

Relazione finale - Borse di Studio FODIRI-MSD anno 2014/2015

Nuovi meccanismi patogenetici nel diabete mellito:

Ruolo di heme-regulated eIF2- α kinase nella β cellula pancreatica

Candidata: Dr.ssa Monia Cito, Università di Parma

Tutor straniero: Prof. Miriam Cnop, Laboratory of Experimental Medicine - ULB Center for Diabetes Research, Université Libre de Bruxelles

Tutor italiano: Prof. Riccardo C. Bonadonna, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Parma

Nel diabete si assiste ad una progressiva perdita della massa e funzione delle β cellule. I meccanismi molecolari alla base di tale disfunzione e dell'apoptosi cellulare non sono ancora del tutto noti.

Numerose evidenze suggeriscono che lo stress del reticolo endoplasmatico (RE) sia un importante mediatore della disfunzione β cellulare nel diabete di tipo 1 (T1D) e di tipo 2 (T2D)^{1,2}. Le β cellule pancreatiche sono, in ragione dell'elevatissima sintesi proteica necessaria per sostenere la secrezione insulinica e del loro scarso corredo di enzimi anti-ossidanti, costituzionalmente vulnerabili allo stress del RE. Perturbazioni nell'omeostasi del RE portano all'accumulo di proteine mal ripiegate e all'attivazione di diverse strategie protettive, collettivamente denominate "Unfolded Protein Response" (UPR). L'UPR è regolato da tre proteine transmembrana: activating transcription factor (ATF)-6, inositol-requiring kinase-1 (IRE-1) e double-stranded RNA-activated kinase (PKR)-like ER kinase (PERK). ATF6 e IRE-1, una volta attivati, inducono la trascrizione di alcune chaperonine per incrementare le capacità funzionali del RE. L'attivazione di PERK invece induce fosforilazione dell'eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α), fattore di inizio della traduzione eucariotica, inibendo la sintesi proteica totale con conseguente riduzione nella richiesta traduzionale del RE.

Questo è un noto meccanismo adattativo per prevenire l'accumulo di proteine in presenza di stress e la conseguente citotossicità³.

Heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) è, insieme a PERK, protein kinase double-stranded RNA-dependent (PKR) e general control non-derepressible-2 (GCN2), membro della famiglia delle eIF2 α chinasi, che media le condizioni di stress cellulare, come infezioni virali, stress del RE, carenza di amminoacidi o eme, fosforilando la proteina eIF2 α ⁴. HRI è una proteina ubiquitaria, ed è principalmente espressa negli eritrociti, dove resta inattiva in presenza di sufficiente eme. In carenza di questa, HRI viene attivato e induce fosforilazione di eIF2 α e conseguente riduzione della sintesi delle globine, prevenendone perciò l'accumulo e l'instaurarsi di una condizione di stress del RE e apoptosi cellulare⁵. Ulteriori studi hanno inoltre dimostrato che la chinasi HRI media la citotossicità indotta da stress da calore, stress osmotico, esposizione a metalli pesanti e lipotossicità in differenti tipologie cellulari mediante la fosforilazione di eIF2 α ^{6,7}.

Dati derivanti da RNA sequencing dell'ULB Center for Diabetes Research (Bruxelles) hanno mostrato che HRI è l'eIF2 α chinasi maggiormente espressa in isole umane di donatori sani⁸, in β cellule primarie di ratto⁹ e in linee β cellulari umane (EndoC β H1) (Tabella 1). Tuttavia, ad oggi, non è ancora nota la sua funzione nella β cellula pancreatica.

		Human Islets	EndoC- β H1	Primary rat beta cells
EIF2AK1	HRI	68	55	24
EIF2AK2	PKR	7	10	6
EIF2AK3	PERK	11	7	10
EIF2AK4	GCN2	9	8	2

Tabella 1. RNA sequencing dei trascritti dei membri della famiglia delle eIF2 α chinasi in isole umane di donatori sani (Human Islets), linee β cellulari umane (EndoC β H1) e β cellule primarie di ratto (Primary rat β cells).

Lo scopo del progetto è stato perciò quello di studiare il ruolo della chinasi HRI in termini di vitalità e funzione della β cellula pancreatica.

