 experiments independents. Els ratolins estaven alimentats a l'hora d'extreure els illots pancreàtics. Se'n van analitzar les dades mitjançant la prova estadística Mann-Whitney.

A més a més, es va estudiar els nivells d'expressió de GLUT-4 en membranes de teixit adipós blanc i múscul. En condicions basals, GLUT-4 està segrestat en vesícules intracel·lulars, tant en múscul com en cèl·lules de teixit adipós blanc. La insulina indueix un ràpid increment de l'absorció de la glucosa, la qual cosa afavoreix la redistribució de GLUT-4 a les membranes plasmàtiques, on facilita el transport de glucosa (Cushman and Wardzala 1980, Suzuki and Kono 1980). Es van utilitzar ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 10 setmanes d'edat, per tal d'aïllar les proteïnes totals de membranes del múscul (soli i gastrocnemi) i del teixit adipós blanc renal (WAT). Seguidament es va analitzar l'expressió de GLUT-4 mitjançant *Western blot* (Figura 6-18a). Com es pot observar en la Figura 6-18b no hi havia diferències en el nivell d'expressió de GLUT-4 en teixit muscular, ni en teixit adipós (Figura 6-18c), si es compara els ratolins HTZ amb els WT. Per tant, la CDK11 no modificava l'expressió de GLUT-4 als teixits perifèrics.

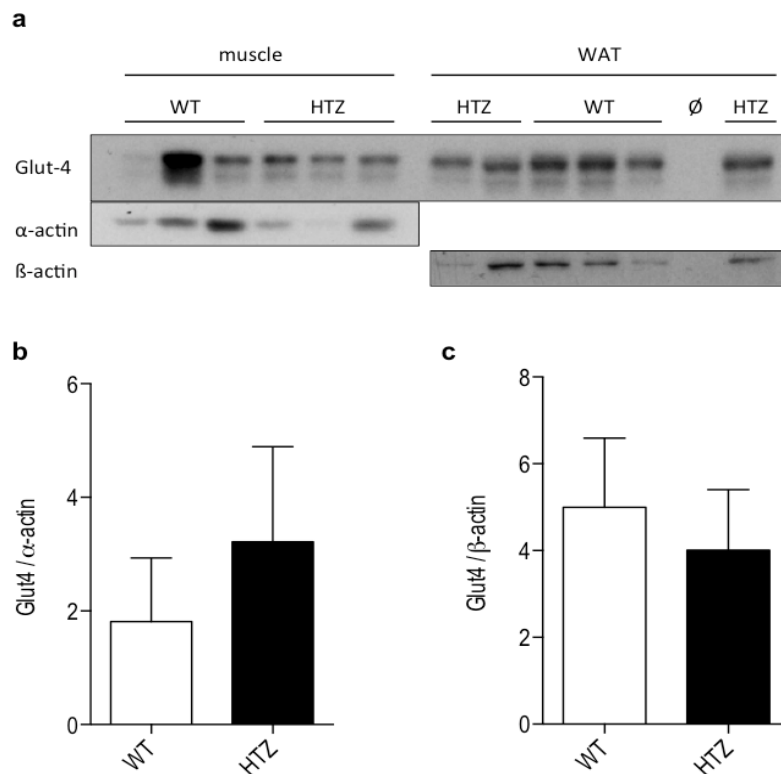


Figura 6-18: Nivells d'expressió de GLUT-4 en membrana de múscul i teixit adipós blanc. (a) Detecció per Western blot de GLUT-4, α -actina i β -actina dels diferents replicats per a cada genotip i teixit. La quantificació dels resultats compilats es va dur a terme analitzant la densitometria de GLUT-4 normalitzat amb la α -actina en el cas del múscul, i amb β -actina en el cas de WAT. (b) Representació de les dades obtingues per al múscul i (c) per a WAT. Es van utilitzar ratolins NOD CDK11 WT i HTZ ($n = 3$) de 10 setmanes d'edat. Se'n van analitzar les dades mitjançant la prova estadística t paramètrica.

En conclusió, el conjunt de la fisiologia de l'illot pancreàtic no sembla que estigui alterat per l'hemidelecció de la CDK11.

6.3.11 L'hemideficiència en CDK11 no és suficient per causar diabetis

Es va estudiar la importància de la infiltració limfocítica en el desenvolupament de la diabetis en els ratolins HTZ. Per poder discriminar entre l'efecte de l'hemidelecció de la CDK11 en el repertori immunològic i en la cèl·lula beta es va introduir l'hemidelecció de la CDK11 en els ratolins NOD/SCID, ja que aquests són deficients en limfòcits T i B. Es va estudiar l'acumulació de diabetis espontània (Figura 6-19). Cap dels 2 genotips no va desenvolupar diabetis durant les 30 setmanes estudiades, la qual cosa indica que l'hemideficiència de CDK11 per se a la cèl·lula

beta no era suficient per causar insulinoènia, i que el sistema immunitari restant dels ratolins NOD/SCID CDK11 (macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules NK, majoritàriament) no era capaç de causar la malaltia en absència de limfòcits. L'acció dels limfòcits era necessària per induir la mort cel·lular a la cèl·lula beta i desencadenar la malaltia.

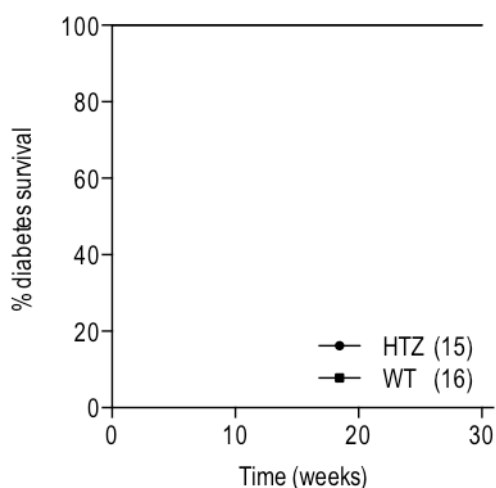


Figura 6-19: L'hemideficiència de CDK11 a la cèl·lula beta no és suficient per desencadenar diabetis mellitus. Percentatge de supervivència a la diabetis en ratolins NOD/SCID WT i HTZ. El nombre de ratolins utilitzats està marcat entre parèntesis. Es va utilitzar la prova estadística de log-rang.

6.3.12 Els ratolins HTZ no presenten alteracions en les poblacions de la infiltració limfocítica

La deleció parcial de la CDK11 retarda la incidència de diabetis. No obstant això, els limfòcits són necessaris i tenen un paper important en el desenvolupament de la malaltia; per aquest motiu es va continuar estudiant la deleció parcial de la CDK11 en el comportament dels limfòcits. Primerament, es va estudiar si la deleció parcial de la CDK11 afectava el desenvolupament dels limfòcits i de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC), com ara els macròfags i les cèl·lules dendrítiques. Es va analitzar la població de limfòcits (Figura 6-20a-d) i APC (Figura 6-21a-c) de la melsa i dels ganglis limfàtics de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat, mitjançant citometria de flux. En cap cas no van trobar-se diferències significatives en les poblacions de limfòcits de la melsa (Figura 6-20e) i els ganglis limfàtics pancreàtics (Figura 6-20f) entre els 2

genotips estudiats. Igualment, tampoc no hi havia diferències significatives en les poblacions de cèl·lules dendrítiques i macròfags de la melsa (Figura 6-21d) i els ganglis limfàtics (Figura 6-21e) entre els 2 genotips estudiats. Per tant, la deleció parcial de la CDK11 no afectava significativament el repertori immunològic de limfòcits i APC.

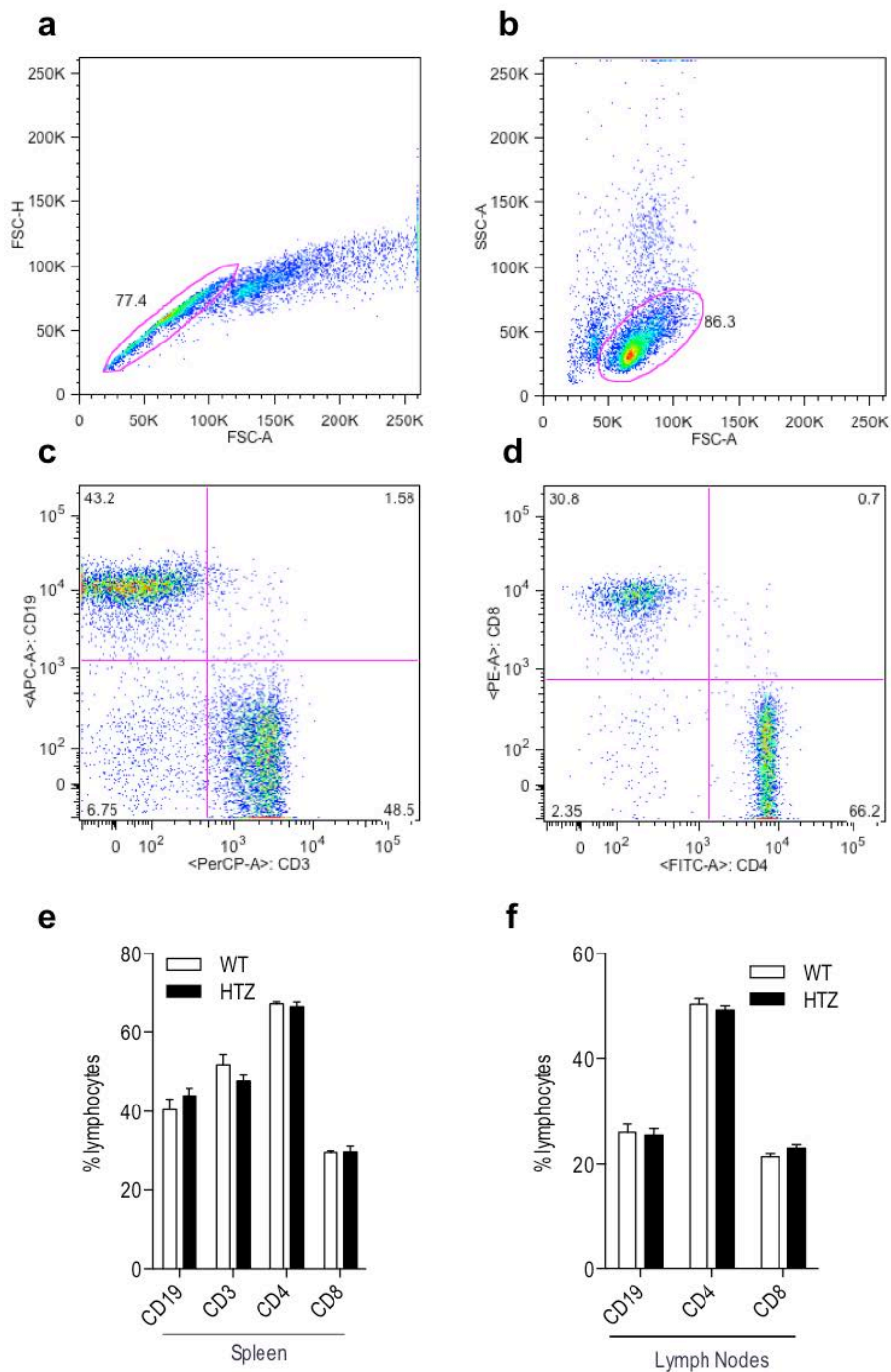


Figura 6-20: Estudi comparatiu de les subpoblacions limfocitàries en melsa i ganglis limfàtics dels ratolins NOD HTZ i NOD WT. Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que contenia els limfòcits. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant; tot seguit (c), es van seleccionar els limfòcits B (CD19⁺) i els limfòcits T (CD3⁺). (d) La fracció cel·lular (CD3⁺) es va subdividir en limfòcits T CD4 (CD3⁺CD4⁺) i T CD8 (CD3⁺CD8⁺). (e) Percentatge dels diferents tipus cel·lulars dels 2 genotips estudiats en la melsa, i (f) en els ganglis limfàtics pancreàtics. Es van utilitzar ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat per tal d'estudiar les poblacions de la melsa (n = 5) i dels ganglis limfàtics (n = 3). Es va utilitzar la prova estadística ANOVA bidireccional.

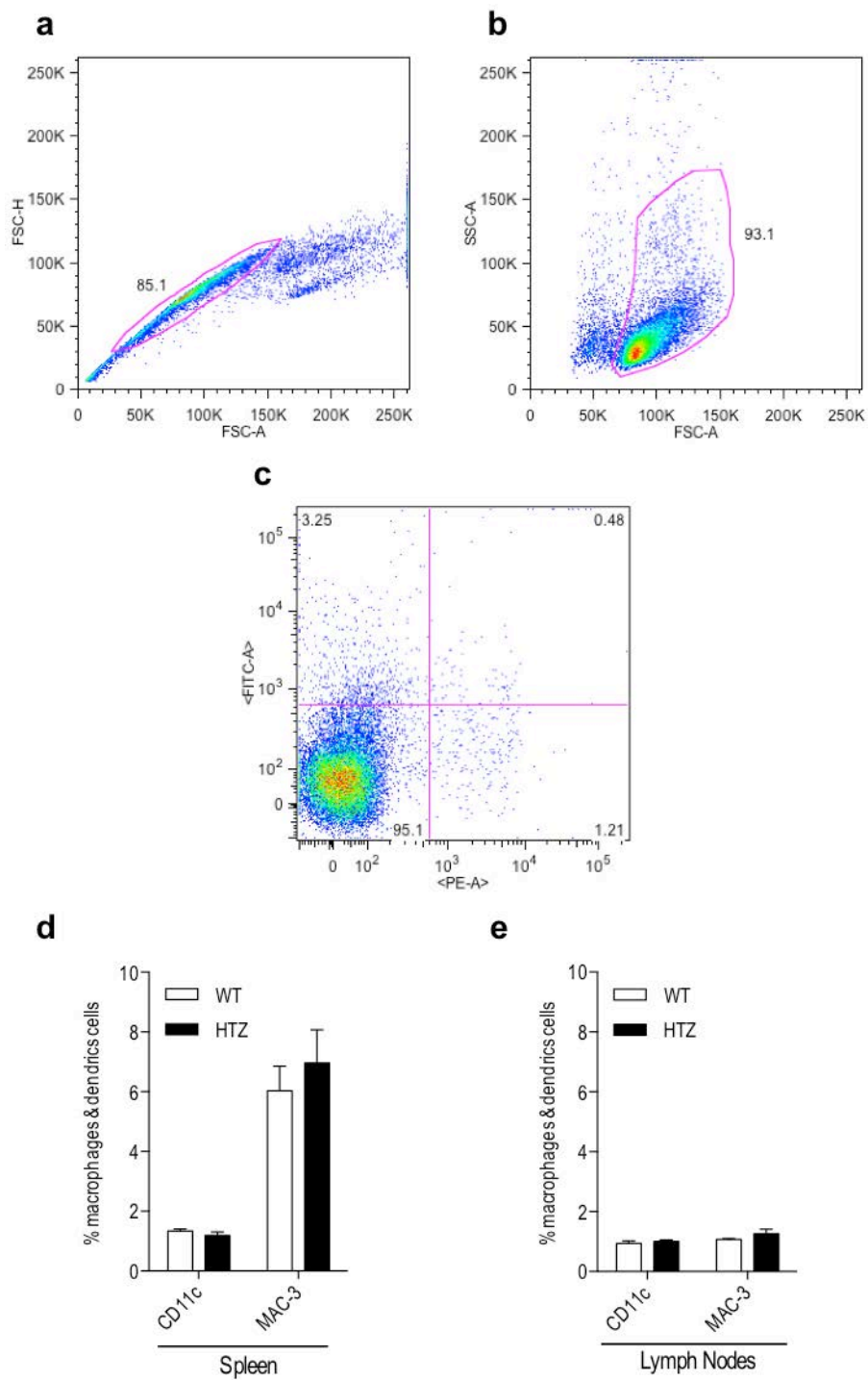


Figura 6-21: Anàlisi de les diferents subpoblacions d'APC en els ratolins NOD HTZ i NOD WT en melsa i ganglis limfàtics regionals. Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que contenia les APC. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant; tot seguit (c), es van seleccionar les regions de macròfags activats (MAC3-FITC⁺) i cèl·lules dendrítiques (CD11c-PE⁺). (d) Percentatge dels diferents tipus cel·lulars dels 2 genotips estudiats en la melsa, i (e) en els ganglis limfàtics pancreàtics. Es van utilitzar ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat per tal d'estudiar les poblacions de la melsa (n = 5) i dels ganglis limfàtics (n = 3). Es va utilitzar la prova estadística ANOVA bidireccional.

6.3.13 Susceptibilitat a la diabetis induïda per transferència adoptiva de limfòcits provinents de melsa

Es va estudiar si la deleció parcial de la CDK11 protegia els ratolins NOD/SCID HTZ de la diabetis causada pel repertori immune NOD salvatge (WT), i es reduïa la infiltració dels limfòcits als illots pancreàtics. Es van transferir de manera adoptiva cèl·lules totals de la melsa de femelles NOD WT prediabètiques (8–12 setmanes d'edat) a ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ. Vam observar que els ratolins NOD/SCID CDK11 HTZ eren més propensos a desenvolupar diabetis quan eren exposats al mateix repertori de limfòcits que els germans de ventrada NOD/SCID WT (Figura 6-22a). Els ratolins HTZ començaven a desenvolupar diabetis 5 setmanes després de la transferència, i a la setmana 12 el 100% dels ratolins ja havia desenvolupat la malaltia. En canvi, els ratolins WT no desenvolupaven la diabetis abans de la setmana 6, i fins a la setmana 14 no s'assolia una incidència acumulativa del 100%. Els illots dels ratolins HTZ eren menys resistents a l'atac autoimmune, possiblement perquè el nombre d'illots dels ratolins HTZ estava disminuït. També es va avaluar la capacitat diabetogènica dels limfòcits provinents dels ratolins HTZ. Per tal d'estudiar si els limfòcits eren funcionals o estaven alterats, es va fer una transferència adoptiva de cèl·lules de melsa total derivades de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 9 setmanes d'edat a ratolins NOD/SCID WT (Figura 6-22b). Els limfòcits derivats dels ratolins HTZ eren funcionals, ja que tots els ratolins transferits van desenvolupar diabetis i, a més a més, la capacitat diabetogènica dels limfòcits HTZ estava incrementada respecte dels WT. A la setmana 5 després de la transferència, els ratolins receptors de limfòcits HTZ van començar a desenvolupar la malaltia, i a les 11 setmanes el 100% ja eren diabètics. En canvi, els ratolins receptors de limfòcits WT no van desenvolupar T1D abans de la setmana 9, i fins a la setmana 16 posttransferència no hi havia un 100% de receptors diabètics.

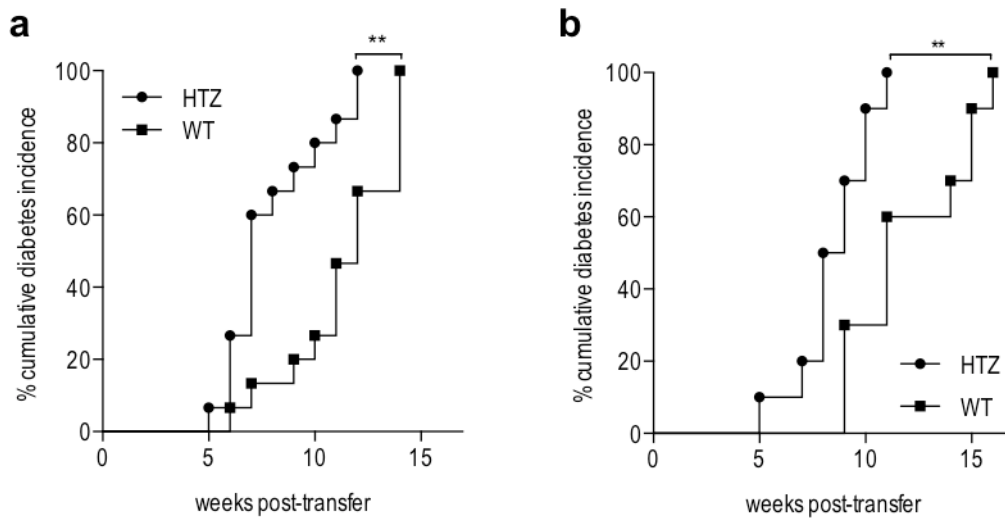


Figura 6-22: Diabetogenicitat i susceptibilitat a la diabetis transferida adoptivament en la deficiència parcial de CDK11. (a) Van transferir-se ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ ($n = 15$) amb 10 milions de cèl·lules de melsa total derivades de femelles NOD de 8 a 12 setmanes d'edat, i es va estudiar la incidència de diabetis acumulativa durant 17 setmanes després de la transferència. (b) Van transferir-se ratolins NOD/SCID CDK11 WT ($n = 10$) amb 10 milions de cèl·lules de melsa total derivades de femelles NOD CDK11 WT o HTZ de 9 setmanes d'edat, i es va estudiar la incidència de diabetis acumulativa durant 17 setmanes després de la transferència. Es va utilitzar la prova estadística de log-rang.

Per tal de poder explicar l'aparent discrepància entre la història natural de la diabetis espontània i la diabetogenicitat incrementada dels leucòcits derivats de la melsa de NOD HTZ comparada amb la dels companys de ventrada NOD WT, va repetir-se la segona transferència adoptiva, però per comprovar el fenotip de les cèl·lules transferides, 7 setmanes posttransferència, es van sacrificar els animals. Per tal de determinar si hi havia un reclutament de limfòcits augmentat en el genotip NOD HTZ, es va estudiar l'expressió de CCR7 en els limfòcits de la melsa dels ratolins transferits, així com també es van fer estudis d'infiltració pancreàtica (Figura 6-23a-d). El CCR7 és un receptor que s'expressa en limfòcits B, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules T memòria i naïfs. És important en la mobilització de cèl·lules immunes i en el seu reclutament als òrgans limfoides secundaris, com ara els ganglis limfàtics (Ebert, Schaeferli et al. 2005). Al cap de 7 setmanes posttransferència, la proporció de limfòcits transferits que expressaven CCR7 era la mateixa entre els 2 genotips estudiats (Figura 6-23e). No obstant això, la intensitat mitjana de fluorescència (MFI) del CCR7 expressat pels limfòcits B transferits de donants NOD CDK11 HTZ era més elevada que la dels donants WT ($64,89 \pm 4,19$ vs. $46,88 \pm 1,27$, respectivament), la qual cosa significa que expressaven més molècules de CCR7 en la seva superfície i, per tant, que estaven més activats. Els limfòcits T transferits presentaven un percentatge similar d'MFI de CCR7 (Figura 6-23f). La Figura 6-23g mostra la puntuació d'infiltració dels pàncrees dels ratolins

NOD/SCID receptors de les transferències. Com es pot observar, no hi ha diferències en la infiltració dels 2 grups experimentals estudiats. Per tant, podem concloure que els limfòcits B provinents dels ratolins donants HTZ estaven més activats, ja que expressaven més CCR7, i com a conseqüència, els ratolins receptors desenvolupaven la malaltia més aviat que els seus companys WT.

