

Effetti del glucagon-like peptide (GLP)-1 sulla funzione β -cellulare pancreatica

Marta Letizia Hribal, Giorgio Sesti

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi "Magna Græcia", Catanzaro

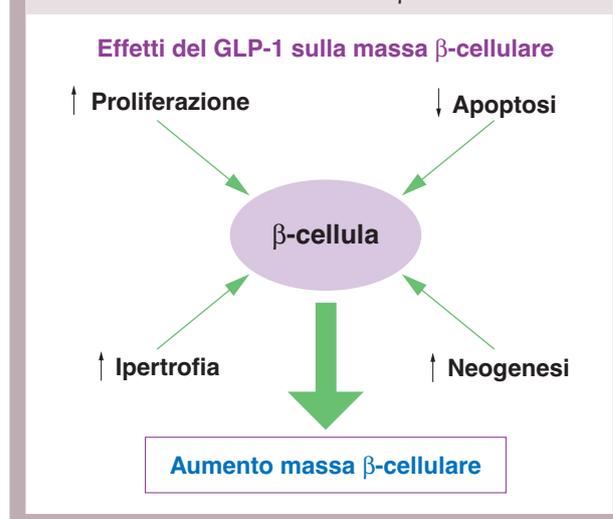
Il *glucagon-like peptide* (GLP)-1 e il *glucose-dependent insulintropic peptide* (GIP) sono due ormoni intestinali, denominati "incretine", rilasciati in risposta all'ingestione di cibo (1). Il GIP è un peptide di 42 aminoacidi secreto dalle cellule K localizzate prevalentemente nel duodeno. Il GLP-1 è invece rilasciato dalle cellule L localizzate nella parte distale dell'ileo e nel colon. La prima funzione delle incretine è quella di potenziare la secrezione insulinica glucosio-dipendente da parte della β -cellula pancreatica. Il GLP-1 agisce legandosi a un recettore di membrana, GLP-1-R, la cui attivazione stimola la produzione di adenosina monofosfato ciclico (cAMP) da parte dell'enzima adenil-ciclastasi con successiva attivazione dei meccanismi di trasmissione del segnale intracellulare. Studi in modelli animali hanno dimostrato che il GLP-1 agisce su entrambe le fasi necessarie per la secrezione insulinica: la chiusura dei canali del potassio ATP-dipendenti (con il conseguente aumento della concentrazione di calcio intracellulare) e la successiva esocitosi delle vescicole secretorie con rilascio dell'insulina in esse contenuta (2). Il meccanismo molecolare tramite il quale il GLP-1 facilita la chiusura dei canali del potassio ATP-dipendenti non è stato ancora completamente chiarito, ma si tratta probabilmente di un'azione mediata dalla proteina chinasi A in quanto viene bloccata dall'uso di inibitori specifici per questa chinasi (2). Diversi mediatori intracellulari sembrano invece coinvolti nella regolazione del rilascio delle vescicole secretorie da parte del GLP-1; in particolare, numerose evidenze sperimentali suggeriscono che esso può agire sulle proteine della famiglia SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) che hanno un ruolo fondamentale nel regolare la fusione delle vescicole secretorie con la membrana cellulare

(2). È stato, ad esempio, suggerito che il GLP-1 induca, probabilmente sempre mediante la proteina chinasi A, la fosforilazione della proteina SNAP-25 (un importante membro della famiglia SNARE) e l'utilizzo di inibitori specifici della fosforilazione attenua effettivamente il rilascio delle vescicole secretorie, stimolato dal GLP-1 (2).

In aggiunta agli effetti stimolatori sulla secrezione insulinica, studi sperimentali hanno evidenziato che il GLP-1 agisce a più lungo termine favorendo l'aumento della massa β -cellulare in modelli animali sia diabetici sia normoglicemici (3). La massa β -cellulare è regolata essenzialmente attraverso tre meccanismi (Figura 1):

1. aumento della proliferazione delle β -cellule pre-esistenti;
2. inibizione dell'apoptosi;
3. formazione di nuove β -cellule o neogenesi in seguito a differenziamento di cellule progenitrici.