RISULTATI

Per esaminare il ruolo della chinasi HRI nei meccanismi di vitalità cellulare, l'espressione genica di HRI è stata silenziata utilizzando due differenti small interfering RNA (siRNA), denominati H1 e H2, in un modello cellulare di insulinoma di ratto (INS-1E)¹⁰. Un siRNA incapace di silenziare alcuna proteina è stato utilizzato come controllo negativo. Il silenziamento di HRI (efficienza $\pm 60\%$) (Figura 1A) induceva un'aumentata apoptosi nelle cellule INS-1E in condizioni basali e potenziava la morte cellulare indotta da palmitato o citochine pro-infiammatorie, utilizzate rispettivamente come modello in vitro di noxae specifiche del diabete rispettivamente di tipo 2 e di tipo 1 (Figura 1B). Il clivaggio delle caspasi 3 e caspasi 9 confermava ulteriormente l'effetto apoptotico indotto dall'assenza di HRI (Figura 1C).

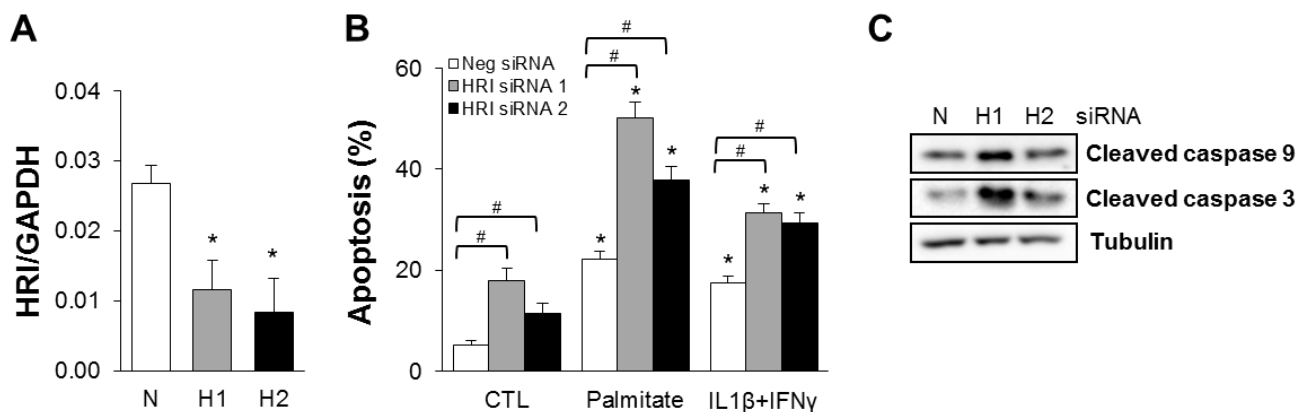


Figure 1. (A) Espressione genica di HRI in cellule INS-1E transfettate con siRNA negativo (N) o HRI siRNA (H1-H2) e normalizzata per l'espressione genica di un gene costitutivamente espresso, GAPDH. (B) Effetto del silenziamento genico di HRI sull'apoptosi in cellule INS-1E HRI KD in condizioni basali o trattate con palmitato o citochine pro-infiammatorie. (C) Analisi densitometrica del clivaggio di caspasi 3 e caspasi 9. Livelli di espressione della tubulina sono stati usati come controllo di caricamento delle proteine. * <0.05 vs N o CTL; # <0.05 come indicato.

Il passo successivo è stato quello di studiare quale via molecolare fosse coinvolta nei meccanismi protettivi mediati da HRI. Poiché HRI svolge un dimostrato ruolo chiave di protezione cellulare

attraverso l'UPR, è ragionevole ipotizzare che l'elevata espressione di HRI nelle β cellule induca l'attivazione di questi meccanismi protettivi. È stato perciò valutato l'impatto della perdita di HRI sulla fosforilazione di eIF2 α . Inaspettatamente, il silenziamento di HRI induceva un leggero aumento nella fosforilazione di eIF2 α . Importante notare come l'assenza della chinasi HRI induceva anche un aumento nell'attivazione della chinasi PERK, altro importante membro della famiglia delle eIF2 α chinasi nelle β cellule pancreatiche (Figura 2A). Probabilmente il lieve aumento nella fosforilazione di eIF2 α è dovuto all'incrementata attivazione di PERK, possibile meccanismo compensatorio dell'assenza di HRI. Ulteriori esperimenti sono necessari per confermare questa ipotesi.

La deficienza di HRI induceva inoltre una ridotta attivazione di IRE1 con conseguente riduzione di espressione del suo effettore a valle X-box binding protein 1 spliced (XBP1s) (Figura 2A), noto per indurre l'espressione di chaperonine e dei geni dell'endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD)¹¹, altro importante pathway dell'UPR. Tuttavia, l'overespressione virale di XBP1s non proteggeva la β cellula dall'apoptosi indotta dall'assenza di HRI (Figura 2B).