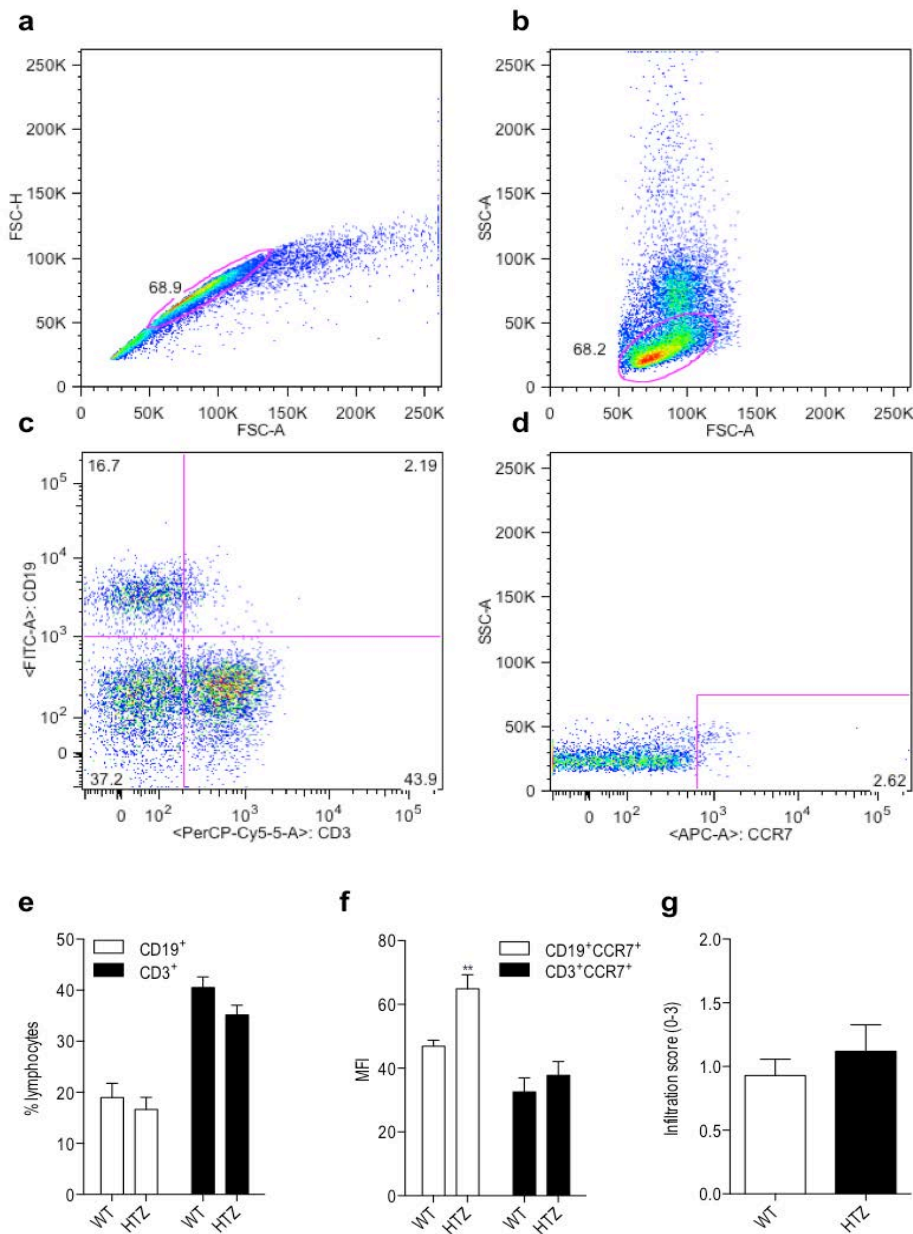


Figura 6-23: Caracterització de les subpoblacions de limfòcits B i T activats després de la transferència adoptiva. Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que conté els limfòcits activats. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant; tot seguit (c), es van seleccionar les regions de limfòcits B (CD19⁺CD3⁻) i T (CD19⁻CD3⁺). (d) De les fraccions cel·lulars B i T, es van tenir en compte les cèl·lules activades CCR7⁺ (CD19⁺CD3⁻CCR7⁺, CD3⁺CD19⁻CCR7⁺). (e) Percentatge de limfòcits provinents de la melsa dels 2 genotips estudiats, i (f) intensitat mitjana de fluorescència (MFI) del CCR7 que expressen aquests limfòcits. (g) Puntuació d'infiltració dels pàncrees dels ratolins receptors. Es van assignar uns valors: 0 per a illots no infiltrats, 1 per a lesions periinsulítiques, 2 per a insulitis intransulars amb menys del 50% de l'àrea de l'illot infiltrada, i 3 per a insulitis amb més del 50% de l'àrea de l'illot infiltrada. Per tal d'estudiar la infiltració pancreàtica, es va examinar un mínim de 8 seccions per ratolí a 4 nivells diferents (>180 illots per ratolí). Es van transferir de manera adoptiva ratolins NOD/SCID CDK11 WT ($n = 9$) amb 10 milions de leucòcits de melsa derivats de femelles NOD CDK11 WT i HTZ de 9 setmanes d'edat, i es va estudiar l'activació dels limfòcits al cap de 7 setmanes posttransferència. Es va utilitzar la prova estadística ANOVA bidireccional (e i f) i la t paramètrica (g).

6.3.14 Els limfòcits provinents de melsa de ratolins HTZ tenen l'apoptosi induïda després d'estímul (AICD) augmentada i la secreció d'IL-2 disminuïda amb la capacitat de proliferació inalterada

Per tal d'estudiar amb més profunditat l'autoreactivitat accentuada dels limfòcits dels ratolins HTZ, es va explorar el comportament d'aquests limfòcits en presència de diferents estímuls *in vitro*; d'aquesta manera es podia estudiar si la reducció de la CDK11 modulava la proliferació i apoptosi de la infiltració limfocítica. Es van agafar cèl·lules de melsa total de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat i es va cultivar 1 milió de cèl·lules per pou en plaques de 12 pous. Seguidament es van incubar amb els diferents estímuls policlonals (concanavalina A o anti-CD3) per estimular la proliferació cel·lular i es va analitzar la susceptibilitat de les cèl·lules de melsa total a l'apoptosi induïda al cap de 24 h postestímul, mitjançant citometria de flux (Figura 6-24a-c). En la Figura 6-24d es pot veure que tant l'apoptosi basal dels limfòcits 24 h després de plaquejar-los com la induïda per activació amb ConA eren similars en ratolins WT i HTZ. La Figura 6-24e mostra les mateixes dades que la Figura 6-24d, però representant l'increment d'apoptosi (apoptosi ConA – apoptosi basal) per a cada ratolí. La concanavalina A induïa una resposta molt accentuada d'apoptosi cel·lular a les 24 h postestímul, la qual cosa significa que quedaven molt poques cèl·lules per estudiar la proliferació cel·lular. És per aquest motiu que es va provar l'estímul anti-CD3 i es va trobar que l'apoptosi induïda per aquest estímul era més baixa que la induïda per ConA (Figura 6-24f) ($36,26 \pm 0,78$, WT vs. $41,04 \pm 0,56$, HTZ). La Figura 6-24g torna a mostrar les mateixes dades que la Figura 6-24f, però representant l'increment d'apoptosi (apoptosi anti-CD3 – apoptosi basal). Les cèl·lules de melsa total derivades dels ratolins HTZ, tot i mantenir una apoptosi basal no alterada, tenen una apoptosi induïda per estímul anti-CD3 més elevada que les derivades de ratolins WT.

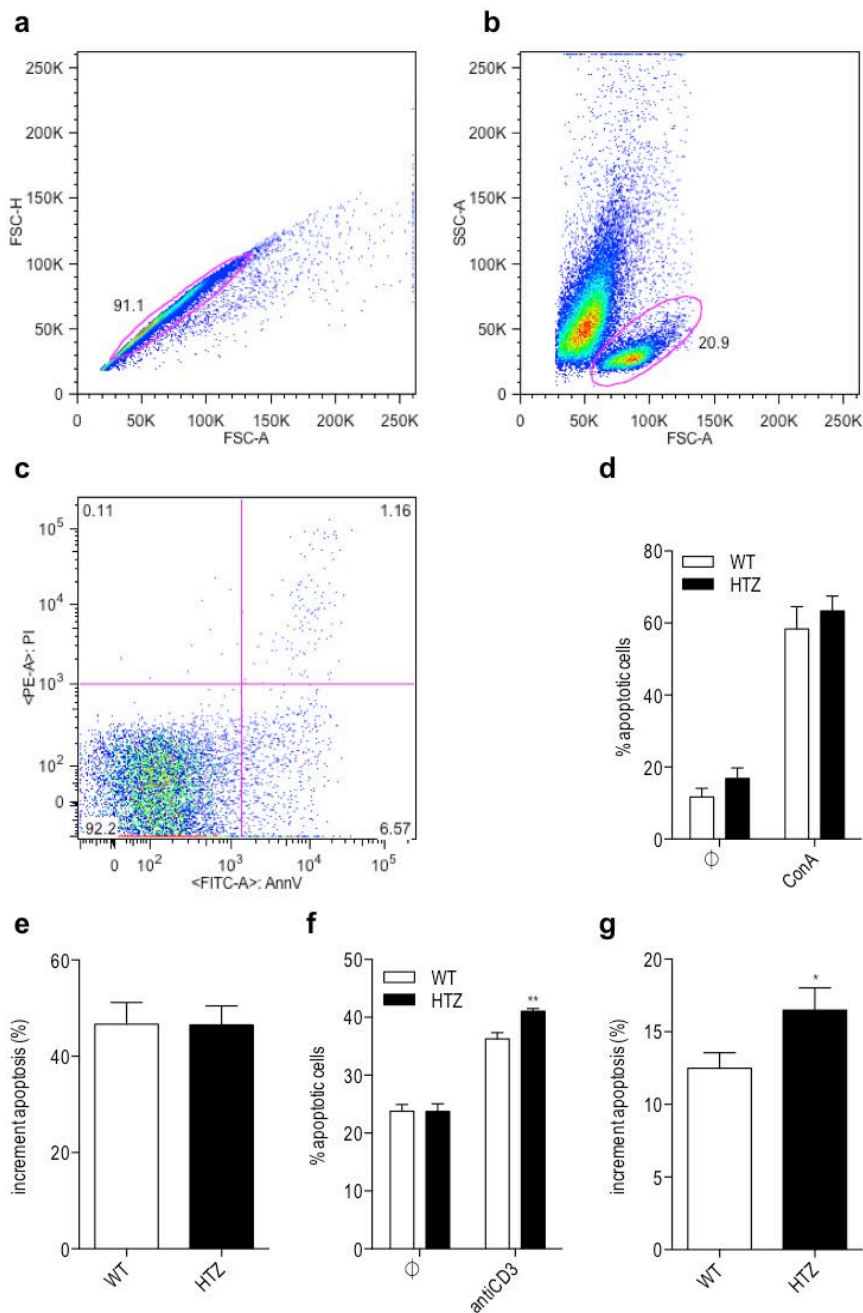


Figura 6-24: Apoptosi induïda a partir d'estímuls. Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que conté els limfòcits apoptòtics. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant, i tot seguit (c), es va delimitar la regió de limfòcits apoptòtics (PI-AnnV⁺). (d) Percentatge de cèl·lules apoptòtiques (PI-AnnV⁺) 24 h després de cultivar-les amb estímul de concanavalina A o sense. (e) Increment d'apoptosi en les cèl·lules que han rebut ConA. Per calcular l'increment d'apoptosi, es va restar l'apoptosi basal a l'apoptosi induïda per estímul de ConA per a cada ratolí. (f) Percentatge de cèl·lules apoptòtiques (PI-AnnV⁺) 24 h després de cultivar-les amb estímul d'anti-CD3 o sense. (g) Increment d'apoptosi en les cèl·lules que han rebut un estímul d'anti-CD3. Es van dur a terme 3 experiments independents per cada grup experimental i es van analitzar ratolins WT ($n = 7$) i HTZ ($n = 9$) per als estudis de ConA i ($n = 9$) per als estudis amb anti-CD3. La concentració final de l'anticòs anti-CD3 és d'1 $\mu\text{g/mL}$ i de ConA és de 0,003 $\mu\text{g/mL}$. ϕ , sense estímul; ConA, concanavalina A. Es va utilitzar la prova estadística ANOVA bidireccional (d i f) i t paramètrica (e i g).

De la mateixa manera, es van utilitzar cèl·lules de melsa total de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat i es va cultivar 1 milió de cèl·lules per pou en plaques de 12 pous. Seguidament es van incubar amb l'estímul anti-CD3, per estimular la proliferació cel·lular, i es va analitzar la secreció de citocines mitjançant ELISA, al cap de 48 h postestímul (Figura 6-25). S'ha demostrat que les citocines Th1, com ara IFN γ o IL-2, estan involucrades en la destrucció dels illots i amb l'aparició de la diabetis en els ratolins NOD. La IL-2 és una citocina important per a l'activació de les cèl·lules T i la seva funció immune. Serveix com a factor de creixement autocrí i paracrí dels limfòcits. No obstant això, tot i les evidències de la participació de la IL-2 en l'activació cel·lular, la seva funció fisiològica dominant és la de controlar l'activació de les cèl·lules T i prevenir l'autoimmunitat (Knoechel, Lohr et al. 2005). A més a més, l'IFN γ és necessari per a la inducció i activació de les cèl·lules T, NK i macròfags (Novelli, Giovarelli et al. 1991), però també està implicat en la mort cel·lular (Liu and Janeway 1990). L'IFN γ sensibilitza les cèl·lules beta en l'apoptosi i indueix la secreció de quimiocines resultant amb el reclutament constant de cèl·lules T autoreactives (Frigerio, Junt et al. 2002). Tant en la Figura 6-25a com en la Figura 6-25b es representa l'increment de secreció de citocines (concentració amb anti-CD3 – concentració basal sense estímul) 48 h després de cultivar-les. La Figura 6-25a mostra que l'increment de secreció d'IL-2 està disminuït en els sobrenedants dels medis de cultiu de limfòcits provinents dels ratolins HTZ ($47,70 \pm 5,244$, WT vs. $26,22 \pm 3,079$, HTZ). Pel que fa a l'increment de secreció d'IFN γ , no hi ha diferències significatives entre els 2 genotips estudiats (Figura 6-25b). *In vitro*, els limfòcits provinents de melsa de ratolins HTZ, secreten menys IL-2; possiblement per això els limfòcits mostren un fenotip més agressiu a la transferència adoptiva.

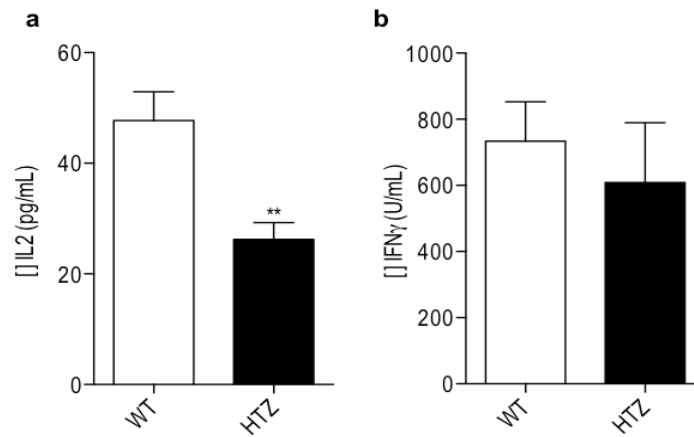


Figura 6-25: Secreció de citocines Th1 per leucòcits de melsa. (a) Increment de la concentració d'IL-2 i (b) d'IFN γ secretades 48 h postestímul en el sobrenedant del medi de cultiu de limfòcits derivats de la melsa de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ (n = 7-8). L'estímul utilitzat va ser anti-CD3 i les citocines es van analitzar mitjançant ELISA. L'increment de concentració es va calcular restant el valor basal de secreció sense estímul al valor de secreció una vegada afegit l'estímul. Es va utilitzar la prova estadística t paramètrica.

Per tal de continuar analitzant les possibles raons responsables de la capacitat diabetogènica diferencial dels leucòcits de melsa de ratolins NOD HTZ i NOD WT, va estudiar-se l'activitat proliferativa de les cèl·lules T dels ratolins HTZ, *in vitro*. El pigment fluorescent *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) és altament usat per tal d'estudiar proliferació cel·lular, ja que es dispersa passivament a l'interior cel·lular. No té color ni fluorescència fins que se'n tallen els grups acetats, gràcies a les esterases intracel·lulars, la qual cosa dona una fluorescència molt accentuada. Els grups succinimidil ester reaccionen amb les amines intracel·lulars, i formen conjugats fluorescents que queden ben retinguts i que es poden fixar amb fixatius aldehids. L'excés de reactiu no conjugat i els seus productes derivats es dispersen de manera passiva a l'espai extracel·lular. Es van aïllar cèl·lules de melsa total de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat, es van tenyir amb CFSE i es va cultivar 1 milió de cèl·lules per pou en plaques de 12 pous. Seguidament es van incubar amb anti-CD3 per estimular la proliferació cel·lular a través del receptor de les cèl·lules T, i es van analitzar les cèl·lules mitjançant citometria de flux al cap de 72 h postestímul (Figura 6-26a-e). La proliferació basal (Figura 6-26f) dels limfòcits després de 72 h sense estímul no dona diferències significatives entre els 2 genotips estudiats. La Figura 6-26g mostra l'increment de proliferació dels limfòcits 72 h postestímul (proliferació anti-CD3 – proliferació basal). Els limfòcits T CD4 tenen l'increment de la proliferació més alt, mentre que els T CD8 proliferen menys, i els limfòcits

B gairebé no tenen increment de la proliferació. Les cèl·lules totals de melsa aïllades dels ratolins HTZ i WT manifesten una capacitat de proliferació similar sota estimulació amb anti-CD3, la qual cosa indica que la resposta dels limfòcits a estimuladors mitògens no específics es conserva i no està alterada en els ratolins HTZ.

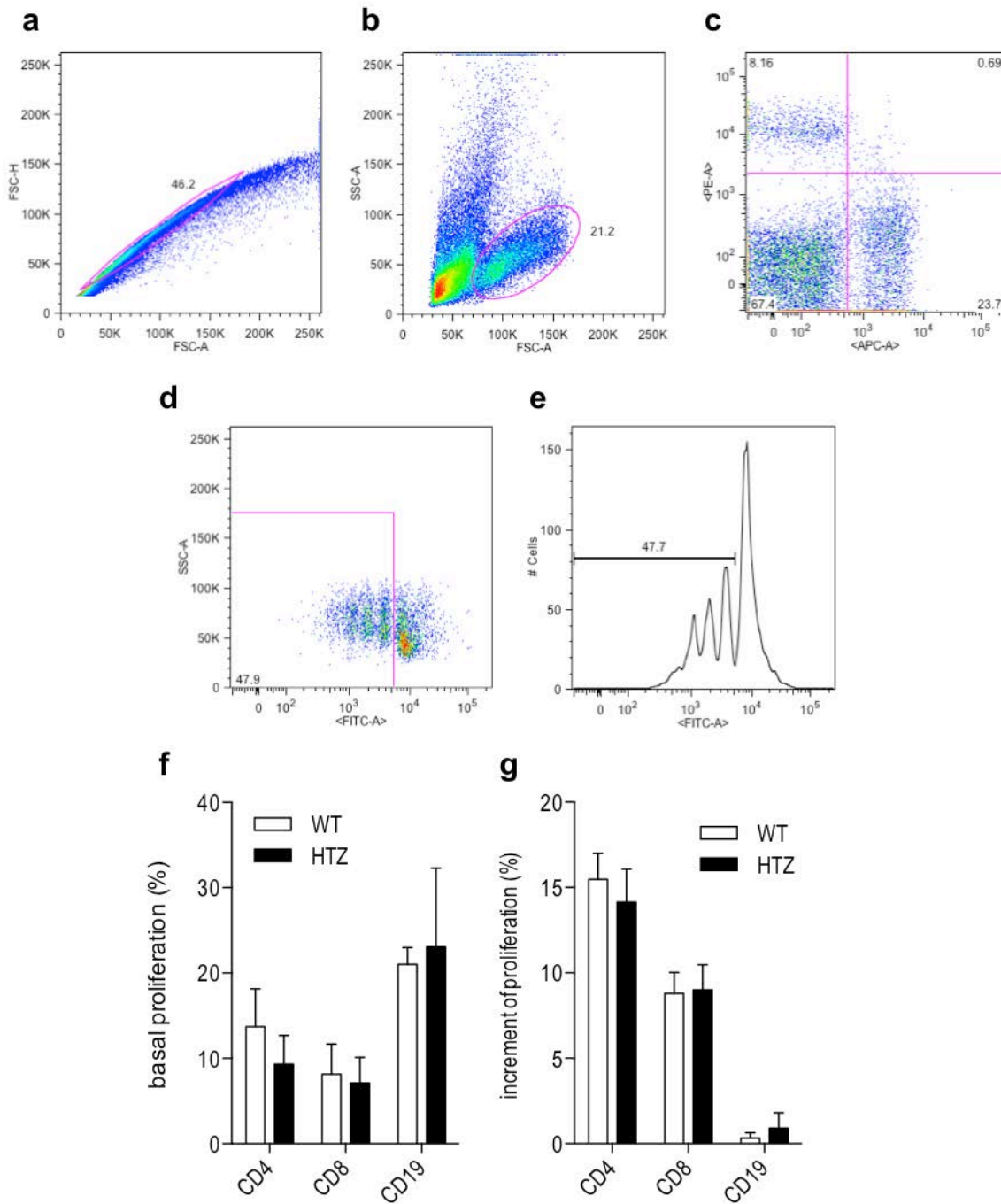


Figura 6-26: Activitat proliferativa dels limfòcits T *in vitro* induïda a partir d'estímul anti-CD3. Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que conté els limfòcits en proliferació. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant, i tot seguit (c), es va subdividir aquesta regió en limfòcits T CD4 (APC+PE-) i T CD8 (PE+APC-). (d i e) De les fraccions cel·lulars T CD4 i T CD8, es van tenir en compte les cèl·lules que havien proliferat FITC- (CD4+CD8-CFSE-, CD8+CD4-CFSE-), APC-CD4, PE-CD8, FITC-CFSE. (f) Proliferació basal. Percentatge de cèl·lules en proliferació (CFSE-) 72 h després de cultivar-les sense estímul d'anti-CD3. (g) Increment de proliferació en les cèl·lules que han rebut anti-CD3. Per calcular l'increment de proliferació, es va restar la proliferació basal a la proliferació induïda per estímul d'anti-CD3 per a cada ratolí. Es van utilitzar ratolins NOD CDK11 WT i HTZ ($n = 10-12$) de 7 setmanes d'edat. Se'n van analitzar les dades mitjançant la prova estadística ANOVA bidireccional.

En conclusió, la major capacitat diabetogènica dels limfòcits provinents de melsa de ratolins HTZ no es veu accentuada per una major capacitat proliferativa o menys apoptosi induïda per activació (AICD), sinó que podria explicar-se com una disminució en la secreció d'IL-2 i una expressió alterada del receptor de la quimiocina CCR7 als limfòcits B, que indica un augment de l'activació d'aquests i potser una major activitat com a APC a nivell extrafol·licular.

6.3.15 Diabetogenicitat dels leucòcits provinents de ganglis limfàtics regionals (pancreàtics i mesentèrics)

Com que la capacitat diabetogènica dels limfòcits derivats de la melsa total de ratolins HTZ era més elevada que la dels limfòcits provinents de ratolins WT, però en la història natural els ratolins HTZ mostraven menys incidència acumulativa de la malaltia, vam continuar estudiant la capacitat diabetogènica dels limfòcits provinents de ganglis limfàtics pancreàtics de ratolins HTZ, ja que els ganglis limfàtics regionals alberguen el muntatge efectiu de la resposta immune contra els antigens dels illots. Es va fer una transferència adoptiva de cèl·lules totals de ganglis limfàtics pancreàtics derivats de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 9 setmanes d'edat a ratolins recipients NOD/SCID WT (Figura 6-27). La incidència acumulativa de diabetis no va ser significativament diferent entre els receptors que van rebre limfòcits provinents dels ratolins HTZ i els provinents dels WT.

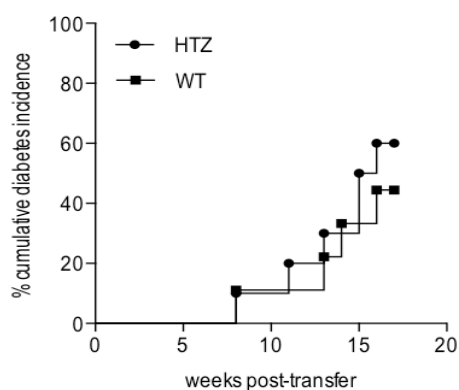


Figura 6-27: Diabetogenicitat dels leucòcits provinents de ganglis limfàtics pancreàtics i mesentèrics. Es van transferir ratolins NOD/SCID CDK11 WT ($n = 10$) amb 10 milions de cèl·lules totals provinents de ganglis limfàtics pancreàtics de femelles NOD CDK11 WT i HTZ de 9 setmanes d'edat, i es va estudiar la incidència de diabetis acumulativa durant 17 setmanes després de la transferència. La prova estadística utilitzada és el log-rang.