Figura 1 Rappresentazione schematica degli effetti esercitati dal GLP-1 sulla massa β -cellulare



Numerosi studi, riassunti nei paragrafi seguenti, suggeriscono che il GLP-1 può avere un ruolo in tutti e tre i meccanismi.

Effetti del GLP-1 sulla proliferazione delle β -cellule pancreatiche

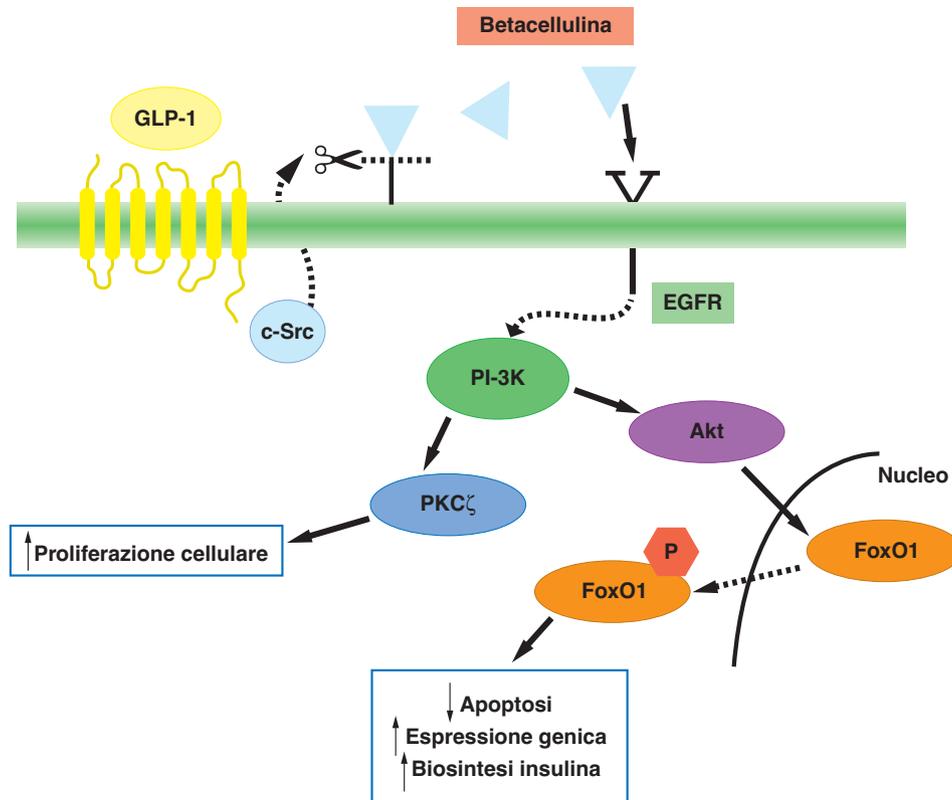
Studi su pancreas isolati da animali trattati in acuto o in cronico con il GLP-1 - o con i suoi analoghi - hanno dimostrato un aumento del numero di β -cellule proliferanti (4-6). Rolin e colleghi hanno osservato che trattando topi diabetici db/db con due analoghi del GLP-1, NN2211 (liraglutide) e exendina-4 si osservava un consistente incremento della proliferazione cellulare, che, nel caso del trattamento con liraglutide, ma non di quello con exendina-4, risultava in un significativo aumento della massa β -cellulare (4). È interessante osservare che il trattamento di animali normoglicemici con liraglutide sembra causare un aumento solo transitorio (7) o addirittura nessun aumento (8) della proliferazione β -cellulare, suggerendo che gli effetti del GLP-1 *in vivo* sono dipendenti, in modo diretto o indiretto, dallo stato glicemico.