Per tant, els leucòcits provinents dels ganglis limfàtics regionals, que és on realment es prepara la resposta immune, no presentaven diferències en la seva capacitat diabetogènica, contràriament al que s'havia observat en els leucòcits derivats de la melsa, en què els HTZ eren més agressius. Els 2 grups de recipients desenvolupaven la diabetis amb una cinètica de debut i una severitat similars, i suggerien que la deleció parcial de la CDK11 protegia de la diabetis exercint la seva acció a la cèl·lula beta, sense afectar l'autoagressivitat del repertori immunològic. Aquests resultats suggereixen que els ratolins HTZ desenvolupaven la diabetis més precoçment quan eren transferits amb cèl·lules de melsa total de donants NOD, perquè els ratolins HTZ tenien menys illots (menys quantitat de "teixit diana" per atacar), però els seus limfòcits retenien la mateixa activitat diabetogènica que els limfòcits provinents de ratolins WT.

6.3.16 Els limfòcits provinents de ganglis limfàtics pancreàtics de ratolins HTZ tenen la secreció d'IL-2 augmentada encara que l'apoptosi induïda després d'estímul i la capacitat de proliferació es mantenen inalterades

Seguidament es va fer el mateix estudi *in vitro*, analitzant el comportament dels limfòcits provinents dels ganglis limfàtics pancreàtics (PLN) de ratolins HTZ en presència de diferents estímuls. La major part de limfòcits reactius contra autoantígens pancreàtics es localitzen als ganglis limfàtics pancreàtics. Es van agafar les cèl·lules totals dels PLN de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat i es va cultivar 1 milió de cèl·lules per pou en plaques de 12 pous. Seguidament es van incubar amb diferents estímuls autoantigènics de la T1D (rhINS, INSB₁₂₋₂₅ i GAD65 p35), l'antigen no relacionat amb la T1D (KLH), així com l'estímul policlonal anti-CD3, per estimular la proliferació cel·lular. Es va analitzar la susceptibilitat a l'apoptosi induïda per activació (AICD) al cap de 24 h postestímul mitjançant citometria de flux. En la Figura 6-28a es pot observar que els nivells d'apoptosi basal de les cèl·lules totals de gangli limfàtic no estaven alterats en ratolins HTZ, comparat amb els ratolins WT. En les cèl·lules incubades amb l'estímul de proliferació policlonal anti-CD3, tampoc no hi havia diferències significatives entre els 2 genotips estudiats. Els altres estímuls utilitzats, INSB₁₂₋₂₅, GAD65 p35, rhINS i KLH, no van donar augment en l'apoptosi, comparat amb l'apoptosi basal dels 2 genotips. La Figura 6-28b mostra les mateixes dades que la Figura 6-28a, però representant l'increment d'apoptosi (apoptosi estímulo – apoptosi basal) per a cada ratolí. L'estimulació amb anti-CD3 no provocà cap diferència entre genotips.

De la mateixa manera, es van agafar cèl·lules totals de PLN de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat i es va cultivar 1 milió de cèl·lules per pou en plaques de 12 pous. Seguidament es van incubar amb l'estímul anti-CD3 per estimular la proliferació cel·lular i es va analitzar la secreció de citocines mitjançant la tècnica d'ELISA al cap de 48 h postestímul. Tant en la Figura 6-28c com en la Figura 6-28d es representa l'increment de secreció de citocines (concentració amb anti-CD3 – concentració basal sense estímul) 48 h després de cultivar-les. La Figura 6-28c mostra que l'increment de secreció d'IL-2 estava augmentat en els sobredants dels medis de cultiu de limfòcits provinents dels ratolins HTZ ($25,62 \pm 3,57$, HTZ vs. $15,99 \pm 2,51$, WT). D'altra banda, si tenim en compte l'increment de secreció d'IFN γ en resposta a anti-CD3, no hi havia diferències significatives entre els 2 genotips (Figura 6-28d).

Així mateix, es van agafar cèl·lules totals de PLN de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat, es van tenyir amb CFSE i es va cultivar 1 milió de cèl·lules per pou en plaques de 12 pous. Seguidament es van incubar amb anti-CD3, rhINS, INSB₁₂₋₂₅, GAD65 p35 i KLH per estimular la proliferació cel·lular, i es van analitzar les cèl·lules mitjançant citometria de flux al cap de 72 h postestímul. La proliferació basal (Figura 6-28e) dels limfòcits després de 72 h sense estímul no donava diferències significatives entre els 2 genotips. Tant els limfòcits T CD4 com els T CD8 gairebé no proliferaven. La Figura 6-28f mostra l'increment de proliferació dels limfòcits 72 h postestímul (proliferació estímul – proliferació basal). Només van proliferar els limfòcits que estaven incubats amb anti-CD3, però no hi havia diferències significatives entre els 2 genotips estudiats. Els altres estímuls utilitzats no van induir proliferació cel·lular detectable. Com era d'esperar la KLH no va donar un augment de la proliferació, sinó que va actuar com a control negatiu d'autoantigenicitat. Ambdós tipus de limfòcits, provinents dels ganglis limfàtics de ratolins HTZ i WT, van manifestar una capacitat de proliferació similar sota estimulació amb anti-CD3, la qual cosa indica que la resposta dels limfòcits a estimuladors mitògens no específics no estava alterada en els limfòcits de ratolins HTZ.

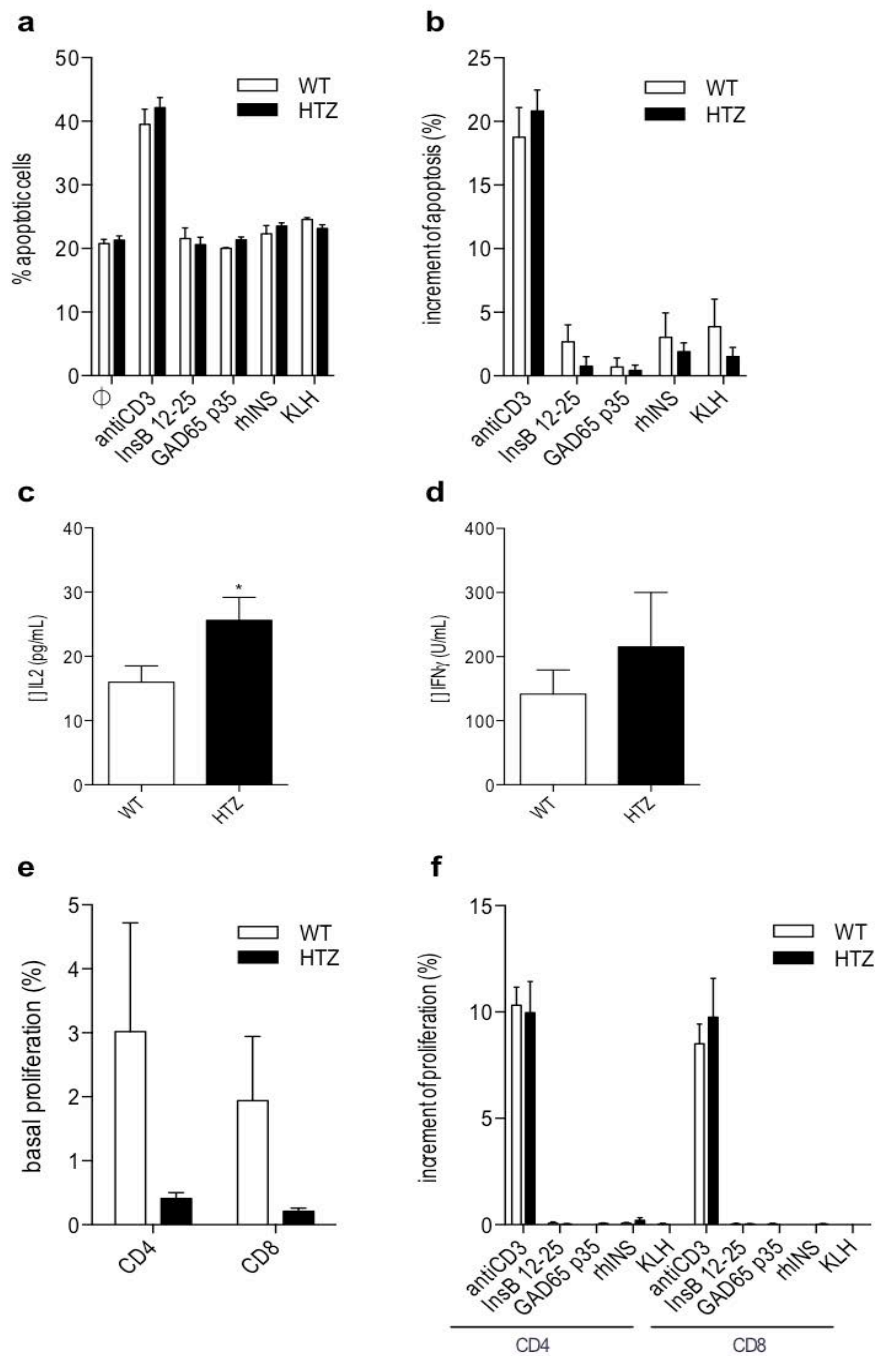


Figura 6-28: Estudis d'apoptosi i proliferació en limfòcits provinents de ganglis limfàtics pancreàtics. (a) Percentatge de cèl·lules apoptòtiques (PI-AnnV+) 24 h després de cultivar-les amb estímuls o sense. (b) Increment d'apoptosi en les cèl·lules que han rebut els estímuls. (c) Increment de la concentració d'IL-2 i (d) IFN γ secretats 48 h postestímul en el sobrenedant del medi de cultiu dels limfòcits. L'estímul utilitzat va ser anti-CD3 i les citocines es van analitzar mitjançant la tècnica d'ELISA. (e) Proliferació basal. Percentatge de cèl·lules en proliferació (CFSE-) 72 h després de cultivar-les sense estímuls. (f) Increment de proliferació en les cèl·lules que han rebut els estímuls. Es van analitzar ratolins NOD WT i HTZ, per als estudis d'apoptosi ($n = 3-8$), per als estudis de citocines ($n = 4-10$) i per als estudis de proliferació ($n = 3-11$). Els increments es van calcular restant el valor basal sense estímul al valor una vegada afegit l'estímul. Els estímuls utilitzats i les seves concentracions finals respectives són: ϕ (sense estímul); anticòs anti-CD3, 1 $\mu\text{g/mL}$; pèptid B de la cadena d'insulina (p12-25) (INSB12-25), descarboxilasa de l'àcid glutàmic 65 (GAD65 p35), insulina recombinant humana (rhINS) i hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH), 25 $\mu\text{g/mL}$. Es va utilitzar la prova estadística ANOVA bidireccional (a, b, e i f) i t paramètrica (c i d).

En conclusió, els limfòcits provinents de PLN de ratolins HTZ presentaven un fenotip comparable al dels WT. Aquest resultat indica que els ratolins HTZ per a la CDK11 tenen una disminució en la incidència de diabetis, a causa d'efectes directes sobre la viabilitat de la cèl·lula beta, sense afectar la diabetogenicitat del seu repertori immunològic quant als ganglis regionals de l'òrgan diana.

6.3.17 Les cèl·lules T reguladores dels ratolins HTZ no es veuen alterades

S'ha vist que les cèl·lules T reguladores (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) poden inhibir l'activitat de les cèl·lules T reactives i mantenir la tolerància immune. El factor de transcripció FoxP3 està involucrat en la diferenciació de les cèl·lules T reguladores (Fontenot, Gavin et al. 2003). Per tal d'investigar si la protecció dels ratolins HTZ s'aconseguia mitjançant un increment en el desenvolupament o activitat de les cèl·lules T reguladores, es van aïllar limfòcits de la melsa, dels ganglis limfàtics i de la infiltració limfocítica dels illots pancreàtics de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat, i es va analitzar l'expressió del factor de transcripció FoxP3 mitjançant citometria de flux (Figura 6-29a-d, Figura 6-30a-d). Els resultats indicaven que no hi havia diferències significatives en les proporcions de limfòcits T CD4 reguladors entre ratolins WT i HTZ, tant a la melsa com al gangli limfàtic (Figura 6-29e). En la Figura 6-30e es pot veure que hi ha la mateixa proporció de limfòcits T infiltrants als illots pancreàtics de ratolins WT i HTZ. Així mateix, també hi ha la mateixa proporció de limfòcits T reguladors als 2 genotips (Figura 6-30f). Aquests resultats evidencien que la protecció davant la T1D observada en els ratolins HTZ no és deguda a un increment en la proporció de cèl·lules T reguladores dins el repertori immunològic.

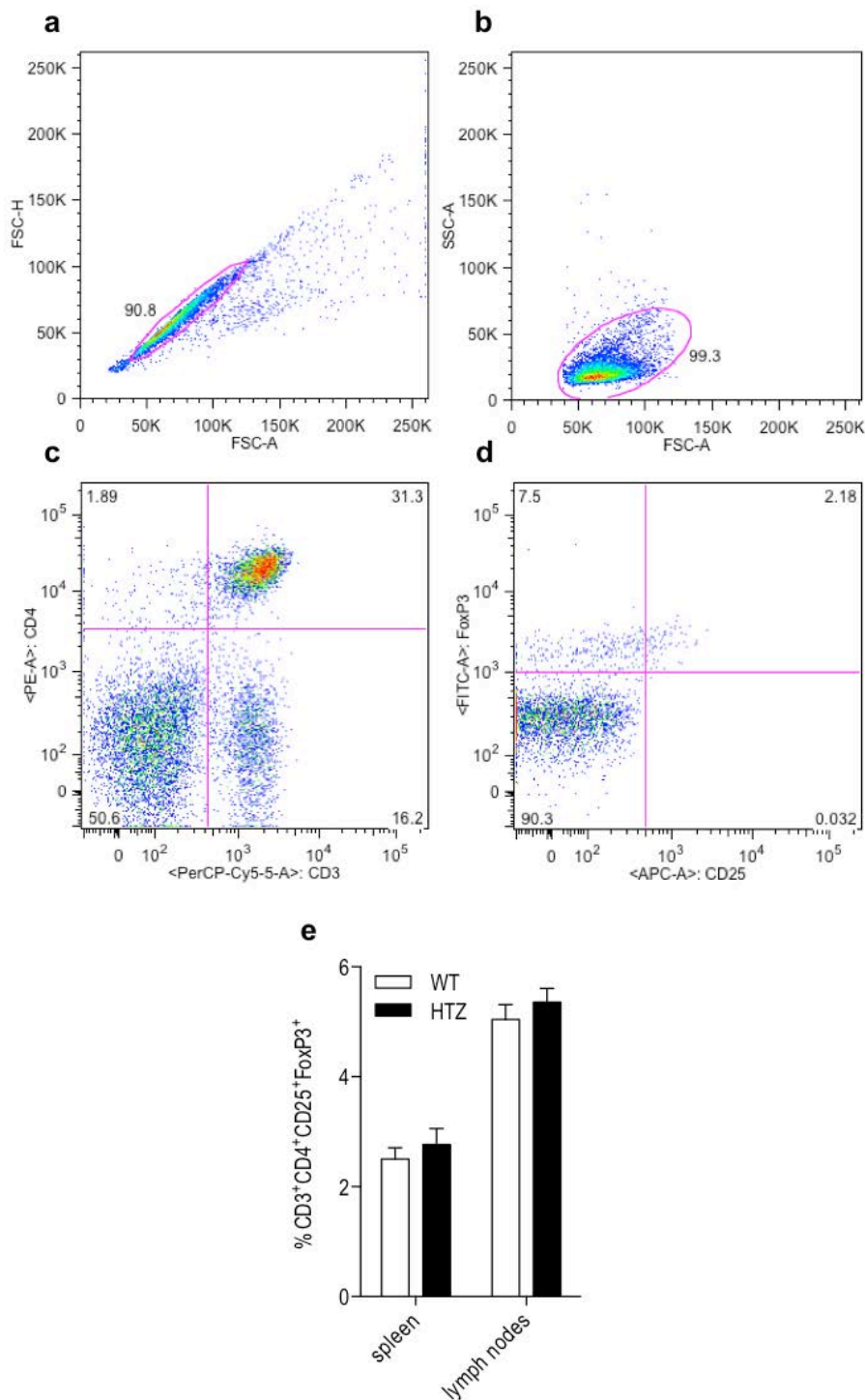


Figura 6-29: Estudi de la població de cèl·lules T reguladores en melsa i gangli limfàtic. Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que conté els limfòcits T reguladors. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant, i tot seguit (c), es va delimitar la regió de limfòcits T CD4 (CD3⁺CD4⁺). (d) De la fracció cel·lular T CD4, es van tenir en compte les cèl·lules que expressaven FoxP3⁺ (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). (e) Percentatge de limfòcits T CD4 reguladors en melsa ($n = 3$) i ganglis limfàtics pancreàtics ($n = 12$) de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat. La prova estadística utilitzada és l'ANOVA bidireccional.

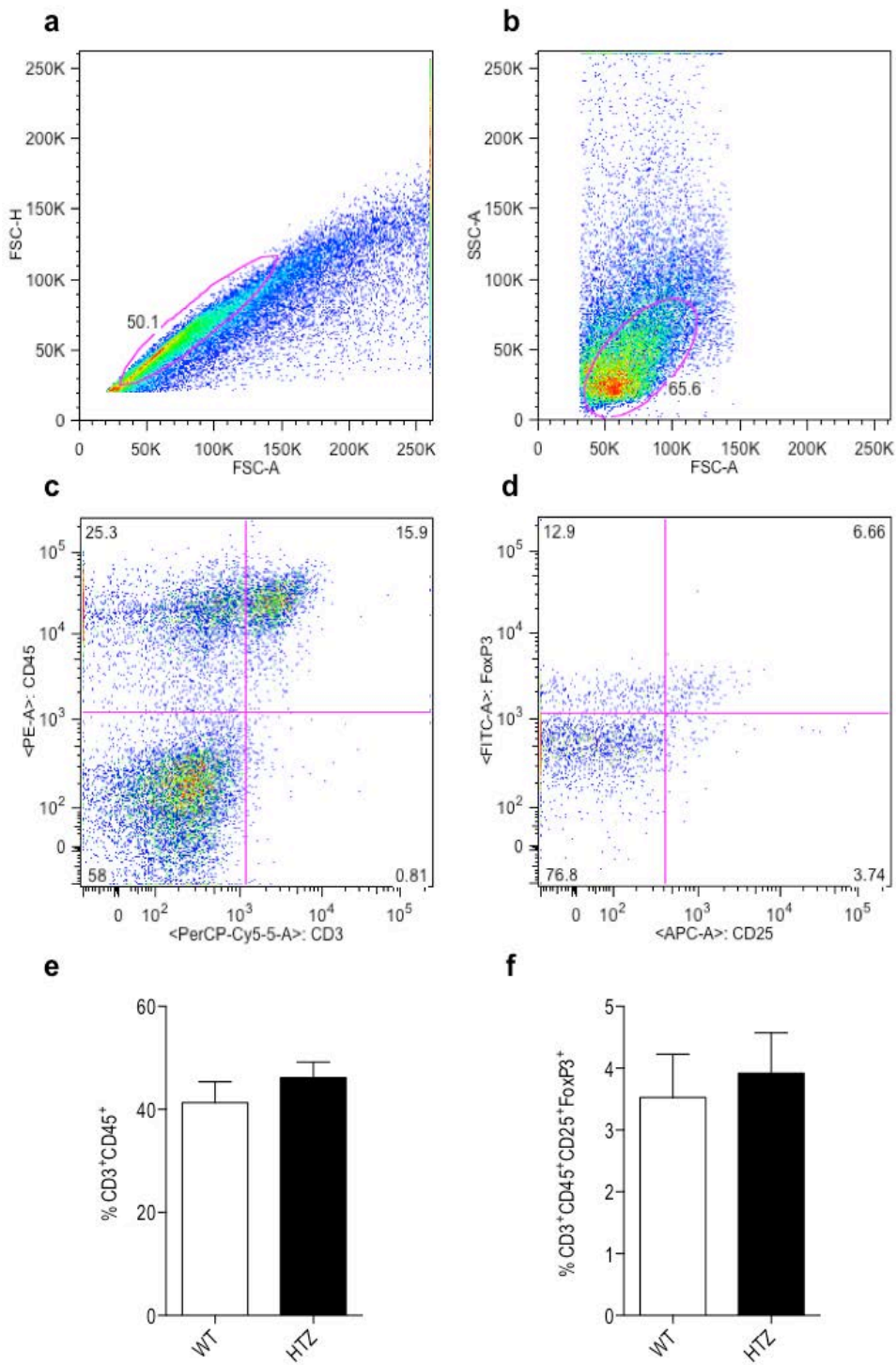


Figura 6-30: Estudi de la població de cèl·lules T reguladores en la infiltració limfocítica dels illots pancreàtics. Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que conté els limfòcits T reguladors. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant, i tot seguit (c), es va delimitar la regió de limfòcits T (CD3+CD45+). (d) De la fracció cel·lular T (CD3+CD45+), es van tenir en compte les cèl·lules que expressaven FoxP3+ (CD3+CD45+CD25+FoxP3+). (e) Percentatge de limfòcits T i (f) limfòcits T reguladors en l'infiltrat d'illots pancreàtics de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ ($n = 6-7$) de 7 setmanes d'edat. Es va utilitzar la prova t paramètrica.

6.3.18 L'activació de les cèl·lules dendrítiques (DC) dels ratolins HTZ no es veu alterada

Per tal d'estudiar el nivell d'activació de les DC, es van aïllar les cèl·lules totals de la melsa i dels ganglis limfàtics de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat i se'n va analitzar l'expressió de les molècules coestimuladores CD86 o CD80 en les membranes de les DC mitjançant citometria de flux (Figura 6-31a-d). No van trobar-se diferències significatives entre les proporcions de poblacions de DC madures de la melsa de ratolins WT i HTZ (Figura 6-31e), ni dels ganglis limfàtics (Figura 6-31f), la qual cosa indica que l'hemidelecció de la CDK11 no influeix en la maduració de les DC.