Per comprendere meglio i meccanismi molecolari che sono alla base degli effetti proliferativi osservati nei modelli animali, sono stati condotti numerosi studi in modelli di β -cellule pancreatiche (9-19). Utilizzando tali modelli è stato dimostrato che gli effetti proliferativi del GLP-1 e dei suoi analoghi coinvolgono molteplici vie di trasmissione del segnale intracellulare, incluse quelle che portano all'attivazione di *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI-3K), fosfoinositide-dipendente chinasi-1 (PDK1), Akt e protein-chinasi Czeta (PKCzeta) (9-11). L'importanza delle specifiche vie di trasmissione del segnale che mediano gli effetti proliferativi del GLP-1 e dei suoi analoghi è stata evidenziata mediante l'uso di tecniche di biologia molecolare che prevedevano la trasfezione di β -cellule pancreatiche con vettori di espressione contenenti delle forme dominanti-negative delle molecole coinvolte o l'uso di specifici inibitori farmacologici. Le PKC costituiscono una famiglia di molecole con attività enzimatica che ha vari effetti cellulari tra cui l'induzione della proliferazione. È stato dimostrato che uno dei meccanismi di attivazione di PKCzeta coinvolge l'attivazione sequenziale di PI-3K PDK1 (Figura 2). In risposta a vari stimoli proliferativi, PKCzeta è traslocata nel nucleo della cellula dove atti-

va la trascrizione di geni necessari per la duplicazione cellulare. Studi *in vitro* hanno dimostrato che il GLP-1 stimola la traslocazione di PKCzeta nel nucleo in cellule di insulinoma INS (832/13). Tale fenomeno era associato a un aumento della duplicazione cellulare. Gli effetti proliferativi indotti dal GLP-1 erano bloccati sia dall'esposizione delle cellule di insulinoma a uno pseudosubstrato di PKCzeta, sia dalla trasfezione delle cellule con una forma dominante negativa di PKCzeta priva dell'attività chinasi (10). Altri studi hanno messo in evidenza il ruolo di Akt, una serina-chinasi coinvolta in molteplici azioni biologiche tra cui la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza cellulare. È stato dimostrato che la trasfezione delle cellule con una forma dominante negativa di Akt, priva di attività chinasi, abroga completamente gli effetti proliferativi del GLP-1 in cellule di insulinoma INS-1 (12). In accordo con questa osservazione è il fatto che il trattamento di topi obesi diabetici db/db con exendina-4, una molecola con attività di agonista del recettore del GLP-1 isolata dalla saliva della lucertola *Gila Monster* induce un aumento dei livelli e dell'attivazione di Akt nel pancreas (13).

Altri studi hanno dimostrato che il GLP-1 agisce come fattore di crescita promuovendo la maturazione proteolitica della betacellulina, un membro della famiglia degli *epidermal growth factor* (EGF) che stimola il recettore dell'EGF (12, 14, 15). Studi che hanno analizzato gli effetti mitogenici degli agonisti dei recettori *G protein-coupled receptor* (GPCR) hanno portato a ritenere che alcuni recettori di questa famiglia, che sono privi di intrinseca attività chinasi, possano transattivare il recettore dell'EGF per promuovere la proliferazione cellulare (14, 15). In alcuni casi la transattivazione del recettore dell'EGF da parte dei recettori GPCR richiede la produzione di ligandi endogeni per il recettore dell'EGF a partire da precursori attraccati alla membrana plasmatica delle cellule attraverso l'attivazione di endoproteasi stimulate dall'attivazione di c-Src, una tirosino-chinasi di tipo non recettoriale (16-18). In uno studio eseguito su cellule di insulinoma INS (832/13) è stato dimostrato che il GLP-1 stimola la proliferazione della β -cellula pancreatica attraverso la transattivazione del recettore dell'EGF indotta dalla produzione di betacellulina e che questo meccanismo è coinvolto nell'attivazione di PI-3K da parte del GLP-1 (Figura 2). Questo modello di trasduzione del segnale è basato sui seguenti risultati sperimentali: 1. l'inibizione farmacologica di c-Src con protein fosfa-

Figura 2 **Meccanismo di azione del GLP-1 mediato dalla trans-attivazione del recettore dell'EGF da parte della betacellulina e ruolo di forkhead transcription factor (Fox)O1 nella trasduzione del messaggio del GLP-1**



EGFR = recettore dell'EGF; PI-3K = fosfatidilinositolo-3 chinasi

- tasi (PP)1 e del recettore dell'EGF con l'inibitore AG1478 determina la soppressione della proliferazione cellulare stimolata dal GLP-1 in cellule di insulinoma INS (832/13) e in isole di ratto in coltura;
- il GLP-1 induce la fosforilazione del recettore dell'EGF che è inibita da PP1 e da AG1478, suggerendo così che la trans-attivazione del recettore dell'EGF da parte del GLP-1 è mediata da c-Src;
- sia PP1 sia AG1478 inibiscono l'attivazione di PI-3K da parte del GLP-1, suggerendo che la stimolazione di questo enzima in risposta al GLP-1 è mediata da c-Src e dal recettore dell'EGF;
- la trasfezione delle cellule di insulinoma INS (832/13) con una forma dominante-negativa del recettore dell'EGF sopprime gli effetti proliferativi del GLP-1;
- il GLP-1 riduce la quantità di betacellulina attracca-

- ta alla superficie cellulare e tale effetto è abrogato da PP1, l'inibitore di c-Src;
 - la proliferazione delle cellule di insulinoma INS (832/13) è completamente abolita dalla incubazione delle cellule con un anticorpo neutralizzante la betacellulina e da GM6001, un inibitore delle endonucleasi;
 - gli effetti del GLP-1 e della betacellulina sulla proliferazione delle cellule di insulinoma INS (832/13) non sono additive, ciò suggerisce che essi utilizzano la medesima via intracellulare.
- Più recentemente è stata descritta una nuova via di trasmissione del segnale del GLP-1 che coinvolge il fattore di trascrizione *forkhead transcription factor* (FoxO)1 (19). FoxO1 è un effettore trascrizionale controllato dall'insulina e dall'*insulin-like growth factor* (IGF)-1 - che svolge un importante ruolo nella prolifera-

razione, nel differenziamento e nella sopravvivenza cellulare. L'attività di FoxO1 è inibita attraverso la sua fosforilazione - mediata dalla via di trasduzione di PI-3K/Akt - e la conseguente traslocazione dal nucleo della cellula al citoplasma (Figura 2). In cellule di insulinooma INS (832/13) il GLP-1 stimola la fosforilazione di FoxO1 che è bloccata dall'inibitore AG1478 del recettore dell'EGF e dall'inibitore LY294002 di PI-3K. Questi effetti sono associati a una traslocazione di FoxO1 dal nucleo al citoplasma con successiva inibizione della sua attività trascrizionale. La trasfezione delle cellule di insulinooma INS (832/13) con una forma mutata di FoxO1 che ne impedisce la traslocazione dal nucleo blocca le azioni del GLP-1 sulla proliferazione cellulare. Inoltre, nelle cellule trasfettate con la forma mutata di FoxO1, il GLP-1 non è capace di indurre l'espressione del *pancreatic and duodenal homeobox gene* (PDX)-1, un fattore di trascrizione che svolge un ruolo fondamentale nel differenziamento, nella replicazione e nella rigenerazione delle β -cellule (20). Queste azioni cellulari sono state confermate in un modello di topo transgenico che esprime la forma mutata di FoxO1 costitutivamente nucleare. La somministrazione di exendina-4 per sette giorni agli animali transgenici non è in grado di accrescere il numero di β -cellule proliferanti, le dimensioni delle isole pancreatiche e il numero di piccoli cluster di β -cellule, come invece avviene negli animali di controllo, supportando così l'idea che l'inattivazione di FoxO1 è necessaria affinché il GLP-1 possa stimolare la proliferazione cellulare. In accordo con questi risultati, in cellule di insulinooma INS-1 e INS (823/13) il trattamento con il GLP-1 stimola l'espressione e l'attività di legame al DNA del fattore di trascrizione PDX-1 e questo fenomeno si accompagna a un incremento della proliferazione cellulare (9). Inoltre, in ratti Wistar anziani o giovani, il GLP-1 induce l'espressione di PDX-1 nelle β -cellule pancreatiche in associazione a un incremento del contenuto di insulina all'interno delle isole pancreatiche (5). Infine, è stato suggerito che il GLP-1 e il suo analogo liraglutide possano agire anche promuovendo l'espressione di una proteina chiave per la regolazione del ciclo cellulare, la ciclina D1 (21). Infatti, Friedrichsen e colleghi hanno osservato che il trattamento con GLP-1 o liraglutide, sia di cellule di insulinooma INS-1 sia di colture primarie di isole di ratto, determinava uno specifico aumento dei livelli di ciclina D1 (ma non D2) e che tale aumento era abolito dal trattamento con inibitori farmacologici della proteina

chinasi A, delle MAPK e di PI-3K, suggerendo che tutte e tre queste vie giocano un ruolo in questo meccanismo (21).