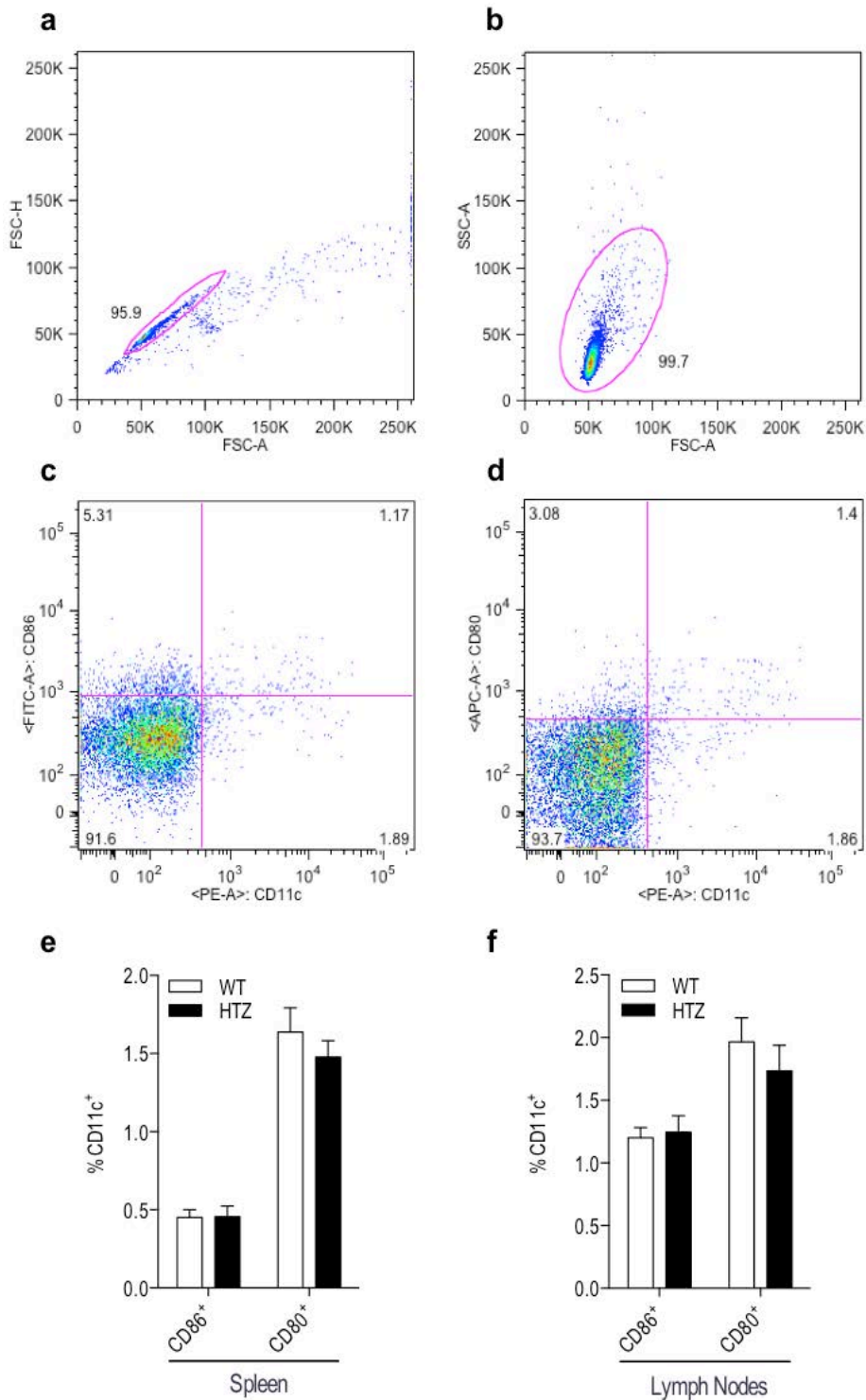
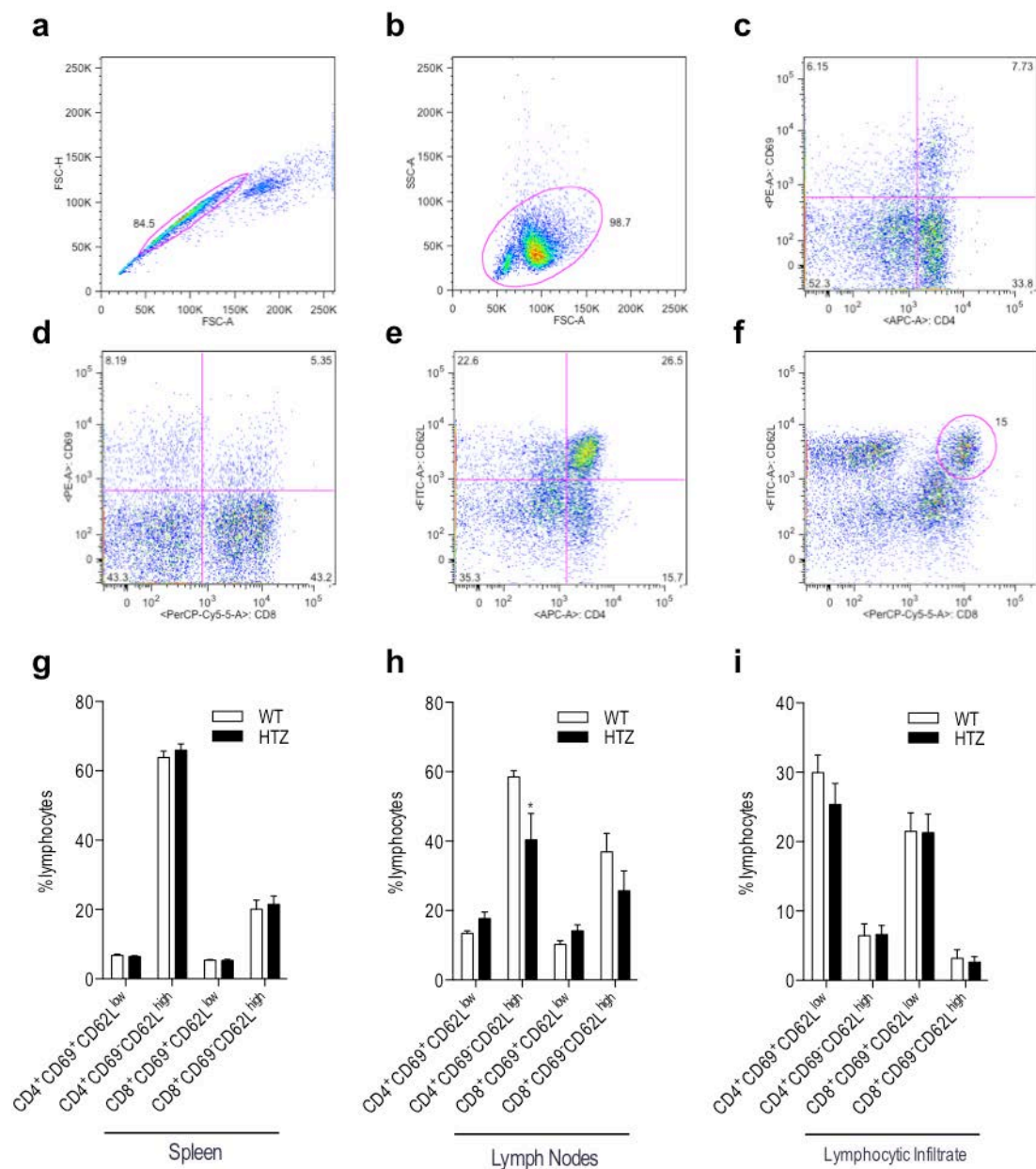


Figura 6-31: Estudi de la maduració de cèl·lules dendrítiques. Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que conté les cèl·lules dendrítiques activades. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant, i tot seguit (c i d), es va delimitar la regió de DC madures (CD11c⁺CD86⁺) i (CD11c⁺CD80⁺). (e) Percentatge de DC (CD11c⁺) que presenten les molècules coestimuladores en la seva superfície cel·lular en melsa i (f) ganglis limfàtics de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ (n = 9) de 7 setmanes d'edat. La prova estadística utilitzada és l'ANOVA bidireccional.

6.3.19 La proporció de limfòcits T CD4 naïfs està disminuïda en els ratolins HTZ, encara que es manté la proporció de cèl·lules activades

Per tal d'estudiar l'activació de les cèl·lules T, es van aïllar els limfòcits de la melsa, dels ganglis limfàtics i de la infiltració limfocítica dels illots pancreàtics de ratolins NOD CDK11 WT i HTZ de 7 setmanes d'edat. Tot seguit, es va analitzar l'expressió de la molècula de membrana d'activació primerenca, CD69, involucrada en la proliferació de limfòcits, i la molècula CD62L, marcador de cèl·lules T naïfs, mitjançant citometria de flux (Figura 6-32a-f). No hi ha diferències en l'estat d'activació dels limfòcits T ($CD4^+CD69^+CD62L^{low}$ i $CD8^+CD69^+CD62L^{low}$) en melsa (Figura 6-32g), gangli limfàtic (Figura 6-32h) i infiltrat limfocític dels illots pancreàtics (Figura 6-32i). Pel que fa a les proporcions dels limfòcits T CD4 naïfs ($CD4^+CD69^-CD62L^{high}$), són similars entre ratolins WT i HTZ en melsa (Figura 6-32g) i infiltrat limfocític (Figura 6-32i), però són més baixes als ganglis limfàtics dels ratolins HTZ, comparades amb els ratolins WT ($40,36 \pm 7,59$ vs. $58,52 \pm 1,76$, respectivament). Així mateix, els limfòcits T CD8 naïfs ($CD8^+CD69^-CD62L^{high}$) dels ratolins HTZ tenen unes proporcions similars en les 3 localitzacions, comparades amb les proporcions dels limfòcits WT. L'hemidelecció de la CDK11 afavoreix la reducció de les cèl·lules T CD4 naïfs als ganglis limfàtics, però no sembla que estigui associada amb una alteració de l'activació dels limfòcits T ni de les cèl·lules T reguladores.



Per tant, es pot concloure que la reducció i el retard de la incidència de diabetis en els ratolins HTZ són causats per una disminució de la susceptibilitat de les cèl·lules beta pancreàtiques a l'apoptosi i no per culpa d'un repertori limfocític autoreactiu alterat.

6.4 Resum dels resultats

- L'mRNA de la CDK11 està disminuït a les cèl·lules beta dels illots pancreàtics durant la progressió de l'atac autoimmune en els ratolins NOD. Aquesta disminució segueix un patró dosidependent dels nivells d'infiltració leucocítica dels illots.
- La deleció d'1 al·lel de la CDK11 (ratolins HTZ) fa disminuir la incidència acumulativa de diabetis en els ratolins NOD.
- L'hemideleció de la CDK11 protegeix les cèl·lules beta de l'apoptosi induïda per inflamació. No obstant això, la seva capacitat proliferativa no es veu alterada.
- El conjunt de la fisiologia de l'illot pancreàtic no està alterat per l'hemideleció de la CDK11.
- Els leucòcits provinents dels ganglis limfàtics pancreàtics presenten la mateixa capacitat diabetogènica en els 2 genotips.
- La protecció davant la T1D que presenten els ratolins HTZ no sembla que sigui causa de la diabetogenicitat, del percentatge o nivells d'activació d'efectius immunològics, ni d'alteracions a les cèl·lules T reguladores.

7 DISCUSSIÓ

La massa beta cel·lular està dràsticament disminuïda en la diabetis autoimmune (T1D), la qual cosa abroga la resposta de secreció d'insulina en resposta a nutrients secretagogs com la glucosa. Per tant, la regeneració i l'apoptosi de la cèl·lula beta és una àrea important en la investigació per al tractament de la diabetis. L'apoptosi és un dels principals mecanismes de mort beta cel·lular; per aquest motiu, és important entendre els mecanismes moleculars desencadenants de l'apoptosi de la cèl·lula beta i identificar els agents que poden reduir i/o neutralitzar aquest procés. Aquest estudi descriu una nova diana, la CDK11, que inhibeix l'apoptosi de la cèl·lula beta.

Prèviament, havíem detectat, mitjançant la tecnologia de microxip de cDNA murí, una disminució en l'expressió de la CDK11 en el nínxol inflamatori de les cèl·lules beta dels illots NOD. En aquest estudi, vam confirmar, mitjançant qPCR, que l'expressió de l'mRNA de la CDK11 estava disminuïda en cèl·lules endocrines d'illots pancreàtics de ratolins NOD d'11 setmanes, comparada amb l'observada en mostres provinents de ratolins NOD/SCID de la mateixa edat.

Vam confirmar que la inflamació era responsable causal de la regulació a la baixa de l'expressió de l'mRNA de la CDK11, mitjançant experiments en què es mesurava l'expressió de CDK11 en cèl·lules endocrines pancreàtiques en resposta a la transferència adoptiva de diferents dosis de limfòcits diabetogènics a recipients NOD/SCID. Vam demostrar que existia una correlació inversa entre l'expressió de la CDK11 i la severitat de la infiltració limfocítica.

Sorprenentment, aquesta disminució en l'expressió de la CDK11 no afectava els nivells de proliferació de les cèl·lules beta pancreàtiques, cosa que feia pensar que la disminució de l'expressió de la CDK11 era deguda a la infiltració pancreàtica i no a una disminució en la proliferació cel·lular.

La deleció total de la CDK11 és embriològicament letal. Les cèl·lules de blastocist E3.5 CDK11^{p110/p58} nul·les no són viables i moren a causa de l'apoptosi induïda per una fallada en la proliferació i aturada mitòtica (Li, Inoue et al. 2004). Per aquest motiu, es va generar el ratolí NOD deficient en cèl·lula beta (KO condicional) mitjançant l'expressió transgènica de la recombinasa Cre a la cèl·lula beta pancreàtica (RIP-Cre) i les seqüències loxP flanquejant el locus CDK11 murí. La utilització de la tecnologia Cre-Lox per tal d'eliminar gens en les cèl·lules

beta pancreàtiques a permès aportar nous coneixements en la patofisiologia de la diabetis autoimmune. Un dels problemes d'aquesta tècnica és que depèn de la integració aleatòria del transgèn Cre al genoma del pronucli masculí de l'òocit fertilitzat (microinjecció pronuclear), que és el mètode més usat per generar els ratolins Cre i, en general, els models transgènics clàssics. Com a resultat, la integració de Cre pot donar la inserció de múltiples còpies, així com també afectar l'expressió de gens endògens essencials per a la generació del repertori autoimmune, per a l'atracció d'aquests als illots, o per permetre'n les accions efectores. D'altra banda, les seqüències loxP, flanquejant el locus CDK11, poden alterar informació epigenètica essencial relacionada tant amb el gen CDK11 com amb el desenvolupament de la diabetis. En aquest sentit, hi ha una multiplicitat de *loci*, relacionats tant amb el sistema immune com amb les cèl·lules beta, que participen en el procés patogènic de la T1D en els ratolins NOD. A més a més, aquest procés patogènic és remarcablement sensible a un ampli espectre de manipulacions genètiques i ambientals (Leiter, Reifsnnyder et al. 2007). Tant en humans com en ratolins, s'han descrit regions gèniques amb al·lels que s'associen amb la susceptibilitat a patir T1D (Idd en ratolí, i IDD en humans). La CDK11 està codificada al cromosoma 4 en ratolins, i es localitza a 86,73 cM del centròmer. Al cromosoma 4 s'han descrit 3 Idd o regions de susceptibilitat a la diabetis, Idd9/Idd11 i Idd25, tots 3 en regions més properes al centròmer (57,9 i 66,32 cM, respectivament) que la CDK11 (The Jackson Lab, Mouse Genome Informatics: <http://www.informatics.jax.org/marker>). Per tant, la interferència negativa de les seqüències LoxP sobre la incidència de la T1D en els ratolins NOD podria explicar-se per l'existència d'al·lels de resistència a la T1D de locus Idd desconeguts fins ara, provinents del fons genètic C57BL/6-Sv/SvEv, físicament vinculats al locus CDK11/LoxP. Com que aquests locus de susceptibilitat estarien fortament lligats al locus CDK11, ni els successius retrocreuaments al fons NOD no serien suficients per substituir els al·lels C57BL/6-Sv/SvEv de resistència a la T1D per al·lels NOD de susceptibilitat a la malaltia. En el nostre cas, la integració dels llocs loxP afectaven negativament la incidència de la T1D, ja que emascaraven l'efecte real entre l'hemideleció de la CDK11 i la mort beta cel·lular *in vivo*. Aquests resultats haurien de tenir-se en compte en altres tipus de models animals que utilitzen el sistema Cre-Lox.

A causa de les limitacions i interferències del sistema Cre-Lox en el nostre estudi, vam escollir el model de deleció no condicional de la CDK11, és a dir, el model KO convencional, però amb la limitació de només poder estudiar *in vivo* les delecions en heterozigosi (HTZ), ja que en homozigosi eren letals. Els ratolins HTZ amb els quals es va continuar l'estudi presentaven una

disminució (1,5 vegades) de l'expressió de l'mRNA de la CDK11 en cèl·lules endocrines del pàncrees. Tant els ratolins HTZ com els WT tenien un pes corporal similar. No obstant això, els ratolins NOD/SCID HTZ presentaven un nombre més baix d'illots pancreàtics totals, tot i que l'àrea mitjana de la massa beta per illot cel·lular es mantenia entre els 2 genotips. Aquesta observació apuntava a un defecte intrínsec de la generació de massa beta cel·lular, independent de la presència de la infiltració limfocítica. Aquest defecte intrínsec no estava causat per una reducció de la proliferació de la cèl·lula beta pancreàtica dels ratolins HTZ, ja que les proporcions de proliferació eren similars en els 2 genotips, almenys en les edats mesurades, fet que implicava que la CDK11 exercia una funció independent del cicle cel·lular per a la CDK11 en la viabilitat de la cèl·lula beta i/o en etapes més primerenques del desenvolupament era crucial per determinar el nombre de *foci* cel·lulars que derivaran a llinatge endocrí.

L'hemidelecció de la CDK11 en els ratolins NOD inhibeix de manera significativa el desenvolupament de la diabetis autoimmune. La supressió parcial de la CDK11 esdevindria un mecanisme de protecció davant l'apoptosi induïda per inflamació, ja que la CDK11 participa activament en processos apoptòtics i els amplifica (Feng, Ariza et al. 2005, Yun, Wu et al. 2007, Shi, Hershey et al. 2009). Seguint aquesta línia, les cèl·lules beta pancreàtiques dels ratolins NOD HTZ es veuen menys afectades per l'apoptosi que les provinents de ratolins NOD WT companys de ventrada. No obstant això, no hi ha diferències estadístiques en l'activitat apoptòtica de les cèl·lules beta pancreàtiques dels ratolins NOD/SCID HTZ, comparada amb la dels seus companys de ventrada WT. Aquest fet explica que la infiltració limfocitària és necessària per desencadenar la mort apoptòtica de la cèl·lula beta, de manera que una vegada l'illot pancreàtic comença a estar infiltrat, les cèl·lules beta dels ratolins NOD CDK11 WT es moren més ràpidament per apoptosi que les cèl·lules dels ratolins HTZ. A més a més, els macròfags dels ratolins NOD tenen una capacitat de neteja ineficient (O'Brien, Huang et al. 2002, Maree, Komba et al. 2005) que dona com a resultat un ambient proinflamatori accentuat, i que promou el reclutament d'un nombre més gran de cèl·lules immunes efectores al focus apoptòtic dels illots pancreàtics. En aquest sentit, l'hemidelecció de la CDK11 inhibiria el procés apoptòtic ja que tindria un efecte antiinflamatori.

Seguidament, es van fer estudis metabòlics sobre la resposta a la glucosa. Els ratolins HTZ tenien un contingut d'insulina total de pàncrees disminuït, tot i mantenir el pes del pàncrees total, com a conseqüència que els pàncrees dels ratolins HTZ presentaven menys illots. No obstant

això, els illots, individualment, tenien el mateix contingut d'insulina en els 2 genotips. Els estudis de fluctuacions de calci citoplasmàtic dels illots pancreàtics mostraven que els illots HTZ no estaven alterats, la qual cosa indicava que la seva fisiologia en resposta a la glucosa estava preservada. Tot seguit vam realitzar proves de tolerància a la glucosa (IPGTT) i a la insulina (IPITT) *in vivo*. Vam observar que la disminució de la CDK11 no alterava la resposta a la glucosa en les proves IPGTT. No obstant això, els ratolins HTZ, als 60 min post *bolus* de glucosa, presentaven una concentració d'insulina en plasma disminuïda. Aquesta dada concordava amb el fet que, tot i que els ratolins HTZ no presentaven els mecanismes de secreció d'insulina alterats, perquè tenien un nombre d'illots més reduït, la insulina final secretada fos menor. Esperàvem, doncs, que les glicèmies dels ratolins HTZ en les proves IPGTT fossin més elevades, però no va ser aquest el cas: no tenien alterada la resposta a l'estímul de glucosa. Gràcies als estudis IPITT es va poder determinar que els ratolins HTZ tampoc no presentaven la sensibilitat a la insulina incrementada, de manera que poguéssim explicar els resultats anteriors. Això va fer necessari estudiar la funció pancreàtica de la cèl·lula alfa per determinar si els nivells de glucagó es veien alterats i eren responsables de la normalització del metabolisme de la glucosa dels ratolins HTZ, ja que el glucagó és l'hormona que incrementa els nivells de glucosa en sang quan aquests nivells són baixos, a més a més de contrarestar les conseqüències metabòliques de l'acció de la insulina. El nombre de cèl·lules alfa individuals per àrea d'illot pancreàtic no estava alterat en ratolins HTZ, però s'ha de tenir en compte que els ratolins HTZ tenien un nombre més baix d'illots pancreàtics per ratolí, la qual cosa que fa pensar que el nombre total de cèl·lules alfa podia ser més baix en els ratolins HTZ. A més a més, els nivells d'expressió de l'mRNA del glucagó es veien disminuïts en ratolins NOD/SCID HTZ, cosa que feia pensar que l'expressió del glucagó estava alterada en aquests ratolins de manera independent a la presència d'infiltració. Per tant, si tenien una expressió dels nivells de l'mRNA disminuïda i un nombre d'illots més baix, seria d'esperar que la secreció del glucagó dels illots individuals i la del pàncrees total en ratolins HTZ també estigués disminuïda. Per aquest motiu es van analitzar els sèrums obtinguts de l'IPGTT per mesurar els nivells de glucagó en sang en dejú i després d'un d'estímul de glucosa. En dejú, tant els ratolins WT com els HTZ presentaven uns nivells de glucagó similars. Així mateix, no hi havia diferències estadístiques entre els nivells de glicentina i oxintomodulina secretats pels ratolins WT i HTZ després de l'estímul de glucosa. En conclusió, tot i expressar nivells d'mRNA més baixos i tenir menys illots pancreàtics, quan els nivells de glucosa en sang eren baixos, perquè els ratolins havien estat privats de menjar durant 16 h, els

nivells de glucagó en sang dels ratolins HTZ no es veien alterats. Finalment, es van estudiar els nivells d'expressió de GLUT-2 en cèl·lules beta i GLUT-4 en múscul i teixit adipós blanc, i es va observar que la seva expressió no estava afectada per la reducció de la CDK11, de manera que el conjunt de la fisiologia de l'illot pancreàtic no semblava que estigués alterat per l'hemidelecció de la CDK11. No obstant això, aquest punt hauria de ser estudiat amb més profunditat, ja que tot i tenir uns nivells d'insulina en sang disminuïts després de l'estímul de glucosa, aquests nivells semblaven suficients per disminuir i mantenir els nivells de glucosa en el mateix rang que els ratolins WT.

Per tal de continuar estudiant els mecanismes protectors que exercia la regulació a la baixa de la CDK11, es va analitzar el repertori immunològic quant a marcadors de superfície d'activació, producció de citocines, proliferació i resposta antigènica. Els resultats indiquen que les poblacions de cèl·lules T CD4, T CD8 i B no estaven alterades en melsa ni gangli limfàtic. En la infiltració limfocítica dels illots pancreàtics tampoc no es veien diferències entre les poblacions de limfòcits T. Així mateix, la protecció induïda per l'hemidelecció de la CDK11 no semblava causada pel desenvolupament dels macròfags i DC, i els nivells dels marcadors de maduració CD80 i CD86 de les DC no estaven alterats.

Mitjançant estudis de la història natural pel que fa a desenvolupament de diabetis espontània en els ratolins NOD/SCID CDK11, es va poder determinar que l'acció dels limfòcits era necessària per induir la mort cel·lular a la cèl·lula beta i desencadenar la malaltia. A més a més, els ratolins NOD/SCID CDK11 HTZ eren més propensos a desenvolupar diabetis quan estaven exposats al mateix repertori de limfòcits derivats de la melsa, possiblement degut a què el nombre d'illots dels ratolins HTZ estava disminuït. D'altra banda, la capacitat diabetogènica dels limfòcits provinents de la melsa de ratolins HTZ era més elevada que la dels ratolins WT. No era així quan els ganglis limfàtics pancreàtics eren la font de limfòcits, que és on realment es prepara la resposta autoimmune efectora a la T1D, ja que no es van trobar diferències entre els 2 genotips quant a diabetogènicitat dels seus ganglis.

Per estudiar millor la patogenicitat accentuada dels limfòcits provinents de la melsa, es va dur a terme assajos de proliferació i mort cel·lular *in vitro*. Es va trobar que les cèl·lules de melsa total derivades dels ratolins HTZ, tot i mantenir l'apoptosi basal no alterada, tenien l'apoptosi induïda per estímul anti-CD3 més elevada que les derivades de ratolins WT, fet que indicava que l'activació en aquestes cèl·lules estava accelerada, almenys pel que fa a AICD. Les cèl·lules

totals provinents de melsa de ratolins HTZ secretaven menys IL-2; possiblement per això els limfòcits mostraven un fenotip més agressiu a la transferència adoptiva, ja que, tot i les evidències inicials de la participació de la IL-2 en la prevenció de la mort cel·lular actuant com a factor de supervivència, la seva funció fisiològica dominant és la de controlar l'activació de les cèl·lules T i prevenir l'autoimmunitat mitjançant l'expansió de les cèl·lules T reguladores (Knoechel, Lohr et al. 2005). Els ratolins IL-2^{-/-}, IL-2R α ^{-/-} i IL-2/15R β ^{-/-} mostren una acumulació espontània de limfòcits T activats, però no presenten cèl·lules T reguladores (Sadlack, Merz et al. 1993, Suzuki, Kundig et al. 1995, Willerford, Chen et al. 1995, Malek, Yu et al. 2002). D'altra banda, les cèl·lules totals de melsa aïllades dels ratolins HTZ i WT manifestaven una capacitat de proliferació similar sota estimulació amb anti-CD3, la qual cosa indica que la resposta dels limfòcits a estimuladors mitògens no específics es conservava i no estava alterada en els ratolins HTZ. En conclusió, la capacitat diabetogènica exacerbada dels limfòcits provinents de melsa de ratolins HTZ es podria veure accentuada per una cinètica d'activació accelerada (resultats AICD) i una disminució en la secreció d'IL-2, la qual està implicada en la prevenció de l'autoimmunitat.

Seguidament es va fer el mateix estudi *in vitro*, analitzant el comportament dels limfòcits provinents dels ganglis limfàtics pancreàtics (PLN) de ratolins HTZ en presència de diferents estímuls. L'apoptosi basal de les cèl·lules totals de gangli limfàtic no estava alterada en ratolins HTZ. Així mateix, l'apoptosi induïda per estímul tampoc no es veia alterada ni amb anti-CD3 ni amb els altres estímuls antígen-específics utilitzats (INSB12-25, GAD65 p35, rhINS i KLH). Pel que fa a l'increment de secreció d'IL-2, estava augmentat en els sobrenedants dels medis de cultiu de cèl·lules totals de PLN provinents dels ratolins HTZ, segurament indicant una major expansió de cèl·lules T reguladores. La proliferació basal dels limfòcits després de 72 h sense estímul no donava diferències significatives entre els 2 genotips. A més a més, els limfòcits provinents de ganglis limfàtics de ratolins HTZ i WT manifestaven una capacitat de proliferació similar sota estimulació amb anti-CD3, la qual cosa indica que la resposta dels limfòcits a estimuladors mitògens no específics no estava alterada. Els altres estímuls utilitzats (INSB12-25, GAD65 p35, rhINS i KLH) no resultaven en nivells de proliferació cel·lular perceptible. En conclusió, els limfòcits provinents de PLN de ratolins HTZ presentaven un fenotip més toleritzat, comparat amb el fenotip dels limfòcits provinents de melsa. Aquests resultats concordaven amb el fet que la transferència adoptiva de limfòcits de gangli també presentava un fenotip més toleritzat.

A més a més, es va avaluar si el compartiment de cèl·lules T reguladores estava afectat per l'hemidelecció de la CDK11, ja que està demostrat que les cèl·lules T reguladores ajuden a mantenir la tolerància immunològica sobre les cèl·lules T efectores. No vam trobar diferències significatives en les proporcions de limfòcits T CD4 reguladors entre els ratolins WT i HTZ en melsa, gangli limfàtic ni en infiltrat limfocític dels illots pancreàtics. És de destacar que als ganglis limfàtics de tots 2 genotips hi havia un increment de 2 vegades en la proporció de cèl·lules T reguladores, comparada amb la trobada a la melsa, la qual cosa corrobora la nostra hipòtesi sobre la diabetogenicitat exacerbada dels limfòcits derivats de melsa, però no dels limfòcits dels ganglis pancreàtics. Una vegada els limfòcits han estat exposats als seus antígens corresponents al gangli limfàtic, hi ha una expansió de les cèl·lules T reguladores que mantenen a ratlla els limfòcits autoreactius. Avaluant l'estat d'activació dels limfòcits T ($CD4^+CD69^+CD62L^{low}$ i $CD8^+CD69^+CD62L^{low}$), no es van trobar diferències en melsa, gangli limfàtic i infiltrat limfocític dels illots pancreàtics en el temps mesurat. Pel que fa a les proporcions dels limfòcits T CD4 naïfs ($CD4^+CD69^-CD62L^{high}$), eren similars entre ratolins WT i HTZ en melsa i infiltrat limfocític, però eren més baixes als ganglis limfàtics dels ratolins HTZ, comparades amb les dels ratolins WT. Així mateix, els limfòcits T CD8 naïfs ($CD8^+CD69^-CD62L^{high}$) dels ratolins HTZ tenien unes proporcions similars en les 3 localitzacions tissulars, comparades amb les proporcions dels limfòcits WT. L'hemidelecció de la CDK11 afavoria la reducció de les cèl·lules T CD4 naïfs als ganglis limfàtics, però no semblava que estigués associada amb una alteració de l'activació dels limfòcits T ni de les cèl·lules T reguladores, la qual cosa suggeria que l'hemidelecció de la CDK11 no afectava la funció autoreactiva dels limfòcits als òrgans limfoides perifèrics. Per tant, es pot concloure que la reducció i el retard de la incidència de diabetis en els ratolins HTZ eren causats per una disminució en la susceptibilitat de les cèl·lules beta pancreàtiques a l'apoptosi i no per un repertori limfocític autoreactiu alterat.

Segons aquests resultats, es pot concloure que l'hemidelecció de la CDK11 protegeix els ratolins NOD de la diabetis autoimmunitària pel que fa a l'òrgan diana de manera independent del cicle cel·lular, i inhibeix la mort de la cèl·lula beta quan la infiltració limfocítica ataca els illots dels ratolins NOD. Aquest estudi proporciona una base teòrica que justifica el disseny d'aproximacions terapèutiques utilitzant la CDK11 com a diana molecular en illots pancreàtics com a estratègia per a la prevenció i el tractament de la diabetis autoimmunitària. Usar la cinasa CDK11 com a diana per modificar els illots trasplantats i fer-los més resistents a la mort cel·lular, podria ser una bona estratègia per millorar la resistència a l'atac autoimmunitària d'aquests illots. Per

tant, és essencial, en un futur, estudiar si es pot inhibir l'apoptosi cel·lular mitjançant la reducció de la CDK11 en illots pancreàtics humans. Hi ha diferents estudis que utilitzen vectors virals per reduir l'expressió de certes proteïnes als illots sense comprometre'n la funcionalitat i viabilitat (Novials, Jimenez-Chillaron et al. 1998, Marzban, Tomas et al. 2008). En tot cas, la CDK11 és una molècula clau en la regulació de la mort beta cel·lular, i podria tenir una funció rellevant en futures estratègies terapèutiques per a la T1D.

A més a més, és essencial delinear la via de senyalització en la qual intervé la CDK11 per protegir les cèl·lules beta de l'apoptosi. Tot i que ja està establert el paper de la CDK11 en la mort cel·lular en diferents models, la seva implicació en la mort de la massa beta pancreàtica no s'havia estudiat anteriorment. La determinació de les caspases implicades en aquest procés, així com els substrats que actuen per sota i per sobre de la CDK11, ajudaria a delinear la via de senyalització de la CDK11 en la mort beta cel·lular. S'ha vist que la mort cel·lular induïda per Fas i $TNF\alpha$ fragmenta i activa la CDK11 mitjançant les caspases 3/8 i 1/3, respectivament. L'activació de les caspases fragmenta la CDK11 i dona lloc a la CDK11^{p46} (domini C terminal-catalític) i la CDK11^{p60} (domini N terminal-regulador), que ajuden a amplificar l'apoptosi (Beyaert, Kidd et al. 1997, Ariza, Broome-Powell et al. 1999). No obstant això, es coneix poc dels substrats que estan regulats per la CDK11 durant l'apoptosi. Tots els estudis estan fets fora del context de la cèl·lula beta i s'ha vist que actua tant en l'àmbit extrínsec (mitocondri independent) com intrínsec (mitocondri dependent). La CDK11^{p46} interacciona i fosforila el factor d'iniciació eucariòtic 3f (eIF3f), que condueix a la inhibició de la traducció en la línia cel·lular humana de melanoma A375 (Shi, Hershey et al. 2009). Un altre estudi mostra que la CDK11^{p46} interacciona amb la cinasa p21 activada 1 (PAK1); n'inhibeix l'activitat i afavoreix la mort cel·lular (Chen, Yin et al. 2003). També s'ha identificat NOT2, que interacciona amb la CDK11^{p46} i condueix a la degradació de l'mRNA i apoptosi (Shi and Nelson 2005). Així mateix, és interessant el fet que la CDK11^{p58} estigui associada amb una disminució de Bcl-2, proteïna antiapoptòtica que promou la supervivència cel·lular, en la línia cel·lular d'hepatocarcinoma SMMC-7721 (Yun, Wu et al. 2007). La CDK11^{p58} també està involucrada en l'apoptosi de les cèl·lules neuronals (Liu, Cheng et al. 2013). Pel que fa a la CDK11^{p60}, interacciona amb les proteïnes 14-3-3 durant l'apoptosi induïda per Fas, en la línia cel·lular humana de melanoma A375 (Feng, Qi et al. 2005). En un altre estudi es va trobar que la CDK11^{p60} podia trencar parcialment el potencial de membrana mitocondrial, induir l'alliberament del citocrom c i promoure l'apoptosi, en la mateixa línia cel·lular A375 (Feng, Ariza et al. 2005). Tenint en compte els estudis anteriors, la CDK11 podria desenvolupar 2

funcions en les vies de senyalització apoptòtica: (1) regular i fosforilar substrats involucrats en els últims estadis de l'apoptosi, dut a terme pel fragment que conté el domini catalític (CDK11^{p46}); (2) modular la funció mitocondrial i amplificar el senyal apoptòtic, dut a terme pel fragment que conté el domini regulador (CDK11^{p60}). Un possible mecanisme per explicar el paper de les proteïnes cinases CDK11 durant l'apoptosi en la mort beta cel·lular es mostra en la Figura 7-1. El receptor Fas recluta i agrega FADD (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995). Aquesta interacció entre FADD i Fas desemboca en el reclutament i l'activació de la procaspasa 8. La caspasa 8 activa la procaspasa 3 directament o indirectament a través de l'alliberament del citocrom c del mitocondri. El citocrom c forma un complex amb la proteïna Apaf-1; d'aquesta manera, es pot unir i activar la procaspasa 9. La proteïna Bcl-2 també s'associa amb Apaf-1 i bloqueja l'alliberament del citocrom c, i així es prevé l'activació de la caspasa 9 i 3 (Li, Nijhawan et al. 1997, Zou, Henzel et al. 1997). La caspasa 9 activada s'uneix i activa la procaspasa 3 i 8, i s'ha vist que les proteïnes cinases CDK11 són tallades per aquestes caspases durant l'apoptosi induïda per Fas. L'activació de les proteïnes CDK11^{p60/p46} dona com a resultat la fosforilació i activació de substrats, de manera que s'activa la transcripció de gens involucrats en els estadis finals de l'apoptosi (Ariza, Broome-Powell et al. 1999).

Aquest és el primer cop que s'ha relacionat la CDK11 com a diana natural de l'atac autoimmune a la T1D, on l'expressió de la CDK11 estaria reprimida com a mecanisme protector de les cèl·lules beta contra l'apoptosi induïda per inflamació.

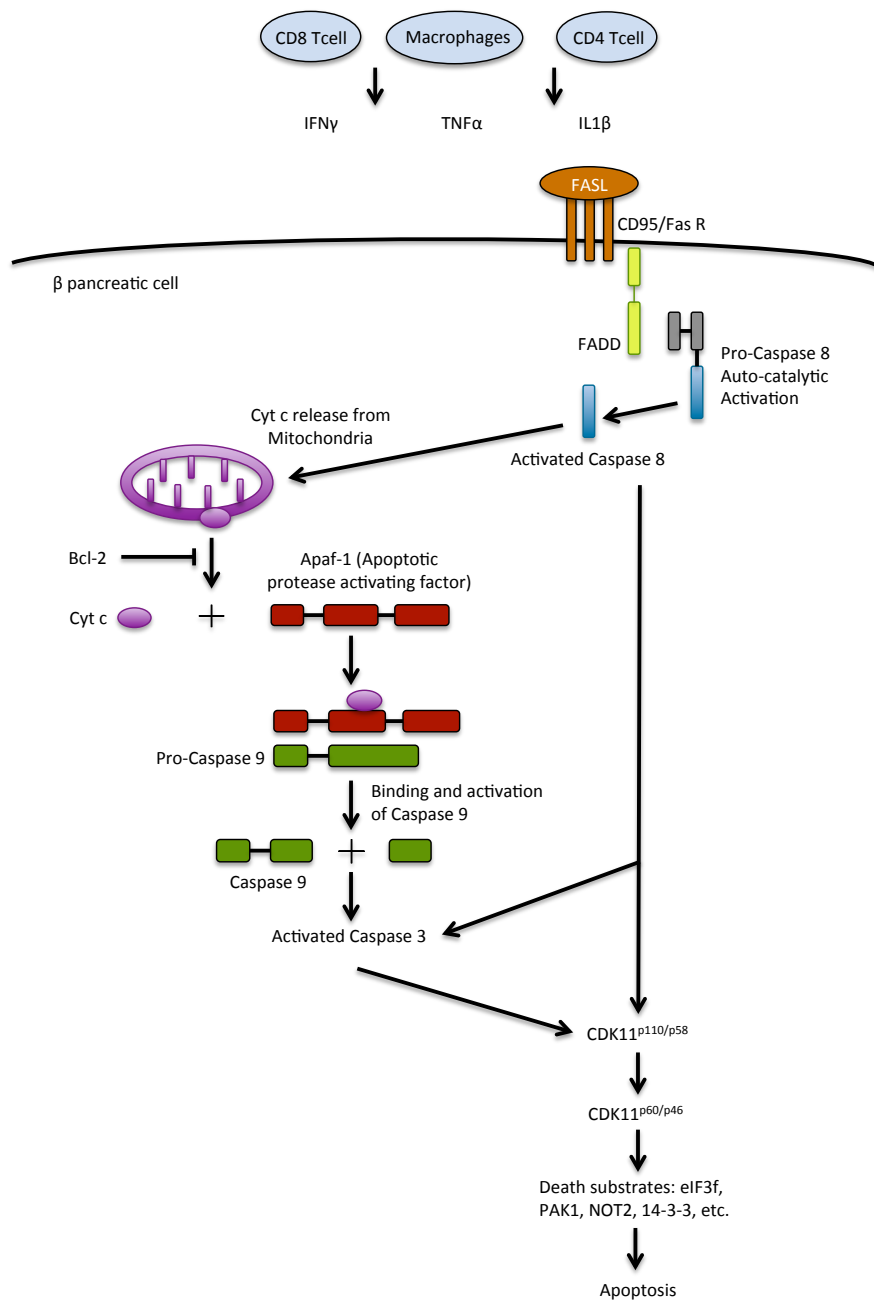


Figura 7-1: Model proposat per a la CDK11 en la via de senyalització de l'apoptosi de les cèl·lules beta pancreàtiques. Adaptat d'Ariza et al. (Ariza, Broome-Powell et al. 1999).

8 CONCLUSIÓ

La repressió de l'expressió de la CDK11 durant la progressió de l'atac autoimmune previ al debut de la T1D té un efecte protector sobre les cèl·lules beta contra l'apoptosi induïda per inflamació. Per tant, la CDK11 esdevé una diana terapèutica potencial per a la prevenció de la mort beta cel·lular.

BIBLIOGRAFIA

- Ahren, B. (2009). "Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes." Nat Rev Drug Discov 8(5): 369-385.
- Aizawa, T., M. Komatsu, N. Asanuma, Y. Sato and G. W. Sharp (1998). "Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell." Trends Pharmacol Sci 19(12): 496-499.
- Akerblom, H. K. and M. Knip (1998). "Putative environmental factors in Type 1 diabetes." Diabetes Metab Rev 14(1): 31-67.
- Akerblom, H. K., O. Vaarala, H. Hyoty, J. Ilonen and M. Knip (2002). "Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes." Am J Med Genet 115(1): 18-29.
- American Diabetes, A. (2012). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." Diabetes Care 35 Suppl 1: S64-71.
- Aribi, M. (2011). Autoimmunity and Immunotherapy. Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy. Croatia, InTech.
- Ariza, M. E., M. Broome-Powell, J. M. Lahti, V. J. Kidd and M. A. Nelson (1999). "Fas-induced apoptosis in human malignant melanoma cell lines is associated with the activation of the p34(cdc2)-related PITSLRE protein kinases." J Biol Chem 274(40): 28505-28513.
- Ashcroft, F. M., D. E. Harrison and S. J. Ashcroft (1984). "Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells." Nature 312(5993): 446-448.
- Bakker, S. F., M. E. Tushuizen, M. E. von Blomberg, C. J. Mulder and S. Simsek (2013). "Type 1 diabetes and celiac disease in adults: glycemic control and diabetic complications." Acta Diabetol 50(3): 319-324.
- Baldissera, F. G., J. J. Holst, S. Knuhtsen, L. Hilsted and O. V. Nielsen (1988). "Oxyntomodulin (glicentin-(33-69)): pharmacokinetics, binding to liver cell membranes, effects on isolated perfused pig pancreas, and secretion from isolated perfused lower small intestine of pigs." Regul Pept 21(1-2): 151-166.
- Barg, S., L. Eliasson, E. Renstrom and P. Rorsman (2002). "A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells." Diabetes 51 Suppl 1: S74-82.
- Barg, S., P. Huang, L. Eliasson, D. J. Nelson, S. Obermuller, P. Rorsman, F. Thevenod and E. Renstrom (2001). "Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl⁻ uptake and acidification." J Cell Sci 114(Pt 11): 2145-2154.
- Bataille, D., K. Tatemoto, C. Gespach, H. Jornvall, G. Rosselin and V. Mutt (1982). "Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon/oxyntomodulin) from porcine jejunum-ileum. Characterization of the peptide." FEBS Lett 146(1): 79-86.
- Baxter, A. G. and A. Cooke (1993). "Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice." Diabetes 42(11): 1574-1578.
- Beer, S. F., D. A. Heaton, K. G. Alberti, D. A. Pyke and R. D. Leslie (1990). "Impaired glucose tolerance precedes but does not predict insulin-dependent diabetes mellitus: a study of identical twins." Diabetologia 33(8): 497-502.
- Bell, G. I., S. Horita and J. H. Karam (1984). "A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus." Diabetes 33(2): 176-183.
- Bell, G. I., R. L. Pictet, W. J. Rutter, B. Cordell, E. Tischer and H. M. Goodman (1980). "Sequence of the human insulin gene." Nature 284(5751): 26-32.
- Bertram, R., J. Previte, A. Sherman, T. A. Kinard and L. S. Satin (2000). "The phantom burster model for pancreatic beta-cells." Biophys J 79(6): 2880-2892.
- Best, L., A. P. Yates and S. Tomlinson (1992). "Stimulation of insulin secretion by glucose in the absence of diminished potassium (86Rb⁺) permeability." Biochem Pharmacol 43(11): 2483-2485.
- Beyaert, R., V. J. Kidd, S. Cornelis, M. Van de Craen, G. Denecker, J. M. Lahti, R. Gururajan, P. Vandenabeele and W. Fiers (1997). "Cleavage of PITSLRE kinases by ICE/CASP-1 and CPP32/CASP-3 during apoptosis induced by tumor necrosis factor." J Biol Chem 272(18): 11694-11697.

- Bingley, P. J., P. Colman, G. S. Eisenbarth, R. A. Jackson, D. K. McCulloch, W. J. Riley and E. A. Gale (1992). "Standardization of IVGTT to predict IDDM." *Diabetes Care* **15**(10): 1313-1316.
- Bingley, P. J., A. J. Williams and E. A. Gale (1999). "Optimized autoantibody-based risk assessment in family members. Implications for future intervention trials." *Diabetes Care* **22**(11): 1796-1801.
- Bleich, D., R. A. Jackson, J. S. Soeldner and G. S. Eisenbarth (1990). "Analysis of metabolic progression to type I diabetes in ICA+ relatives of patients with type I diabetes." *Diabetes Care* **13**(2): 111-118.
- Bonner-Weir, S., W. C. Li, L. Ouziel-Yahalom, L. Guo, G. C. Weir and A. Sharma (2010). "Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story." *Diabetes* **59**(10): 2340-2348.
- Bonner-Weir, S. and A. Sharma (2002). "Pancreatic stem cells." *J Pathol* **197**(4): 519-526.
- Bosma, G. C., R. P. Custer and M. J. Bosma (1983). "A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse." *Nature* **301**(5900): 527-530.
- Boyle, P. J., S. D. Shah and P. E. Cryer (1989). "Insulin, glucagon, and catecholamines in prevention of hypoglycemia during fasting." *Am J Physiol* **256**(5 Pt 1): E651-661.
- Bratanova-Tochkova, T. K., H. Cheng, S. Daniel, S. Gunawardana, Y. J. Liu, J. Mulvaney-Musa, T. Schermerhorn, S. G. Straub, H. Yajima and G. W. Sharp (2002). "Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion." *Diabetes* **51 Suppl 1**: S83-90.
- Brink, S. J. (2004). *Insulin Therapy and Home Monitoring for Type 1 Diabetes Mellitus. Diabetes Mellitus: a fundamental and clinical text.* Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Bruining, G. J. (2000). "Association between infant growth before onset of juvenile type-1 diabetes and autoantibodies to IA-2. Netherlands Kolibrie study group of childhood diabetes." *Lancet* **356**(9230): 655-656.
- Bunnell, B. A., L. S. Heath, D. E. Adams, J. M. Lahti and V. J. Kidd (1990). "Increased expression of a 58-kDa protein kinase leads to changes in the CHO cell cycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(19): 7467-7471.
- Burgess, T. L. and R. B. Kelly (1987). "Constitutive and regulated secretion of proteins." *Annu Rev Cell Biol* **3**: 243-293.
- Butler, A. E., J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R. A. Rizza and P. C. Butler (2003). "Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes." *Diabetes* **52**(1): 102-110.
- Butler, P. C., J. J. Meier, A. E. Butler and A. Bhushan (2007). "The replication of beta cells in normal physiology, in disease and for therapy." *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**(11): 758-768.
- Cameron, M. J., G. A. Arreaza, P. Zucker, S. W. Chensue, R. M. Strieter, S. Chakrabarti and T. L. Delovitch (1997). "IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function." *J Immunol* **159**(10): 4686-4692.
- Campbell, J. E. and D. J. Drucker (2015). "Islet alpha cells and glucagon--critical regulators of energy homeostasis." *Nat Rev Endocrinol* **11**(6): 329-338.
- Chan, S. J., P. Keim and D. F. Steiner (1976). "Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(6): 1964-1968.
- Chen, S., X. Yin, X. Zhu, J. Yan, S. Ji, C. Chen, M. Cai, S. Zhang, H. Zong, Y. Hu, Z. Yuan, Z. Shen and J. Gu (2003). "The C-terminal kinase domain of the p34cdc2-related PITSLRE protein kinase (p110C) associates with p21-activated kinase 1 and inhibits its activity during anokis." *J Biol Chem* **278**(22): 20029-20036.
- Chera, S., D. Baronnier, L. Ghila, V. Cigliola, J. N. Jensen, G. Gu, K. Furuyama, F. Thorel, F. M. Gribble, F. Reimann and P. L. Herrera (2014). "Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic delta-cells into insulin producers." *Nature* **514**(7523): 503-507.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari and V. M. Dixit (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." *Cell* **81**(4): 505-512.
- Choi, H. H., H. K. Choi, S. Y. Jung, J. Hyle, B. J. Kim, K. Yoon, E. J. Cho, H. D. Youn, J. M. Lahti, J. Qin and S. T. Kim (2014). "CHK2 kinase promotes pre-mRNA splicing via phosphorylating CDK11(p110)." *Oncogene* **33**(1): 108-115.