Effetti del GLP-1 sull'apoptosi delle β -cellule pancreatiche

Un incremento della massa β -cellulare da parte del GLP-1 e dei suoi analoghi può essere dovuto non solo a un aumento della proliferazione cellulare, ma anche a una riduzione della apoptosi, anche definita morte cellulare programmata. Il GLP-1 e l'exendina-4 sono in grado di ridurre l'apoptosi in isole di ratti *Zucker* obesi diabetici (ZDF) (6), in isole di ratti trattati con streptozotocina (22), in topi obesi db/db (12), in isole di ratto coltivate in presenza di citochine in grado di indurre apoptosi (22), in cellule di insulinooma di ratto RINm5F incubate con palmitato (un acido grasso a lunga catena ad azione pro-apoptotica (23)), in cellule di insulinooma di topo MIN6 coltivate in presenza di dosi pro-apoptotiche di perossido di idrogeno (H_2O_2) (24) e in cellule di insulinooma di topo INS-1 esposte a staurosporina (12). Inoltre, il trattamento con il GLP-1 è in grado di ridurre l'apoptosi di isole umane ottenute da donatori e coltivate *in vitro* per cinque giorni (23). I meccanismi molecolari attraverso cui il GLP-1 e i suoi analoghi esercitano un'azione anti-apoptotica non sono stati del tutto chiariti. Nei ratti ZDF è stato dimostrato che il trattamento con il GLP-1 è in grado di preservare la morfologia delle isole, di ridurre le caratteristiche alterazioni cellulari dovute all'apoptosi (come la condensazione e la frammentazione nucleare) e di ridurre l'espressione della caspasi-3, un enzima fondamentale nella degradazione proteica intracellulare che costituisce la fase terminale del processo apoptotico (6). Nei topi obesi db/db il trattamento con l'exendina-4 riduce l'attivazione di caspasi-3, mentre aumenta l'espressione di Akt - che svolge un ruolo chiave nella trasmissione del segnale anti-apoptotico (25) - e delle *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), anch'esse coinvolte nelle vie intracellulari che promuovono la sopravvivenza cellulare (12). In cellule di insulinooma di ratto RINm5F l'esposizione al GLP-1 o all'exendina-4 è in grado di ridurre l'attività della caspasi-3 (22), mentre in cellule di insulinooma di topo MIN6 l'esposizione al GLP-1 determina un aumento dei livelli delle proteine ad attività anti-apoptotica Bcl-2 e Bcl-xl attraverso una via di trasduzione cAMP-dipendente (23). Anche le