- Christianson, S. W., L. D. Shultz and E. H. Leiter (1993). "Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors." *Diabetes* **42**(1): 44-55.
- Clarke, P. R. (1995). "Cyclin-dependent kinases. CAK-handed kinase activation." *Curr Biol* **5**(1): 40-42.
- Cobelli, C., G. M. Toffolo, C. Dalla Man, M. Campioni, P. Denti, A. Caumo, P. Butler and R. Rizza (2007). "Assessment of beta-cell function in humans, simultaneously with insulin sensitivity and hepatic extraction, from intravenous and oral glucose tests." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**(1): E1-E15.
- Cohen, M. A., S. M. Ellis, C. W. Le Roux, R. L. Batterham, A. Park, M. Patterson, G. S. Frost, M. A. Ghatei and S. R. Bloom (2003). "Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(10): 4696-4701.
- Colman, P. G., C. Steele, J. J. Couper, S. J. Beresford, T. Powell, K. Kewming, A. Pollard, S. Gellert, B. Tait, M. Honeyman and L. C. Harrison (2000). "Islet autoimmunity in infants with a Type I diabetic relative is common but is frequently restricted to one autoantibody." *Diabetologia* **43**(2): 203-209.
- Coppieters, K. T., A. Wiberg and M. G. von Herrath (2012). "Viral infections and molecular mimicry in type 1 diabetes." *APMIS* **120**(12): 941-949.
- Cornelis, S., Y. Bruynooghe, G. Denecker, S. Van Huffel, S. Tinton and R. Beyaert (2000). "Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site." *Mol Cell* **5**(4): 597-605.
- Crane, I. J. and J. V. Forrester (2005). "Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease." *Crit Rev Immunol* **25**(2): 75-102.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2009). "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" *Immunity* **30**(5): 626-635.
- Cushman, S. W. and L. J. Wardzala (1980). "Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane." *J Biol Chem* **255**(10): 4758-4762.
- Dahlquist, G. G., L. G. Blom, L. A. Persson, A. I. Sandstrom and S. G. Wall (1990). "Dietary factors and the risk of developing insulin dependent diabetes in childhood." *BMJ* **300**(6735): 1302-1306.
- Di Lorenzo, T. P., M. Peakman and B. O. Roep (2007). "Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes." *Clin Exp Immunol* **148**(1): 1-16.
- DiLorenzo, T. P., R. T. Graser, T. Ono, G. J. Christianson, H. D. Chapman, D. C. Roopenian, S. G. Nathenson and D. V. Serreze (1998). "Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for all but the end stages of diabetes development in nonobese diabetic mice and use a prevalent T cell receptor alpha chain gene rearrangement." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12538-12543.
- Dobbins, R. L., S. N. Davis, D. Neal, A. Caumo, C. Cobelli and A. D. Cherrington (1998). "Rates of glucagon activation and deactivation of hepatic glucose production in conscious dogs." *Metabolism* **47**(2): 135-142.
- Dorshkind, K., S. B. Pollack, M. J. Bosma and R. A. Phillips (1985). "Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid)." *J Immunol* **134**(6): 3798-3801.
- Drucker, D. J. (2007). "The role of gut hormones in glucose homeostasis." *J Clin Invest* **117**(1): 24-32.
- Dulic, V., E. Lees and S. I. Reed (1992). "Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase." *Science* **257**(5078): 1958-1961.
- Dyson, N. (1998). "The regulation of E2F by pRB-family proteins." *Genes Dev* **12**(15): 2245-2262.
- Ebert, L. M., P. Schaerli and B. Moser (2005). "Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues." *Mol Immunol* **42**(7): 799-809.
- Eizirik, D. L., A. K. Cardozo and M. Cnop (2008). "The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus." *Endocr Rev* **29**(1): 42-61.
- Eldor, R., A. Yeffet, K. Baum, V. Doviner, D. Amar, Y. Ben-Neriah, G. Christofori, A. Peled, J. C. Carel, C. Boitard, T. Klein, P. Serup, D. L. Eizirik and D. Melloul (2006). "Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(13): 5072-5077.

- Erllich, H. A., A. Zeidler, J. Chang, S. Shaw, L. J. Raffel, W. Klitz, Y. Beshkov, G. Costin, S. Pressman, T. Bugawan and et al. (1993). "HLA class II alleles and susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus in Mexican-American families." *Nat Genet* **3**(4): 358-364.
- Ewen, M. E., H. K. Sluss, C. J. Sherr, H. Matsushime, J. Kato and D. M. Livingston (1993). "Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins." *Cell* **73**(3): 487-497.
- Faerch, K., A. Vaag, J. J. Holst, C. Glumer, O. Pedersen and K. Borch-Johnsen (2008). "Impaired fasting glycaemia vs impaired glucose tolerance: similar impairment of pancreatic alpha and beta cell function but differential roles of incretin hormones and insulin action." *Diabetologia* **51**(5): 853-861.
- Federation, I. D. (2013). "IDF Diabetes Atlas." 6th. 2014, from <http://www.idf.org/atlasmap/atlasmap>.
- Feng, Y., M. E. Ariza, A. C. Goulet, J. Shi and M. A. Nelson (2005). "Death-signal-induced relocalization of cyclin-dependent kinase 11 to mitochondria." *Biochem J* **392**(Pt 1): 65-73.
- Feng, Y., W. Qi, J. Martinez and M. A. Nelson (2005). "The cyclin-dependent kinase 11 interacts with 14-3-3 proteins." *Biochem Biophys Res Commun* **331**(4): 1503-1509.
- Finegood, D. T., L. Scaglia and S. Bonner-Weir (1995). "Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model." *Diabetes* **44**(3): 249-256.
- Flodstrom, M., N. Welsh and D. L. Eizirik (1996). "Cytokines activate the nuclear factor kappa B (NF-kappa B) and induce nitric oxide production in human pancreatic islets." *FEBS Lett* **385**(1-2): 4-6.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-336.
- Foulis, A. K. (1996). "The pathology of the endocrine pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus." *APMIS* **104**(3): 161-167.
- Franck, N., E. Montembault, P. Rome, A. Pascal, J. Y. Cremet and R. Giet (2011). "CDK11(p58) is required for centriole duplication and Plk4 recruitment to mitotic centrosomes." *PLoS One* **6**(1): e14600.
- Frese, T. and H. Sandholzer (2013). The Epidemiology of Type 1 Diabetes Mellitus. *Type 1 Diabetes*. A. P. Escher and A. Li. Croatia, InTech.
- Fridlyand, L. E., N. Tamarina and L. H. Philipson (2003). "Modeling of Ca²⁺ flux in pancreatic beta-cells: role of the plasma membrane and intracellular stores." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**(1): E138-154.
- Frigerio, S., T. Junt, B. Lu, C. Gerard, U. Zumsteg, G. A. Hollander and L. Piali (2002). "Beta cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulinitis." *Nat Med* **8**(12): 1414-1420.
- Gamble, D. R. and K. W. Taylor (1969). "Seasonal incidence of diabetes mellitus." *Br Med J* **3**(5671): 631-633.
- García-Mayor, R. V. and A. Larrañaga (2011). Inadequated Coping Attitudes, Disordered Eating Behaviours and Eating Disorders in Type 1 Diabetic Patients. *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis and Alternative Treatments*. Spain, InTech.
- Gembal, M., P. Gilon and J. C. Henquin (1992). "Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells." *J Clin Invest* **89**(4): 1288-1295.
- German, M. (2004). Insulin gene regulation. *Diabetes Mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. Taylor and J. Olefsky. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins.
- German, M. S. (1993). "Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 1781-1785.
- Gianani, R. (2011). "Beta cell regeneration in human pancreas." *Semin Immunopathol* **33**(1): 23-27.
- Girard, F., U. Strausfeld, A. Fernandez and N. J. Lamb (1991). "Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts." *Cell* **67**(6): 1169-1179.
- Graser, R. T., T. P. DiLorenzo, F. Wang, G. J. Christianson, H. D. Chapman, D. C. Roopenian, S. G. Nathenson and D. V. Serreze (2000). "Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions." *J Immunol* **164**(7): 3913-3918.

Gruessner, A. C. (2011). "2011 update on pancreas transplantation: comprehensive trend analysis of 25,000 cases followed up over the course of twenty-four years at the International Pancreas Transplant Registry (IPTR)." Rev Diabet Stud **8**(1): 6-16.

Gruessner, A. C. and D. E. Sutherland (2001). "Analysis of United States (US) and non-US pancreas transplants reported to the United network for organ sharing (UNOS) and the international pancreas transplant registry (IPTR) as of October 2001." Clin Transpl: 41-72.

Gururajan, R., J. M. Lahti, J. Grenet, J. Easton, I. Gruber, P. F. Ambros and V. J. Kidd (1998). "Duplication of a genomic region containing the Cdc2L1-2 and MMP21-22 genes on human chromosome 1p36.3 and their linkage to D1Z2." Genome Res **8**(9): 929-939.

Hamaguchi, K., H. R. Gaskins and E. H. Leiter (1991). "NIT-1, a Pancreatic beta-Cell Line Established From a Transgenic NOD/Lt Mouse." Diabetes **40**.

Harjutsalo, V., L. Sjoberg and J. Tuomilehto (2008). "Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study." Lancet **371**(9626): 1777-1782.

Henquin, J. C. (2000). "Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose." Diabetes **49**(11): 1751-1760.

Hiemstra, H. S., N. C. Schloot, P. A. van Veelen, S. J. Willems, K. L. Franken, J. J. van Rood, R. R. de Vries, A. Chaudhuri, P. O. Behan, J. W. Drijfhout and B. O. Roep (2001). "Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3988-3991.

Hinke, S. A., K. Hellemans and F. C. Schuit (2004). "Plasticity of the beta cell insulin secretory competence: preparing the pancreatic beta cell for the next meal." J Physiol **558**(Pt 2): 369-380.

Hinke, S. A., M. F. Navedo, A. Ulman, J. L. Whiting, P. J. Nygren, G. Tian, A. J. Jimenez-Caliani, L. K. Langeberg, V. Cirulli, A. Tengholm, M. L. Dell'Acqua, L. F. Santana and J. D. Scott (2012). "Anchored phosphatases modulate glucose homeostasis." EMBO J **31**(20): 3991-4004.

Hiriart, M. and L. Aguilar-Bryan (2008). "Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(6): E1298-1306.

Hirsch, I. B., J. C. Marker, L. J. Smith, R. J. Spina, C. A. Parvin, J. O. Holloszy and P. E. Cryer (1991). "Insulin and glucagon in prevention of hypoglycemia during exercise in humans." Am J Physiol **260**(5 Pt 1): E695-704.

Hochegger, H., S. Takeda and T. Hunt (2008). "Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?" Nature **9**.

Hodge, S., G. Hodge, R. Flower, P. N. Reynolds, R. Scicchitano and M. Holmes (2002). "Up-regulation of production of TGF-beta and IL-4 and down-regulation of IL-6 by apoptotic human bronchial epithelial cells." Immunol Cell Biol **80**(6): 537-543.

Hoenig, M. and G. W. Sharp (1986). "Glucose induces insulin release and a rise in cytosolic calcium concentration in a transplantable rat insulinoma." Endocrinology **119**(6): 2502-2507.

Holohan, C., E. Szegezdi, T. Ritter, T. O'Brien and A. Samali (2008). "Cytokine-induced beta-cell apoptosis is NO-dependent, mitochondria-mediated and inhibited by BCL-XL." J Cell Mol Med **12**(2): 591-606.

Holst, J. J. (1980). "Evidence that glicentin contains the entire sequence of glucagon." Biochem J **187**(2): 337-343.

Holst, J. J. (1983). "Gut glucagon, enteroglucagon, gut glucagonlike immunoreactivity, glicentin-current status." Gastroenterology **84**(6): 1602-1613.

Holst, J. J. (2007). "The physiology of glucagon-like peptide 1." Physiol Rev **87**(4): 1409-1439.

Hoorens, A., G. Stange, D. Pavlovic and D. Pipeleers (2001). "Distinction between interleukin-1-induced necrosis and apoptosis of islet cells." Diabetes **50**(3): 551-557.

Horwitz, D. A., S. G. Zheng and J. D. Gray (2008). "Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other." Trends Immunol **29**(9): 429-435.

Houamed, K., J. Fu, M. William and L. H. Philipson (2004). Electrophysiology of the pancreatic b-cell. Diabetes Mellitus: a fundamental and clinical text. D. LeRoith, S. Taylor and J. Olefsky. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins.

- Howell, S. L. (1972). "Role of ATP in the intracellular translocation of proinsulin and insulin in the rat pancreatic B cell." *Nat New Biol* 235(55): 85-86.
- Hu, D., A. Mayeda, J. H. Trembley, J. M. Lahti and V. J. Kidd (2003). "CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing." *J Biol Chem* 278(10): 8623-8629.
- Hu, D., M. Valentine, V. J. Kidd and J. M. Lahti (2007). "CDK11(p58) is required for the maintenance of sister chromatid cohesion." *J Cell Sci* 120(Pt 14): 2424-2434.
- Hunter, T. and J. Pines (1994). "Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age." *Cell* 79(4): 573-582.
- Hurtley, S. M. and A. Helenius (1989). "Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum." *Annu Rev Cell Biol* 5: 277-307.
- Igoillo-Esteve, M., E. N. Gurzov, D. L. Eizirik and M. Cnop (2011). "The transcription factor B-cell lymphoma (BCL)-6 modulates pancreatic {beta}-cell inflammatory responses." *Endocrinology* 152(2): 447-456.
- Itoh, N., T. Hanafusa, A. Miyazaki, J. Miyagawa, K. Yamagata, K. Yamamoto, M. Waguri, A. Imagawa, S. Tamura, M. Inada and et al. (1993). "Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients." *J Clin Invest* 92(5): 2313-2322.
- Jahansouz, C., S. C. Kumer, M. Ellenbogen and K. L. Brayman (2011). "Evolution of beta-Cell Replacement Therapy in Diabetes Mellitus: Pancreas Transplantation." *Diabetes Technol Ther* 13(3): 395-418.
- Jarosz-Chobot, P., J. Polanska, A. Szadkowska, A. Kretowski, E. Bandurska-Stankiewicz, M. Ciechanowska, G. Deja, M. Mysliwiec, J. Peczynska, J. Rutkowska, A. Sobel-Maruniak, P. Fichna, A. Chobot and M. Rewers (2011). "Rapid increase in the incidence of type 1 diabetes in Polish children from 1989 to 2004, and predictions for 2010 to 2025." *Diabetologia* 54(3): 508-515.
- Jiang, G. and B. B. Zhang (2003). "Glucagon and regulation of glucose metabolism." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(4): E671-678.
- Jitrapakdee, S., A. Wutthisathapornchai, J. C. Wallace and M. J. MacDonald (2010). "Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling." *Diabetologia* 53(6): 1019-1032.
- Karvonen, M., J. Tuomilehto, I. Libman and R. LaPorte (1993). "A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group." *Diabetologia* 36(10): 883-892.
- Kataoka, S., J. Satoh, H. Fujiya, T. Toyota, R. Suzuki, K. Itoh and K. Kumagai (1983). "Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity." *Diabetes* 32(3): 247-253.
- Kato, J., H. Matsushime, S. W. Hiebert, M. E. Ewen and C. J. Sherr (1993). "Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4." *Genes Dev* 7(3): 331-342.
- Kelly, R. B. (1985). "Pathways of protein secretion in eukaryotes." *Science* 230(4721): 25-32.
- Kemmler, W. and D. F. Steiner (1970). "Conversion of proinsulin to insulin in a subcellular fraction from rat islets." *Biochem Biophys Res Commun* 41(5): 1223-1230.
- Khalil, I., L. d'Auriol, M. Gobet, L. Morin, V. Lepage, I. Deschamps, M. S. Park, L. Degos, F. Galibert and J. Hors (1990). "A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus." *J Clin Invest* 85(4): 1315-1319.
- Kida, K., Y. Kaino, T. Ito, H. Hirai and K. Nakamura (1999). "Immunogenetics of insulin-dependent diabetes mellitus." *Acta Paediatr Suppl* 88(427): 3-7.
- Kim, H. S., M. S. Han, K. W. Chung, S. Kim, E. Kim, M. J. Kim, E. Jang, H. A. Lee, J. Youn, S. Akira and M. S. Lee (2007). "Toll-like receptor 2 senses beta-cell death and contributes to the initiation of autoimmune diabetes." *Immunity* 27(2): 321-333.
- Kimpimaki, T. and M. Knip (2001). "Disease-associated autoantibodies as predictive markers of type 1 diabetes mellitus in siblings of affected children." *J Pediatr Endocrinol Metab* 14 Suppl 1: 575-587.

- King, C., A. Ilic, K. Koelsch and N. Sarvetnick (2004). "Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity." *Cell* **117**(2): 265-277.
- Kirkegaard, P., A. J. Moody, J. J. Holst, F. B. Loud, P. S. Olsen and J. Christiansen (1982). "Glicentin inhibits gastric acid secretion in the rat." *Nature* **297**(5862): 156-157.
- Kishimoto, H. and J. Sprent (2001). "A defect in central tolerance in NOD mice." *Nat Immunol* **2**(11): 1025-1031.
- Kleinclauss, F., S. Perruche, E. Masson, M. de Carvalho Bittencourt, S. Biichle, J. P. Remy-Martin, C. Ferrand, M. Martin, H. Bittard, J. M. Chalopin, E. Seilles, P. Tiberghien and P. Saas (2006). "Intravenous apoptotic spleen cell infusion induces a TGF-beta-dependent regulatory T-cell expansion." *Cell Death Differ* **13**(1): 41-52.
- Knip, M., R. Veijola, S. M. Virtanen, H. Hyöty, O. Vaarala and H. K. Akerblom (2005). "Environmental Triggers and Determinants of Type 1 Diabetes." *Diabetes* **54**.
- Knoechel, B., J. Lohr, E. Kahn, J. A. Bluestone and A. K. Abbas (2005). "Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen." *J Exp Med* **202**(10): 1375-1386.
- Ko, K. S., M. Lee, J. J. Koh and S. W. Kim (2001). "Combined administration of plasmids encoding IL-4 and IL-10 prevents the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice." *Mol Ther* **4**(4): 313-316.
- Koff, A., A. Giordano, D. Desai, K. Yamashita, J. W. Harper, S. Elledge, T. Nishimoto, D. O. Morgan, B. R. Franza and J. M. Roberts (1992). "Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle." *Science* **257**(5077): 1689-1694.
- Kohler, C. U., M. Olewinski, A. Tannapfel, W. E. Schmidt, H. Fritsch and J. J. Meier (2011). "Cell cycle control of beta-cell replication in the prenatal and postnatal human pancreas." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **300**(1): E221-230.
- Kwon, G., J. A. Corbett, C. P. Rodi, P. Sullivan and M. L. McDaniel (1995). "Interleukin-1 beta-induced nitric oxide synthase expression by rat pancreatic beta-cells: evidence for the involvement of nuclear factor kappa B in the signaling mechanism." *Endocrinology* **136**(11): 4790-4795.
- Kyvik, K. O., A. Green and H. Beck-Nielsen (1995). "Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins." *BMJ* **311**(7010): 913-917.
- Lafaille, J. J. (1998). "The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases." *Cytokine Growth Factor Rev* **9**(2): 139-151.
- Lahti, J. M., J. Xiang, L. S. Heath, D. Campana and V. J. Kidd (1995). "PITSLRE protein kinase activity is associated with apoptosis." *Mol Cell Biol* **15**(1): 1-11.
- Laybutt, D. R., A. M. Preston, M. C. Akerfeldt, J. G. Kench, A. K. Busch, A. V. Biankin and T. J. Biden (2007). "Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes." *Diabetologia* **50**(4): 752-763.
- Lazo de la Vega-Monroy, M. L. and C. Fernandez-Mejia (2011). *Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes. Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*. Croatia, InTech.
- Lee, K. H., K. W. Wucherpfennig and D. C. Wiley (2001). "Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes." *Nat Immunol* **2**(6): 501-507.
- Lee, M., S. Liu, W. Lee and C. Liu (2011). *In Vivo Monitoring of Inflammation and Regulation in Type 1 Diabetes. Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*. Croatia, InTech.
- Lees, E. (1995). "Cyclin dependent kinase regulation." *Curr Opin Cell Biol* **7**(6): 773-780.
- Leiter, E. H., P. Reifsnyder, J. Driver, S. Kamdar, C. Choisy-Rossi, D. V. Serreze, M. Hara and A. Chervonsky (2007). "Unexpected functional consequences of xenogeneic transgene expression in beta-cells of NOD mice." *Diabetes Obes Metab* **9 Suppl 2**: 14-22.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell* **91**(4): 479-489.
- Li, T., A. Inoue, J. M. Lahti and V. J. Kidd (2004). "Failure to proliferate and mitotic arrest of CDK11-Null mutant mice at the blastocyst stage of embryonic cell development." *Molecular and Cellular Biology* **24**(8): 3188-3197.

- Lipton, R. B., M. Drum, S. A. Greeley, K. K. Danielson, G. I. Bell and W. A. Hagopian (2011). "HLA-DQ haplotypes differ by ethnicity in patients with childhood-onset diabetes." *Pediatr Diabetes* **12**(4 Pt 2): 388-395.
- Liu, X., C. Cheng, B. Shao, X. Wu, Y. Ji, X. Lu and A. Shen (2013). "LPS-stimulating astrocyte-conditioned medium causes neuronal apoptosis via increasing CDK11(p58) expression in PC12 cells through downregulating AKT pathway." *Cell Mol Neurobiol* **33**(6): 779-787.
- Liu, Y. and C. A. Janeway, Jr. (1990). "Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance." *J Exp Med* **172**(6): 1735-1739.
- Loyer, P., J. H. Trembley, J. M. Lahti and V. J. Kidd (1998). "The RNP protein, RNPS1, associates with specific isoforms of the p34cdc2-related PITSLRE protein kinase in vivo." *J Cell Sci* **111** (Pt 11): 1495-1506.
- Lumelsky, N., O. Blondel, P. Laeng, I. Velasco, R. Ravin and R. McKay (2001). "Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets." *Science* **292**(5520): 1389-1394.
- Makino, S., K. Kunitomo, Y. Muraoka and K. Katagiri (1981). "Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse." *Jikken Dobutsu* **30**(2): 137-140.
- Makino, S., K. Kunitomo, Y. Muraoka, Y. Mizushima, K. Katagiri and Y. Tochino (1980). "Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice." *Jikken Dobutsu* **29**(1): 1-13.
- Malek, T. R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli and L. Kong (2002). "CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2." *Immunity* **17**(2): 167-178.
- Malhotra, J. D. and R. J. Kaufman (2007). "Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?" *Antioxid Redox Signal* **9**(12): 2277-2293.
- Maree, A. F., M. Komba, C. Dyck, M. Labecki, D. T. Finegood and L. Edelstein-Keshet (2005). "Quantifying macrophage defects in type 1 diabetes." *J Theor Biol* **233**(4): 533-551.
- Markees, T. G., D. V. Serreze, N. E. Phillips, C. H. Sorli, E. J. Gordon, L. D. Shultz, R. J. Noelle, B. A. Woda, D. L. Greiner, J. P. Mordes and A. A. Rossini (1999). "NOD mice have a generalized defect in their response to transplantation tolerance induction." *Diabetes* **48**(5): 967-974.
- Marker, J. C., I. B. Hirsch, L. J. Smith, C. A. Parvin, J. O. Holloszy and P. E. Cryer (1991). "Catecholamines in prevention of hypoglycemia during exercise in humans." *Am J Physiol* **260**(5 Pt 1): E705-712.
- Marzban, L., A. Tomas, T. C. Becker, L. Rosenberg, J. Oberholzer, P. E. Fraser, P. A. Halban and C. B. Verchere (2008). "Small interfering RNA-mediated suppression of proislet amyloid polypeptide expression inhibits islet amyloid formation and enhances survival of human islets in culture." *Diabetes* **57**(11): 3045-3055.
- Massoud, A. and A. H. MAssoud (2012). Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmune Disease - Contributing Factors, Specific Cases of Autoimmune Diseases, and Stem Cell and Other Therapies*. J. Chan, InTech: 402.
- Matschinsky, F. M. (1996). "Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm." *Diabetes* **45**(2): 223-241.
- McIntosh, C. H., S. Widenmaier and S. J. Kim (2009). "Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (Gastric Inhibitory Polypeptide; GIP)." *Vitam Horm* **80**: 409-471.
- McIntosh, C. H., S. Widenmaier and S. J. Kim (2010). "Pleiotropic actions of the incretin hormones." *Vitam Horm* **84**: 21-79.
- Mikolajczyk, M. and M. A. Nelson (2004). "Regulation of stability of cyclin-dependent kinase CDK11p110 and a caspase-processed form, CDK11p46, by Hsp90." *Biochem J* **384**(Pt 3): 461-467.
- Moltchanova, E. V., N. Schreier, N. Lammi and M. Karvonen (2009). "Seasonal variation of diagnosis of Type 1 diabetes mellitus in children worldwide." *Diabet Med* **26**(7): 673-678.
- Moore, F., N. Naamane, M. L. Colli, T. Bouckenooghe, F. Ortis, E. N. Gurzov, M. Igoillo-Esteve, C. Mathieu, G. Bontempi, T. Thykjaer, T. F. Orntoft and D. L. Eizirik (2011). "STAT1 is a master regulator of pancreatic {beta}-cell apoptosis and islet inflammation." *J Biol Chem* **286**(2): 929-941.
- Morel, P., F. C. Goetz, K. Moudry-Munns, E. Freier and D. E. Sutherland (1991). "Long-term glucose control in patients with pancreatic transplants." *Ann Intern Med* **115**(9): 694-699.

- Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." *Nature* **374**(6518): 131-134.
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-291.
- Murphy, K., P. Travers and M. Walport (2008). *Janeway's immunobiology*. New York, USA, Garland Science.
- Nacu, N., I. G. Luzina, K. Highsmith, V. Locketell, K. Pochetuhen, Z. A. Cooper, M. P. Gillmeister, N. W. Todd and S. P. Atamas (2008). "Macrophages produce TGF-beta-induced (beta-ig-h3) following ingestion of apoptotic cells and regulate MMP14 levels and collagen turnover in fibroblasts." *J Immunol* **180**(7): 5036-5044.
- Nagata, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor." *Science* **267**(5203): 1449-1456.
- Nauck, M. A., E. Homberger, E. G. Siegel, R. C. Allen, R. P. Eaton, R. Ebert and W. Creutzfeldt (1986). "Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses." *J Clin Endocrinol Metab* **63**(2): 492-498.
- Nepom, G. T. and W. W. Kwok (1998). "Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM." *Diabetes* **47**(8): 1177-1184.
- Nerup, J., P. Platz, O. O. Andersen, M. Christy, J. Lyngsoe, J. E. Poulsen, L. P. Ryder, L. S. Nielsen, M. Thomsen and A. Svejgaard (1974). "HL-A antigens and diabetes mellitus." *Lancet* **2**(7885): 864-866.
- Nigg, E. A. (1995). "Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle." *Bioessays* **17**(6): 471-480.
- Noble, J. A., A. M. Valdes, M. Cook, W. Klitz, G. Thomson and H. A. Erlich (1996). "The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families." *Am J Hum Genet* **59**(5): 1134-1148.
- Norris, J. M. (2010). "Infant and childhood diet and type 1 diabetes risk: recent advances and prospects." *Curr Diab Rep* **10**(5): 345-349.
- Notkins, A. L. and A. Lernmark (2001). "Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues." *J Clin Invest* **108**(9): 1247-1252.
- Novelli, F., M. Giovarelli, R. Reber-Liske, G. Virgallita, G. Garotta and G. Forni (1991). "Blockade of physiologically secreted IFN-gamma inhibits human T lymphocyte and natural killer cell activation." *J Immunol* **147**(4): 1445-1452.
- Novials, A., J. C. Jimenez-Chillaron, C. Franco, R. Casamitjana, R. Gomis and A. M. Gomez-Foix (1998). "Reduction of islet amylin expression and basal secretion by adenovirus-mediated delivery of amylin antisense cDNA." *Pancreas* **17**(2): 182-186.
- Nurse, P. (1994). "Ordering S phase and M phase in the cell cycle." *Cell* **79**(4): 547-550.
- O'Brien, B. A., Y. Huang, X. Geng, J. P. Dutz and D. T. Finegood (2002). "Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD mice is reduced." *Diabetes* **51**(8): 2481-2488.
- Ogasawara, K., J. A. Hamerman, H. Hsin, S. Chikuma, H. Bour-Jordan, T. Chen, T. Pertel, C. Carnaud, J. A. Bluestone and L. L. Lanier (2003). "Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice." *Immunity* **18**(1): 41-51.
- Ohtsubo, M. and J. M. Roberts (1993). "Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts." *Science* **259**(5103): 1908-1912.
- Olofsson, C. S., S. O. Gopel, S. Barg, J. Galvanovskis, X. Ma, A. Salehi, P. Rorsman and L. Eliasson (2002). "Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells." *Pflugers Arch* **444**(1-2): 43-51.
- Orci, L., M. Ravazzola, M. J. Storch, R. G. Anderson, J. D. Vassalli and A. Perrelet (1987). "Proteolytic maturation of insulin is a post-Golgi event which occurs in acidifying clathrin-coated secretory vesicles." *Cell* **49**(6): 865-868.
- Ortis, F., A. K. Cardozo, D. Crispim, J. Storling, T. Mandrup-Poulsen and D. L. Eizirik (2006). "Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor-kappaB activation." *Mol Endocrinol* **20**(8): 1867-1879.
- Ortis, F., P. Pirot, N. Naamane, A. Y. Kreins, J. Rasschaert, F. Moore, E. Theatre, C. Verhaeghe, N. E. Magnusson, A. Chariot, T. F. Orntoft and D. L. Eizirik (2008). "Induction of nuclear factor-kappaB and its downstream genes by TNF-alpha and IL-1beta has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells." *Diabetologia* **51**(7): 1213-1225.

- Ostman, J., G. Lonnberg, H. J. Arnqvist, G. Blohme, J. Bolinder, A. Ekblom Schnell, J. W. Eriksson, S. Gudbjornsdottir, G. Sundkvist and L. Nystrom (2008). "Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983-2002." *J Intern Med* **263**(4): 386-394.
- Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge and G. Draetta (1992). "Cyclin A is required at two points in the human cell cycle." *EMBO J* **11**(3): 961-971.
- Pardee, A. B. (1974). "A restriction point for control of normal animal cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(4): 1286-1290.
- Paty, B. W., E. A. Ryan, J. R. T. Lakey and A. M. J. Shapiro (2004). *Islet Transplantation. Diabetes Mellitus: a fundamental and clinical text*. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Pavletich, N. P. (1999). "Mechanisms of Cyclin-dependent Kinase Regulation: Structures of Cdks, their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors." *J. Mol. Biol.* **287**: 821-828.
- Peterson, J. D., B. Pike, M. McDuffie and K. Haskins (1994). "Islet-specific T cell clones transfer diabetes to nonobese diabetic (NOD) F1 mice." *J Immunol* **153**(6): 2800-2806.
- Petretti, C., M. Savoian, E. Montebault, D. M. Glover, C. Prigent and R. Giet (2006). "The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation." *EMBO Rep* **7**(4): 418-424.
- Pfeffer, S. R. and J. E. Rothman (1987). "Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi." *Annu Rev Biochem* **56**: 829-852.
- Pietropaolo, M., D. J. Becker, R. E. LaPorte, J. S. Dorman, S. Riboni, W. A. Rudert, S. Mazumdar and M. Trucco (2002). "Progression to insulin-requiring diabetes in seronegative prediabetic subjects: the role of two HLA-DQ high-risk haplotypes." *Diabetologia* **45**(1): 66-76.
- Pileggi, A., R. Alejandro, D. H. Mintz, C. Ricordi and N. S. Kenyon (2004). *Islet Cell Transplantation. Diabetes Mellitus: a fundamental and clinical text*. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Pozzilli, P., A. Signore, A. J. Williams and P. E. Beales (1993). "NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures." *Immunol Today* **14**(5): 193-196.
- Proks, P., L. Eliasson, C. Ammala, P. Rorsman and F. M. Ashcroft (1996). "Ca(2+)- and GTP-dependent exocytosis in mouse pancreatic beta-cells involves both common and distinct steps." *J Physiol* **496 (Pt 1)**: 255-264.
- Pugliese, A., R. Gianani, R. Moromiso, Z. L. Awdeh, C. A. Alper, H. A. Erlich, R. A. Jackson and G. S. Eisenbarth (1995). "HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM." *Diabetes* **44**(6): 608-613.
- Pugliese, A., M. Zeller, A. Fernandez, Jr., L. J. Zalcberg, R. J. Bartlett, C. Ricordi, M. Pietropaolo, G. S. Eisenbarth, S. T. Bennett and D. D. Patel (1997). "The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes." *Nat Genet* **15**(3): 293-297.
- Quelle, D. E., R. A. Ashmun, S. A. Shurtleff, J. Y. Kato, D. Bar-Sagi, M. F. Roussel and C. J. Sherr (1993). "Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts." *Genes Dev* **7**(8): 1559-1571.
- Rabinovitch, A. (1994). "Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation?" *Diabetes* **43**(5): 613-621.
- Ranuncoli, A., N. Cautero, C. Ricordi, M. Masetti, R. D. Molano, L. Inverardi, R. Alejandro and N. S. Kenyon (2000). "Islet cell transplantation: in vivo and in vitro functional assessment of nonhuman primate pancreatic islets." *Cell Transplant* **9**(3): 409-414.
- Redondo, M. J. and F. Gómez-Peralta (2006). *De la susceptibilidad al debut clínico. Historia natural de la diabetes tipo 1 antes del diagnóstico. Prediabetes y diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico*. Spain.
- Reiner, S. L., S. Zheng, D. B. Corry and R. M. Locksley (1993). "Constructing polycompetitor cDNAs for quantitative PCR." *J Immunol Methods* **165**(1): 37-46.
- Resnitzky, D., M. Gossen, H. Bujard and S. I. Reed (1994). "Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1669-1679.

- Rhodes, C. J. (2004). Processing of the insulin molecule. *Diabetes Mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. Taylor and J. Olefsky. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Rhodes, C. J., C. A. Lucas, R. L. Mutkoski, L. Orci and P. A. Halban (1987). "Stimulation by ATP of proinsulin to insulin conversion in isolated rat pancreatic islet secretory granules. Association with the ATP-dependent proton pump." *J Biol Chem* **262**(22): 10712-10717.
- Riedl, S. J. and G. S. Salvesen (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 405-413.
- Robertson, R. P., C. Davis, J. Larsen, R. Stratta and D. E. Sutherland (2000). "Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes." *Diabetes Care* **23**(1): 112-116.
- Robertson, R. P., D. E. Sutherland and K. J. Lanz (1999). "Normoglycemia and preserved insulin secretory reserve in diabetic patients 10-18 years after pancreas transplantation." *Diabetes* **48**(9): 1737-1740.
- Roivainen, M. and K. Klingel (2010). "Virus infections and type 1 diabetes risk." *Curr Diab Rep* **10**(5): 350-356.
- Rosen, S. G., W. E. Clutter, M. A. Berk, S. D. Shah and P. E. Cryer (1984). "Epinephrine supports the postabsorptive plasma glucose concentration and prevents hypoglycemia when glucagon secretion is deficient in man." *J Clin Invest* **73**(2): 405-411.
- Saavedra-Ávila, N. A., U. Sengupta, B. Sánchez, E. Sala, L. Haba, T. Stratmann, J. Verdaguer, D. Mauricio, B. Mezquita, A. B. Roperio, A. Nadal and C. Mora (2014). "Cyclin D3 promotes pancreatic β cell fitness and viability in a cell cycle-independent manner, and is targeted in autoimmune diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **11**(33).
- Sachs, N. A. and R. R. Vaillancourt (2003). "Cyclin-dependent kinase 11(p110) activity in the absence of CK2." *Biochim Biophys Acta* **1624**(1-3): 98-108.
- Sadlack, B., H. Merz, H. Schorle, A. Schimpl, A. C. Feller and I. Horak (1993). "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene." *Cell* **75**(2): 253-261.
- Sakaguchi, S., R. Setoguchi, H. Yagi and T. Nomura (2006). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease." *Curr Top Microbiol Immunol* **305**: 51-66.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe and J. A. Bluestone (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* **12**(4): 431-440.
- Samali, A., B. Zhivotovsky, D. Jones, S. Nagata and S. Orrenius (1999). "Apoptosis: cell death defined by caspase activation." *Cell Death Differ* **6**(6): 495-496.
- Sato, Y., T. Aizawa, M. Komatsu, N. Okada and T. Yamada (1992). "Dual functional role of membrane depolarization/Ca²⁺ influx in rat pancreatic B-cell." *Diabetes* **41**(4): 438-443.
- Saunders, K. A., T. Raine, A. Cooke and C. E. Lawrence (2007). "Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection." *Infect Immun* **75**(1): 397-407.
- Seino, S., T. Shibasaki and K. Minami (2011). "Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes." *J Clin Invest* **121**(6): 2118-2125.
- Serrano, M. (1997). "The tumor suppressor protein p16INK4a." *Exp Cell Res* **237**(1): 7-13.
- Serreze, D. V., J. W. Gaedeke and E. H. Leiter (1993). "Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/Lt mice: defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9625-9629.
- Serreze, D. V. and E. H. Leiter (2001). "Genes and cellular requirements for autoimmune diabetes susceptibility in nonobese diabetic mice." *Curr Dir Autoimmun* **4**: 31-67.
- Sharif, S., G. A. Arreaza, P. Zucker and T. L. Delovitch (2002). "Regulatory natural killer T cells protect against spontaneous and recurrent type 1 diabetes." *Ann N Y Acad Sci* **958**: 77-88.
- Sherman, A. (1996). "Contributions of modeling to understanding stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells." *Am J Physiol* **271**(2 Pt 1): E362-372.
- Sherman, A., J. Rinzel and J. Keizer (1988). "Emergence of organized bursting in clusters of pancreatic beta-cells by channel sharing." *Biophys J* **54**(3): 411-425.

- Sherr, C. J. (1993). "Mammalian G1 cyclins." *Cell* **73**(6): 1059-1065.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1995). "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases." *Genes Dev* **9**(10): 1149-1163.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* **13**(12): 1501-1512.
- Shi, J., J. W. Hershey and M. A. Nelson (2009). "Phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 3f by cyclin-dependent kinase 11 during apoptosis." *FEBS Lett* **583**(6): 971-977.
- Shi, J. and M. A. Nelson (2005). "The cyclin-dependent kinase 11 interacts with NOT2." *Biochem Biophys Res Commun* **334**: 1310-1316.
- Silveira, P. A., D. V. Serreze and S. T. Grey (2007). "Invasion of the killer B's in type 1 diabetes." *Front Biosci* **12**: 2183-2193.
- Skelin, M., M. Rupnik and A. Cencic (2010). "Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research." *ALTEX* **27**(2): 105-113.
- Solomon, M. J., T. Lee and M. W. Kirschner (1992). "Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase." *Mol Biol Cell* **3**(1): 13-27.
- Stassi, G., R. De Maria, G. Trucco, W. Rudert, R. Testi, A. Galluzzo, C. Giordano and M. Trucco (1997). "Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus." *J Exp Med* **186**(8): 1193-1200.
- Stassi, G., M. Todaro, P. Richiusa, M. Giordano, A. Mattina, M. S. Sbriglia, A. Lo Monte, G. Buscemi, A. Galluzzo and C. Giordano (1995). "Expression of apoptosis-inducing CD95 (Fas/Apo-1) on human beta-cells sorted by flow-cytometry and cultured in vitro." *Transplant Proc* **27**(6): 3271-3275.
- Steiner, D. F., S. J. Chan, J. M. Welsh and S. C. Kwok (1985). "Structure and evolution of the insulin gene." *Annu Rev Genet* **19**: 463-484.
- Steinman, L. (1996). "A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6): 2253-2256.
- Stene, L. C. and E. A. Gale (2013). "The prenatal environment and type 1 diabetes." *Diabetologia* **56**(9): 1888-1897.
- Straub, S. G. and G. W. Sharp (2004). The two phases of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes Mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. Taylor and J. Olefsky. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Suarez-Pinzon, W. L. and A. Rabinovitch (2001). "Approaches to type 1 diabetes prevention by intervention in cytokine immunoregulatory circuits." *Int J Exp Diabetes Res* **2**(1): 3-17.
- Suzuki, H., T. M. Kundig, C. Furlonger, A. Wakeham, E. Timms, T. Matsuyama, R. Schmits, J. J. Simard, P. S. Ohashi, H. Griesser and et al. (1995). "Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta." *Science* **268**(5216): 1472-1476.
- Suzuki, K. and T. Kono (1980). "Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(5): 2542-2545.
- Taborsky, G. J., Jr., B. Ahren and P. J. Havel (1998). "Autonomic mediation of glucagon secretion during hypoglycemia: implications for impaired alpha-cell responses in type 1 diabetes." *Diabetes* **47**(7): 995-1005.
- Taguchi, N., T. Aizawa, Y. Sato, F. Ishihara and K. Hashizume (1995). "Mechanism of glucose-induced biphasic insulin release: physiological role of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel-independent glucose action." *Endocrinology* **136**(9): 3942-3948.
- Takeda, K. and S. Akira (2000). "STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses." *Cytokine Growth Factor Rev* **11**(3): 199-207.
- Temajo, N. O. and N. Howard (2014). "The mosaic of environment involvement in autoimmunity: the abrogation of viral latency by stress, a non-infectious environmental agent, is an intrinsic prerequisite prelude before viruses can rank as infectious environmental agents that trigger autoimmune diseases." *Autoimmun Rev* **13**(6): 635-640.
- Thomas, R. (2010). "The balancing act of autoimmunity: central and peripheral tolerance versus infection control." *Int Rev Immunol* **29**(2): 211-233.

- Thorel, F., V. Nepote, I. Avril, K. Kohno, R. Desgraz, S. Chera and P. L. Herrera (2010). "Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss." *Nature* **464**(7292): 1149-1154.
- Thorvaldson, L., S. E. Johansson, P. Hoglund and S. Sandler (2005). "Impact of plastic adhesion in vitro on analysis of Th1 and Th2 cytokines and immune cell distribution from mice with multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes." *J Immunol Methods* **307**(1-2): 73-81.
- Toyoda, H., S. Takei and B. Formby (1996). "Effect of 5-alpha dihydrotestosterone on T-cell proliferation of the female nonobese diabetic mouse." *Proc Soc Exp Biol Med* **213**(3): 287-293.
- Trembley, J. H., D. Hu, L. C. Hsu, C. Y. Yeung, C. Slaughter, J. M. Lahti and V. J. Kidd (2002). "PITSLRE p110 protein kinases associate with transcription complexes and affect their activity." *J Biol Chem* **277**(4): 2589-2596.
- Trembley, J. H., D. Hu, C. A. Slaughter, J. M. Lahti and V. J. Kidd (2003). "Casein kinase 2 interacts with cyclin-dependent kinase 11 (CDK11) in vivo and phosphorylates both the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain and CDK11 in vitro." *J Biol Chem* **278**(4): 2265-2270.
- Trembley, J. H., P. Loyer, D. Hu, T. Li, J. Grenet, J. M. Lahti and V. J. Kidd (2004). "Cyclin dependent kinase 11 in RNA transcription and splicing." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **77**: 263-288.
- Tse, T. F., W. E. Clutter, S. D. Shah and P. E. Cryer (1983). "Mechanisms of postprandial glucose counterregulation in man. Physiologic roles of glucagon and epinephrine vis-a-vis insulin in the prevention of hypoglycemia late after glucose ingestion." *J Clin Invest* **72**(1): 278-286.
- Turley, S., L. Poirot, M. Hattori, C. Benoist and D. Mathis (2003). "Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model." *J Exp Med* **198**(10): 1527-1537.
- Tyers, M. and P. Jorgensen (2000). "Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy." *Curr Opin Genet Dev* **10**(1): 54-64.
- Unger, R. H., A. Ohneda, I. Valverde, A. M. Eisentraut and J. Exton (1968). "Characterization of the responses of circulating glucagon-like immunoreactivity to intraduodenal and intravenous administration of glucose." *J Clin Invest* **47**(1): 48-65.
- Vafiadis, P., S. T. Bennett, J. A. Todd, J. Nadeau, R. Grabs, C. G. Goodyer, S. Wickramasinghe, E. Colle and C. Polychronakos (1997). "Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus." *Nat Genet* **15**(3): 289-292.
- Verge, C. F., R. Gianani, E. Kawasaki, L. Yu, M. Pietropaolo, R. A. Jackson, H. P. Chase and G. S. Eisenbarth (1996). "Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies." *Diabetes* **45**(7): 926-933.
- Verheul, H. A., M. Verveld, S. Hoefakker and A. H. Schuurs (1995). "Effects of ethinylestradiol on the course of spontaneous autoimmune disease in NZB/W and NOD mice." *Immunopharmacol Immunotoxicol* **17**(1): 163-180.
- Vidal, A. and A. Koff (2000). "Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause." *Gene* **247**(1-2): 1-15.
- Vincenz, L., E. Szegezdi, R. Jäger, C. Holohan, T. O'Brien and A. Samali (2011). Cytokine-Induced β -Cell Stress and Death in Type 1 Diabetes Mellitus. *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis and Alternative Treatments*. Croatia, InTech.
- Wakayama, T., V. Tabar, I. Rodriguez, A. C. Perry, L. Studer and P. Mombaerts (2001). "Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer." *Science* **292**(5517): 740-743.
- Wang, B., Y. B. Geng and C. R. Wang (2001). "CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes." *J Exp Med* **194**(3): 313-320.
- Wang, Z., P. Sicinski, R. A. Weinberg, Y. Zhang and K. Ravid (1996). "Characterization of the mouse cyclin D3 gene: exon/intron organization and promoter activity." *Genomics* **35**(1): 156-163.
- Welsh, N., D. L. Eizirik and S. Sandler (1994). "Nitric oxide and pancreatic beta-cell destruction in insulin dependent diabetes mellitus: don't take NO for an answer." *Autoimmunity* **18**(4): 285-290.
- Wen, L., E. A. Green, T. Stratmann, A. Panosa, R. Gomis, E. E. Eynon, R. A. Flavell, J. A. Mezquita and C. Mora (2011). "In vivo diabetogenic action of CD4+ T lymphocytes requires Fas expression and is independent of IL-1 and IL-18." *Eur J Immunol* **41**(5): 1344-1351.

- Wen, L., R. E. Ley, P. Y. Volchkov, P. B. Stranges, L. Avanesyan, A. C. Stonebraker, C. Hu, F. S. Wong, G. L. Szot, J. A. Bluestone, J. I. Gordon and A. V. Chervonsky (2008). "Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes." *Nature* **455**(7216): 1109-1113.
- Wewer Albrechtsen, N. J., B. Hartmann, S. Veedfald, J. A. Windelov, A. Plamboeck, K. N. Bojsen-Moller, T. Idorn, B. Feldt-Rasmussen, F. K. Knop, T. Vilsboll, S. Madsbad, C. F. Deacon and J. J. Holst (2014). "Hyperglucagonaemia analysed by glucagon sandwich ELISA: nonspecific interference or truly elevated levels?" *Diabetologia* **57**(9): 1919-1926.
- Wicker, L. S., J. A. Todd and L. B. Peterson (1995). "Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse." *Annu Rev Immunol* **13**: 179-200.
- Wilker, E. W., M. A. van Vugt, S. A. Artim, P. H. Huang, C. P. Petersen, H. C. Reinhardt, Y. Feng, P. A. Sharp, N. Sonenberg, F. M. White and M. B. Yaffe (2007). "14-3-3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis." *Nature* **446**(7133): 329-332.
- Willerford, D. M., J. Chen, J. A. Ferry, L. Davidson, A. Ma and F. W. Alt (1995). "Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment." *Immunity* **3**(4): 521-530.
- Wiltgen, M. and G. P. Tilz (2012). The role of the antigen GAD 65 in diabetes mellitus type 1: A Molecular Analysis. *Autoimmune Diseases - Contributing Factors, Specific Cases of Autoimmune Diseases, and Stem Cell and Other Therapies*. J. Chan, InTech.
- Wiser, O., M. Trus, A. Hernandez, E. Renstrom, S. Barg, P. Rorsman and D. Atlas (1999). "The voltage sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1): 248-253.
- Wollheim, C. B. and G. W. Sharp (1981). "Regulation of insulin release by calcium." *Physiol Rev* **61**(4): 914-973.
- Wong, F. S. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse." *Res Immunol* **148**(5): 327-332.
- Wong, F. S., I. Visintin, L. Wen, R. A. Flavell and C. A. Janeway, Jr. (1996). "CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells." *J Exp Med* **183**(1): 67-76.
- Wong, F. S., I. Visintin, L. Wen, J. Granata, R. Flavell and C. A. Janeway (1998). "The role of lymphocyte subsets in accelerated diabetes in nonobese diabetic-rat insulin promoter-B7-1 (NOD-RIP-B7-1) mice." *J Exp Med* **187**(12): 1985-1993.
- Xiang, J., J. M. Lahti, J. Grenet, J. Easton and V. J. Kidd (1994). "Molecular cloning and expression of alternatively spliced PITSLRE protein kinase isoforms." *J Biol Chem* **269**(22): 15786-15794.
- Yamada, K., N. Takane-Gyotoku, X. Yuan, F. Ichikawa, C. Inada and K. Nonaka (1996). "Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas." *Diabetologia* **39**(11): 1306-1312.
- Yang, L., N. Li, C. Wang, Y. Yu, L. Yuan, M. Zhang and X. Cao (2004). "Cyclin L2, a novel RNA polymerase II-associated cyclin, is involved in pre-mRNA splicing and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells." *J Biol Chem* **279**(12): 11639-11648.
- Yang, Y. and P. Santamaria (2006). "Lessons on autoimmune diabetes from animal models." *Clin Sci (Lond)* **110**(6): 627-639.
- Yokoyama, H., O. J. Gruss, S. Rybina, M. Caudron, M. Schelder, M. Wilm, I. W. Mattaj and E. Karsenti (2008). "Cdk11 is a RanGTP-dependent microtubule stabilization factor that regulates spindle assembly rate." *J Cell Biol* **180**(5): 867-875.
- Yoon, J. W. (1991). "Role of viruses in the pathogenesis of IDDM." *Ann Med* **23**(4): 437-445.
- Yoon, J. W. and H. S. Jun (2005). "Autoimmune destruction of pancreatic beta cells." *Am J Ther* **12**(6): 580-591.
- Yun, X., Y. Wu, L. Yao, H. Zong, Y. Hong, J. Jiang, J. Yang, Z. Zhang and J. Gu (2007). "CDK11(p58) protein kinase activity is associated with Bcl-2 down-regulation in pro-apoptosis pathway." *Mol Cell Biochem* **304**(1-2): 213-218.
- Zambanini, A., R. B. Newson, M. Maisey and M. D. Feher (1999). "Injection related anxiety in insulin-treated diabetes." *Diabetes Res Clin Pract* **46**(3): 239-246.
- Zemunik, T. and V. Boraska (2011). Genetics of Type 1 Diabetes. *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*. Croatia, InTech.