isole umane esposte al GLP-1 esibiscono un aumento dell'espressione di Bcl-2 (26). In considerazione del fatto che la disponibilità di donatori è limitata, la possibilità di utilizzare molecole farmacologicamente attive, quali il GLP-1 e i suoi analoghi, capaci di preservare e, forse, anche espandere in coltura isole umane pur mantenendone le caratteristiche funzionali, costituisce un approccio intrigante nel campo dei trapianti di isole nei pazienti con diabete tipo 1 (DMT1). Le azioni anti-apoptotiche del GLP-1 e dei suoi analoghi sembrano essere mediate dal recettore per il GLP-1 in quanto la trasfezione con il cDNA codificante per tale recettore in linee cellulari non-pancreatiche rende queste cellule sensibili agli effetti anti-apoptotici del GLP-1 (22), mentre l'uso dell'antagonista specifico per il recettore exendina-9-39 inibisce l'effetto anti-apoptotico sia del GLP-1 sia del suo analogo liraglutide in isole purificate da ratti neonati (27). A conferma del ruolo anti-apoptotico del GLP-1, è stato riportato che animali *knock-out* privi del recettore per il GLP-1 esibiscono un incremento dell'apoptosi e una aumentata suscettibilità agli effetti iperglicemizzanti della streptozotocina rispetto agli animali di controllo (22). In accordo con i risultati osservati con il GLP-1 e i suoi analoghi, il trattamento con inibitori di DPP-4, l'enzima che degrada il GLP-1, inibisce l'apoptosi delle β -cellule pancreatiche in ratti resi diabetici mediante somministrazione di streptozotocina (28). Recenti studi, in cui sono stati utilizzati linee cellulari e animali transgenici, hanno evidenziato una nuova via attraverso cui il GLP-1 induce la sopravvivenza delle β -cellule (29). In cellule di insulinoma di topo MIN6 l'esposizione all'exendina-4 induce la fosforilazione del fattore di trascrizione cAMP-responsive element-binding protein (CREB) (30) attraverso una via cAMP-dipendente. Per indagare l'importanza di CREB nella funzione della β -cellula pancreatica, è stato analizzato un animale transgenico esprime un inibitore polipeptidico di CREB a livello della β -cellula (31). In questo modello animale la massa delle β -cellule pancreatiche era ridotta rispetto agli animali di controllo a causa dell'attivazione del programma apoptotico. Queste alterazioni erano associate ad alterazioni morfologiche tipiche dell'apoptosi, quali la condensazione e la frammentazione del nucleo. I risultati ottenuti negli animali transgenici sono stati confermati in esperimenti di trasfezione di cellule di insulinoma di topo MIN6 con l'inibitore polipeptidico di CREB, evidenziando un aumento dell'apoptosi di 3-4 volte rispetto alle cellule di controllo. Dal punto di

vista meccanicistico, l'inibizione di CREB provocava una diminuzione dell'espressione dell'*insulin receptor substrate* (IRS)-2, uno dei principali substrati intracellulari sia del recettore insulinico sia di quello dell'IGF-1 che svolge un ruolo chiave nella sopravvivenza della β -cellula pancreatica. IRS-2 possiede nella regione del promotore del suo gene un sito di legame per CREB che è attivato dalla stimolazione con cAMP, mentre è inibito dall'inibitore polipeptidico di CREB. In analogia con questi risultati ottenuti nelle cellule di insulinoma di topo MIN6, l'animale transgenico esprime un inibitore polipeptidico di CREB a livello della β -cellula mostra una diminuzione dei livelli di IRS-2 nelle isole pancreatiche. IRS-2 svolge la sua azione anti-apoptotica mediante la stimolazione di Akt. L'esposizione a IGF-1 delle cellule di insulinoma di topo MIN6, precedentemente trasfettate con l'inibitore polipeptidico di CREB, determina una diminuzione della stimolazione di Akt a causa del mancato incremento dell'espressione di IRS-2. In isole umane trattate con exendina-4 o con dibutiril-cAMP, un analogo di cAMP, si osserva un incremento dell'espressione di IRS-2, della sua fosforilazione e dell'attivazione di molecole di trasduzione a valle, come Akt, a conferma dell'importanza della via cAMP/PKA/CREB/IRS-2 nella trasduzione del segnale anti-apoptotico. Altre conferme del ruolo di IRS-2 nella sopravvivenza della β -cellula pancreatica, in risposta al trattamento con il GLP-1, provengono da ricerche condotte nel modello animale *knock-out* per IRS-2 (IRS-2^{-/-}) (31). In topi IRS-2^{-/-} la somministrazione dell'exendina-4 non induce un incremento della superficie delle β -cellule pancreatiche e non previene la progressiva perdita di massa β -cellulare causata da un'aumentata apoptosi e da una ridotta mitogenesi, a differenza di quanto osservato negli animali di controllo che esibivano un incremento della massa β -cellulare e della proliferazione delle β -cellule (31). Il fattore di trascrizione PDX-1 è necessario per lo sviluppo del pancreas nell'uomo e ha un ruolo chiave nella regolazione della funzione β -cellulare dell'adulto (32). Animali *knock-out* per PDX-1 esibiscono un incremento dell'apoptosi delle β -cellule con conseguente comparsa di diabete (32). Il GLP-1 stimola l'espressione di PDX-1 mediante una via di trasduzione che coinvolge l'attivazione di Akt e la fosforilazione di FoxO1 con conseguente traslocazione dal nucleo al citoplasma e disattivazione della sua azione inibitoria sull'espressione di PDX-1 (19). In topi IRS-2^{-/-} l'espressione di PDX-1 nelle β -cellule è diminuita e non è ripristinata dal