- Zhang, M., S. Xu, Y. Han and X. Cao (2011). "Apoptotic cells attenuate fulminant hepatitis by priming Kupffer cells to produce interleukin-10 through membrane-bound TGF-beta." *Hepatology* **53**(1): 306-316.
- Zhang, S., M. Cai, S. Zhang, S. Xu, S. Chen, X. Chen, C. Chen and J. Gu (2002). "Interaction of p58(PITSLRE), a G2/M-specific protein kinase, with cyclin D3." *J Biol Chem* **277**(38): 35314-35322.
- Zhong, J. (2013). Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Type 1 Diabetes*. A. P. Escher and A. Li. Croatia, InTech.
- Zhou, Q., J. Brown, A. Kanarek, J. Rajagopal and D. A. Melton (2008). "In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells." *Nature* **455**(7213): 627-632.
- Ziegler, A. G., M. Hummel, M. Schenker and E. Bonifacio (1999). "Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study." *Diabetes* **48**(3): 460-468.
- Ziegler, R., C. A. Alper, Z. L. Awdeh, L. Castano, S. J. Brink, J. S. Soeldner, R. A. Jackson and G. S. Eisenbarth (1991). "Specific association of HLA-DR4 with increased prevalence and level of insulin autoantibodies in first-degree relatives of patients with type I diabetes." *Diabetes* **40**(6): 709-714.
- Zindy, F., E. Lamas, X. Chenivresse, J. Sobczak, J. Wang, D. Fesquet, B. Henglein and C. Brechot (1992). "Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **182**(3): 1144-1154.
- Zou, H., W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg and X. Wang (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." *Cell* **90**(3): 405-413.

ANNEXOS

A.1 Experiments *in vitro* amb l'insulinoma NIT-1: efectes de la sobreexpressió de la CDK11

A.1.1 Determinació de l'expressió de l'mRNA de la CDK11^{p58} i la CDK11^{p130} en la línia cel·lular transfectada NIT-1

Es van utilitzar els primers CDK11cloF – Ealb1 per tal de detectar, mitjançant PCR, el transgèn de la CDK11^{p58} i CDK11^{p130} en les línies cel·lulars transfectades permanentment. En la Figura 8-1a s'observa l'expressió dels transgens en les línies cel·lulars CDK11^{p58} i CDK11^{p130}, però no en la línia control Neo. En els carrils on no es va afegir transcriptasa inversa (controls negatius), no s'hi observa cap banda, la qual cosa en confirma l'especificitat dels resultats. Aquests carrils es van utilitzar com a control negatiu, ja que tenien tots els reactius menys la Superscript III transcriptasa inversa, de manera que ajudaven a determinar que l'RNA no estigués contaminat amb DNA genòmic. Es van fer servir els gens constitutius HPRT1 HPRT2 (hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa) com a controls de càrrega (Figura 8-1b).

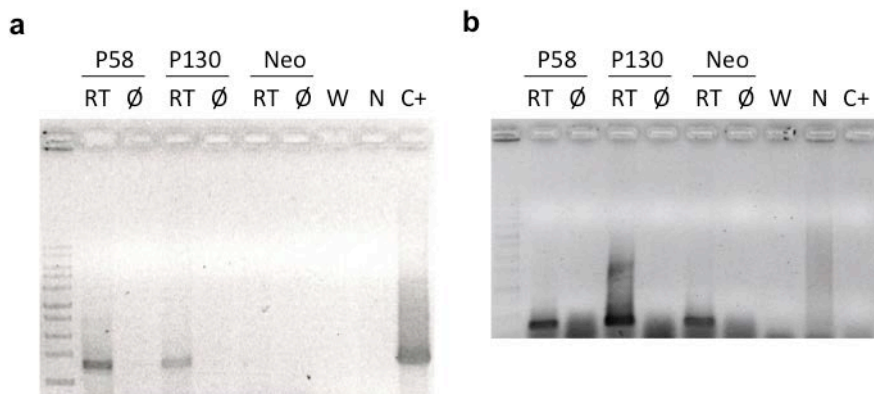


Figura 8-1: Anàlisi de l'expressió dels nivells de l'mRNA del transgèn de CDK11 mitjançant rT-PCR en cèl·lules NIT-1 transfectades. (a) Sobreexpressió dels nivells d'mRNA en les línies cel·lulars NIT-1 CDK11^{p58}, CDK11^{p130} i Neo control mitjançant CDK11cloF i Ealb1. (b) Es va comprovar el control de qualitat d'RNA/cDNA mitjançant l'expressió de l'mRNA del gen d'expressió ubíqua, HPRT1 i HPRT2. Només es va dur a terme un experiment pilot. C+, control positiu CDK11 (vector portador del transgèn); N, control negatiu – DNA genòmic de ratolí NOD; W, aigua; RT, transcriptasa inversa; Ø, transcriptasa inversa no afegida; Neo, mRNA línia cel·lular Neo control; P130, mRNA línia cel·lular CDK11^{p130}; P58, mRNA línia cel·lular CDK11^{p58}.

A.1.2 Els nivells d'apoptosi basal i apoptosi induïda per la citocina proinflamatòria IL-1 β no estan alterats en les línies cel·lulars NIT-1 CDK11^{p58} i CDK11^{p130}

Es van incubar les línies cel·lulars beta pancreàtiques de ratolí NOD transfectants, NIT-1 CDK11^{p58} i CDK11^{p130}, en presència de la citocina proinflamatòria (IL-1 β), per tal d'estudiar els efectes de la sobreexpressió de la CDK11 en la línia cel·lular d'insulinoma NIT-1-NOD. Se'n va analitzar l'apoptosi cel·lular mitjançant citometria de flux (Figura 8-2a-c). No es va observar una variació en el nivell d'apoptosi de les cèl·lules exposades a IL-1 β en comparació amb les cèl·lules que no van estar exposades a la citocina, en cap de les 3 línies cel·lulars transfectades. A més a més, les 2 línies transfectades, NIT-1 CDK11^{p58} i CDK11^{p130}, presentaven els mateixos nivells basals d'apoptosi que la línia Neo control (Figura 8-2d).

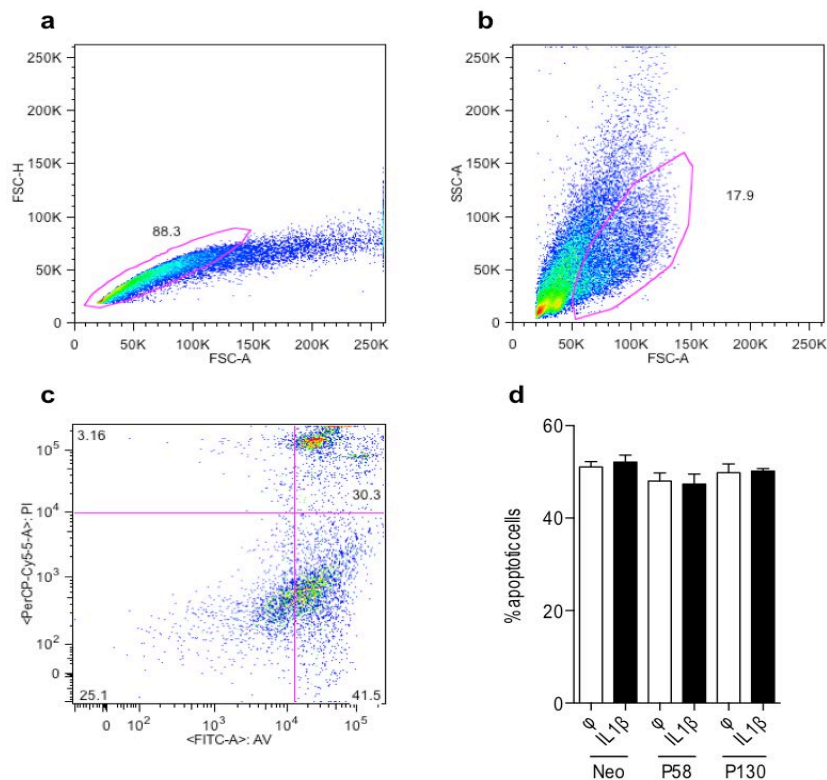


Figura 8-2: Activitat apoptòtica de les diferents línies NIT-1 estudiades vers IL-1 β . Estratègia utilitzada per tal de seleccionar la regió que conté les cèl·lules apoptòtiques prematures, AV+PI. Primerament (a), van descartar-se els agregats cel·lulars; en segon lloc (b), es va establir una finestra d'acord amb característiques de mida i complexitat cel·lular per no descartar cap tipus cel·lular potencialment interessant, i tot seguit (c), es va delimitar la regió de cèl·lules apoptòtiques (PI-AnnV⁺). (d) Nivells d'apoptosi expressats com a % de cèl·lules AV+PI en cada grup de cèl·lules transfectades en presència o absència d'IL-1 β . Només es va dur a terme un experiment pilot amb 3 repeticions no independents. IL-1 β , incubació de les cèl·lules amb la citocina IL-1 β en una concentració final de 50 U/mL; ϕ , cèl·lules control sense afegir IL-1 β ; Neo, línia cel·lular NIT-1 transfectada amb el vector control; P130, línia cel·lular NIT-1 transfectada amb el constructe CDK11^{p130}; P58, línia cel·lular NIT-1 transfectada amb el constructe CDK11^{p58}. La prova estadística utilitzada és l'ANOVA unidireccional.

A.2 Experiments *in vivo*: treballs previs

A.2.1 Estudis d'mRNA mitjançant microxips de cDNA murí

Es van comparar 2 poblacions d'mRNA de cèl·lules endocrines d'illots pancreàtics: la primera es va obtenir de ratolins femella NOD no diabètics d'11 setmanes d'edat, afectats per la infiltració limfocítica, a punt de desenvolupar diabetis; la segona, de ratolins femella NOD/SCID no diabètics d'11 setmanes d'edat, lliures d'infiltrat limfocític. Es van obtenir les suspensions cel·lulars dels illots pancreàtics dels ratolins femella NOD i NOD/SCID d'11 setmanes, es van tenir amb CD45-PE (marcador hematopoètic) i 7AAD (7 Aminoactinomicin D, marcador de cèl·lules mortes), i es van separar mitjançant FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) en CD45-7AAD⁻ (cèl·lules endocrines vives d'illots). Es va aïllar l'mRNA mitjançant TRIzol de les cèl·lules CD45-7AAD⁻ dels 2 tipus de ratolins, NOD i NOD/SCID. Tot seguit, es va dur a terme la síntesi del cDNA i la hibridació subtractiva fent servir el kit de Clontech, PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit. La hibridació subtractiva tenia com a objectiu obtenir cDNA específicament expressats en les mostres dels NOD i dels NOD/SCID, i eliminar aquells mRNA comuns a ambdós genotips. Les sondes de cDNA dels NOD i NOD/SCID es van utilitzar per hibridar amb les làmines del xip de DNA. Es van obtenir els microxips de DNA (4,6 K cDNA: 4.608 cDNA de ratolí adherits en una làmina de vidre per duplicat) del servei Keck Microarray de la Universitat de Yale. La hibridació de les 2 sondes (NOD i NOD/SCID marcades amb fluorescència) a les làmines de vidre es va dur a terme 2 vegades. El servei Keck Microarray va dur a terme l'escaneig de les làmines del xip de DNA, l'obtenció de les dades, la subtracció del soroll de fons i l'anàlisi estadística. Només es van considerar com a expressats diferencialment aquells cDNA que tenien l'expressió canviada 2 vegades o més. En la Taula 8-1 hi ha un resum de les dades normalitzades, de la CDK11, que es van obtenir dels 2 experiments d'hibridació duts a terme.

Taula 8-1: Estudis previs d'mRNA mitjançant el microxip de cDNA.

Experiment ID	Genebank Accession #	NOD/SCID:NOD mRNA ratio normalized values
Experiment 1	NM_007661.3	2,77
Experiment 2	NM_007661.3	2,05
Average	CDK11b	2,4

A.2.2 Els nivells de proliferació de les cèl·lules beta dels ratolins NOD/SCID transferits amb cèl·lules de melsa total no estan alterats

L'Alejandra Saavedra, durant la seva tesi doctoral, va transferir de manera adoptiva 0, 1, 2, 3 5, 10 milions de cèl·lules de melsa total a ratolins NOD/SCID WT de 9 setmanes d'edat. Després de 2 setmanes, va extreure'n els illots pancreàtics i va analitzar-ne els nivells de proliferació de les cèl·lules beta (Figura 8-3). Les cèl·lules beta no mostraven una proliferació alterada després de la transferència de diferents quantitats de cèl·lules de melsa total (Saavedra-Ávila, Sengupta et al. 2014).

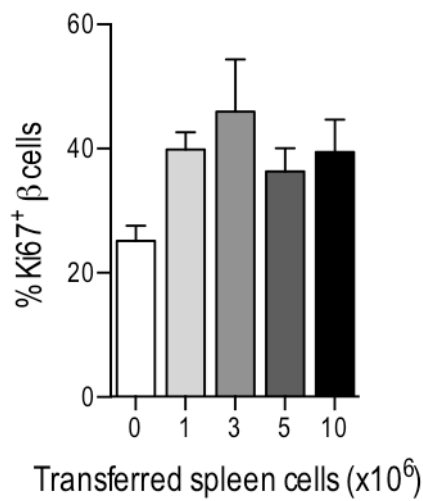


Figura 8-3: La proliferació de les cèl·lules beta no es veu alterada amb nivells creixents d'infiltració leucocítica. Nivells d'expressió de Ki67 en les cèl·lules beta de ratolins NOD/SCID WT d'11 setmanes d'edat que van ser transferits amb diferents quantitats de cèl·lules de melsa total 2 setmanes abans de l'extracció dels illots pancreàtics. La proliferació cel·lular es mesura com a percentatge de cèl·lules CD45-Glut2+Ki67+. 0, n = 7; 1, n = 7; 3, n = 6; 5, n = 4, i 10, n = 9. Es va utilitzar la prova estadística de Kruskal-Wallis.

A.2.3 Comprovació de la deleció genòmica de la CDK11 en la soca NODCDK11βKO

En la Figura 8-4 es pot comprovar la deleció de la CDK11 en la soca NODCDK11βKO mitjançant PCR i utilitzant els primers CPrev – mp70. Com es pot veure, a la melsa i al timus no hi havia

generació de l'al·lel de la CDK11 deletionat, només als illots dels ratolins que expressaven RIPCre a les cèl·lules beta.

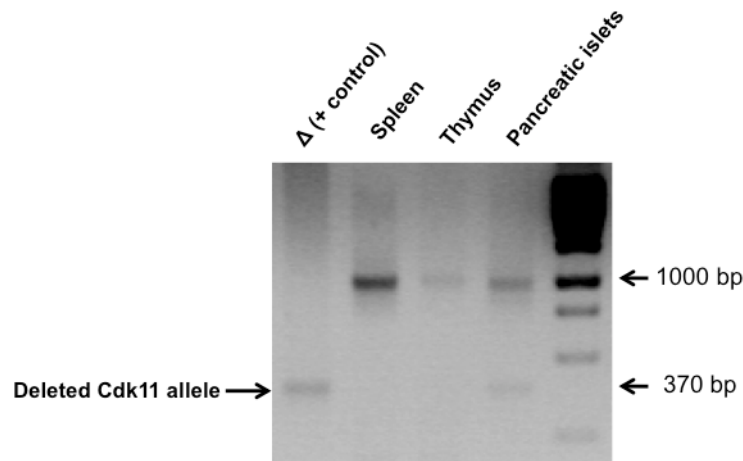


Figura 8-4: Generació de l'al·lel truncat de la CDK11 sota l'expressió de RIPCre als illots pancreàtics. Es va aïllar el DNA genòmic de la melsa, timus i illots pancreàtics de ratolins HTZ per a la CDK11 en cèl·lules beta pancreàtiques (+/flox cre/+) i es va analitzar la presència de l'al·lel deletionat mitjançant PCR amb els primers CPrev - mp70. Δ (+ control), control positiu - gen CDK11 eliminat.

A.3 Estudis de l'expressió de l'mRNA del glucagó

A.3.1 Els nivells d'expressió del glucagó als illots pancreàtics estan alterats en els ratolins HTZ

Primerament es van estudiar els nivells de glucagó de ratolins NOD/SCID WT i HTZ de 6 setmanes d'edat, per tal d'analitzar si els ratolins HTZ presentaven uns nivells alterats d'expressió de glucagó, i s'evitava així la variable "infiltració limfocitària", que és absent en els ratolins NOD/SCID (Figura 8-5a). Els nivells d'expressió de l'mRNA del glucagó es veien disminuïts en ratolins NOD/SCID HTZ ($1,06 \pm 0,17$, WT vs. $0,55 \pm 0,09$, HTZ), la qual cosa feia pensar que l'expressió del glucagó estava alterada en aquests ratolins de manera independent a la presència d'infiltració limfocitària. Seguidament, es va estudiar si els nivells d'expressió del glucagó es veien alterats en les cèl·lules endocrines (CD45⁺) dels illots pancreàtics dels ratolins NOD comparat amb els ratolins NOD/SCID, mitjançant qPCR. En la Figura 8-5b es pot observar que els ratolins NOD d'11 setmanes d'edat, just abans del debut diabètic, presentaven uns nivells d'expressió de l'mRNA del glucagó (9,24 vegades) disminuïts, comparats amb els illots

dels ratolins NOD/SCID ($0,1635 \pm 0,1185$ vs. $1,511 \pm 1,233$, respectivament). La Figura 8-5c mostra l'expressió de glucagó de ratolins NOD/SCID de 6, 9 i 11 setmanes d'edat. Es podia intuir una tendència a la alça en l'expressió de glucagó a mesura que els ratolins tenien una edat més avançada, però en cap moment aquestes diferències eren significatives. Finalment, es va continuar estudiant si la disminució del glucagó estava lligada a la presència d'infiltració limfocítica. Es va dur a terme un experiment dosi-resposta (Figura 8-5d) i es va comprovar que el glucagó no disminuïa en funció de la infiltració. Per tant, es podia assumir que aquesta disminució observada en els ratolins NOD, comparada amb els NOD/SCID, no era deguda a la infiltració limfocítica, sinó que els ratolins NOD i NOD/SCID expressen diferents nivells de glucagó.

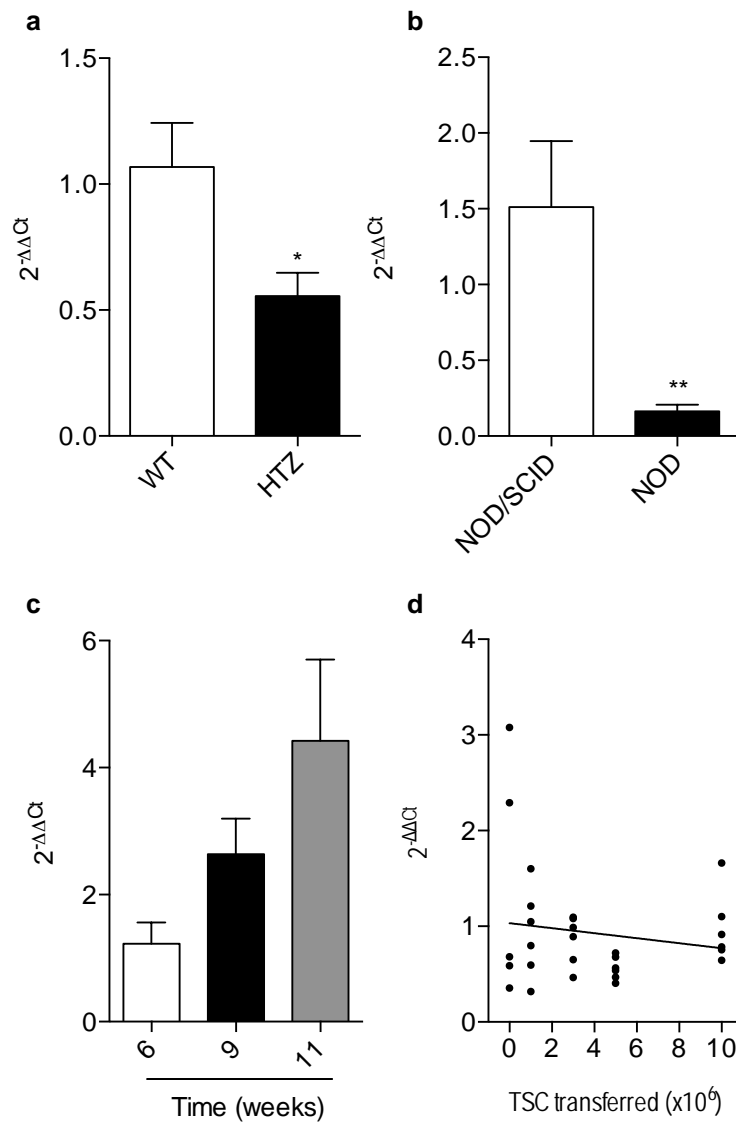


Figura 8-5: Anàlisi de l'expressió de l'mRNA del glucagó mitjançant qPCR. (a) Es va analitzar l'expressió de l'mRNA de glucagó en illots pancreàtics de ratolins NOD/SCID CDK11 WT i HTZ ($n = 5$) de 6 setmanes d'edat, (b) ratolins NOD/SCID ($n = 8$) i ratolins NOD ($n = 9$) (CD45⁻) d'11 setmanes d'edat, i (c) ratolins NOD/SCID ($n = 8$) de 6, 9 i 11 setmanes d'edat. (d) Determinació dels nivells d'expressió de l'mRNA de glucagó en cèl·lules beta de ratolins NOD/SCID que van ser transferits de manera adoptiva en diferents quantitats ($\times 10^6$) de leucòcits de melsa (TSC; el nombre de ratolins recipients per condició era: 0, $n = 5$; 1, 3, 5, i 10, $n = 6$) 2 setmanes abans de l'extracció dels illots pancreàtics, a les 11 setmanes d'edat. Totes les comparacions es van fer en relació amb TSC (0). La regressió lineal es va dur a terme en condició a l'equació $y = -0,02619x + 1,033$, $p = 0,4135$. Els ratolins estaven alimentats a l'hora d'extreure els illots pancreàtics de tots els experiments. Es va dur a terme la prova estadística t paramètrica (a), Mann-Whitney (b) i Kruskal-Wallis (c).