trattamento con l'exendina-4, a conferma del fondamentale ruolo svolto da IRS-2 nel mediare gli effetti del GLP-1 sull'espressione di PDX-1 (32).

Effetti del GLP-1 sulla neogenesi delle β -cellule pancreatiche

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono la presenza all'interno del pancreas di un pool di precursori di β -cellule residenti che sono in grado di differenziarsi in risposta ad appropriati stimoli, contribuendo in tal modo all'aumento della massa β -cellulare.

È stato osservato che sia in ratti ZDF sia in ratti *Wistar*, il GLP-1 stimola la replicazione di cellule nella parte endocrina del pancreas (5, 6). Inoltre, la somministrazione dell'exendina-4 induce la duplicazione di cellule dell'epitelio dei dotti pancreatici in ratti *Sprague-Dawley* (33). La proliferazione cellulare al di fuori delle isole stimolata dal GLP-1 e dai suoi analoghi è accompagnata dalla comparsa di cellule che esprimono insulina in sedi extra-insulari. Ratti *Sprague-Dawley* trattati con l'exendina-4 mostrano un incremento del numero di cellule insulino-positivo all'interno del parenchima del pancreas esocrino (33). È stato inoltre dimostrato *in vitro* che il trattamento con il GLP-1 di cellule progenitrici derivate dal pancreas umano e selezionate in base alla loro positività per nestina, un marcatore di cellule indifferenziate, è in grado di indurre il loro differenziamento in cellule capaci di sintetizzare pro-insulina (34). In aggiunta agli effetti proliferativi, diverse evidenze suggeriscono che il GLP-1 e i suoi analoghi stimolano l'espressione di geni specifici della β -cellula sia in modelli animali (33) sia in colture cellulari di insulinoma (35). In cellule RIN 1046-38 di insulinoma di ratto è stato dimostrato che il GLP-1 aumenta l'espressione di vari geni β -cellula-specifici, inclusi quelli dell'insulina, del trasportatore del glucosio GLUT1 e dell'esochinasi (35). In ratti *Wistar* anziani il trattamento con il GLP-1 induce un incremento dei geni che codificano per l'insulina, il trasportatore di glucosio GLUT2 e la glucochinasi (33).

Conclusioni

Le caratteristiche biologiche del GLP-1 nativo e degli incretino-mimetici da esso derivati rendono queste molecole dei candidati ideali per il trattamento del dia-

bete mellito tipo 2 (DMT2). Trial clinici hanno dimostrato l'efficacia degli incretino-mimetici e degli inibitori di *dipeptyl peptidase* (DPP)-4 nel ridurre i livelli di glicemia e di emoglobina glicata in pazienti diabetici. Le suddette molecole sono state approvate per l'uso farmacologico dalle agenzie regolatrici degli Stati Uniti e dell'Europa. I dati in modelli cellulari e animali suggeriscono la possibilità che, in pazienti affetti da DMT2, il trattamento con gli incretino-mimetici possa favorire il mantenimento dell'omeostasi della massa β -cellulare.

Bibliografia

1. Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* 20: 876-913, 1999.
2. Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide-1 in the pancreas. *Pharmacology & Therapeutics* 113: 546-593, 2007.
3. Drucker DJ. Glucagon-like peptides: Regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol*; 17: 161-171, 2003.
4. Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, et al. The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases β -cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E745-E752, 2002.
5. Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, et al. Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology* 141: 4600-4605, 2000.
6. Farilla L, Hui H, Bertolotto C, et al. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology* 143: 4397-4408, 2002.
7. Bock T, Pakkanberg B, Buschard K. The endocrine pancreas in non-diabetic short-term and long-term treatment with the GLP-1 derivative NN2211. *APMIS* 111: 1117-1124, 2003.
8. Sturis J, Gotfredsen CF, Rømer J, et al. GLP-1 derivative liraglutide in rats with β -cell deficiencies: influence of metabolic state on β -cell mass dynamics. *Br J Pharmacol* 140: 123-132, 2003.
9. Buteau J, Roduit R, Susini S, et al. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in β (INS-1)-cells. *Diabetologia* 42: 856-864, 1999.
10. Buteau J, Foisy S, Rhodes CJ, et al. Protein kinase C zeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic β -cell proliferation. *Diabetes* 50: 2237-2243, 2001.
11. Buteau J, Foisy S, Joly E, et al. Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic β -cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* 52: 124-132, 2003.
12. Wang Q, Li L, Xu E, et al. Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic (INS-1) β -cells. *Diabetologia* 47: 478-487, 2004.
13. Wang Q, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 treatment delays

- the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia* 45: 1263–1273, 2002.
14. Voisin L, Foisy S, Giasson E, et al. EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C446–C455, 2002.
 15. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, et al. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379: 557–560, 1996.
 16. Gao Y, Tang S, Zhou S, et al. The thromboxane A2 receptor activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C-dependent Gi coupling and Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 426–433, 2001.
 17. Eguchi S, Iwasaki H, Inagami T, et al. Involvement of PYK2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 33: 201–206, 1999.
 18. Prenzel N, Zwick E, Daub H et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors require metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402: 884–888, 1999.
 19. Buteau J, Spatz ML, Accili D. Transcription factor FoxO1 mediates Glucagon-like Peptide-1 effects on pancreatic β -cell mass. *Diabetes* 55: 1190–1196, 2006.
 20. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, et al. Insulinotropic glucagon-like peptide-1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase β -cell mass in mouse pancreas. *Diabetes* 49: 741–748, 2002.
 21. Friedrichsen BN, Neubauer N, Lee YC, et al. Stimulation of pancreatic β -cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. *J Endocrinol* 188: 481–492, 2006.
 22. Li Y, Hansotia T, Yusta B, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates β -cell apoptosis. *J Biol Chem* 278: 471–478, 2003.
 23. Kwon G, Pappan KL, Marshall CA, et al. cAMP dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both PKA- and cAMP-GEF-dependent pathways in β -cells. *J Biol Chem* 279: 8938–8945, 2004.
 24. Hui H, Nourparvar A, Zhao X, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 144: 1444–1455, 2003.
 25. Datta SR, Brunet A, Greenberg, ME. Cellular survival: A play in three Acts. *Genes Dev* 13: 2905–2927, 1999.
 26. Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* 141: 5149–5158, 2003.
 27. Bregenholt S, Møldrup A, Blume N, et al. The long-acting glucagon-like peptide-1 analogue, liraglutide, inhibits β -cell apoptosis in vitro. *BBRC* 330: 577–584, 2005.
 28. Pospisilik JA, Martin J, Doty T, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates β -cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 52: 741–750, 2003.
 29. Jhala US, Canettieri G, Screaton RA, et al. cAMP promotes pancreatic β -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev* 17: 1575–1580, 2003.
 30. Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675–680, 1989.
 31. Park S, Dong X, Fisher TL, et al. Exendin-4 uses IRS2 signaling to mediate pancreatic β -cell growth and function. *J Biol Chem* 281: 1159–1168, 2006.
 32. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, et al. β -cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the β -cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12: 1763–1768, 1998.
 33. Wang Y, Perfetti R, Greig NH, et al. Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats. *J Clin Invest* 99: 2883–2889, 1997.
 34. Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, et al. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islets-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 143: 3152–3161, 2002.
 35. Wang Y, Egan JM, Raygada M, et al. Glucagon-like peptide-1 affects gene transcription and messenger ribonucleic acid stability of components of the insulin secretory system in RIN 1046-38 cells. *Endocrinology* 136: 4910–4917, 1995.