Questi dati dimostrano come l'UPR non sia coinvolto nei meccanismi di protezione β cellulare HRI-mediati.

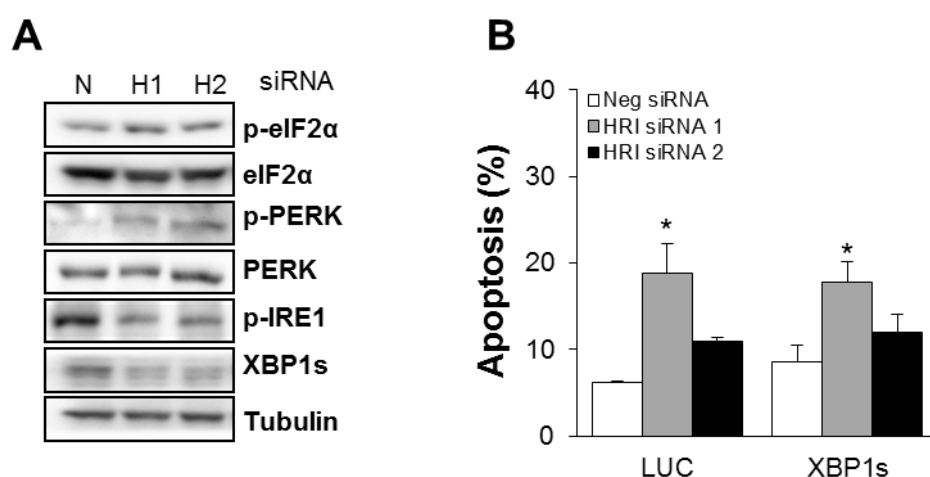


Figure 2. (A) Analisi densitometrica della fosforilazione di eIF2 α , fosforilazione di PERK, fosforilazione di IRE-1 ed espressione di XBP1s in cellule INS-1E transfettate con siRNA negativo (N) o HRI siRNA (H1-H2). eIF2 α totale, PERK totale e Tubulina sono stati usati come controllo di caricamento delle proteine. (B) Apoptosi in cellule INS-1E transfettate con siRNA negativo (N) o HRI siRNA (H1-H2) e infettate con luciferasi (LUC) o adenovirus overesprimenti XBP1s. * $p < 0.05$ vs Neg siRNA.

Diversi studi hanno dimostrato che il pathway di segnalazione mediato dalla proteina fosfatidilinositolo-3-chinasi/proteina chinasi B (PI3K/Akt) e l'inibizione della proteina c-Jun N-terminal kinases (JNK), svolgono un importante ruolo nella regolazione di diversi processi β cellulari come sopravvivenza e inibizione di apoptosi sotto diverse condizioni di stress, quali stress del RE, lipotossicità, infiammazione e stress ossidativo ^{12,13,14,15}.

Mittal e colleghi¹⁶ hanno dimostrato che HRI interagisce con la PI3K inducendo fosforilazione di Akt e conseguente inattivazione della proteina pro-apoptotica Bcl-2-associated death promoter (BAD) in cellule di mammifero. In accordo con questi risultati, abbiamo valutato la fosforilazione di Akt e del suo downstream target BAD in cellule INS-1E HRI knock down (KD), osservando una riduzione della fosforilazione di entrambe (Figura 3A). Il silenziamento di BAD proteggeva completamente le β cellule pancreatiche dall'apoptosi indotta dalla perdita di HRI (Figura 3B). Tuttavia, in condizioni di lipotossicità e infiammazione, il concomitante silenziamento di BAD e HRI, non conferiva alcuna protezione alla β cellula (Figura 3C-D). Questi dati dimostrano l'importanza del pathway HRI-Akt-BAD nei meccanismi basali di sopravvivenza β cellulari.

La figura 3A mostra inoltre come il silenziamento di HRI induca un'aumentata fosforilazione della proteina pro-apoptotica JNK. Precedenti studi hanno dimostrato come la morte β cellulare indotta dall'attivazione di JNK, sia mediata dal pathway di apoptosi mitocondriale, attraverso l'up-regolazione di tre effettori: BH3-only proteins Death protein 5 (DP5), p53 upregulated modulation or apoptosis (PUMA) e B-cell lymphoma 2-like protein 11 (Bim)¹⁷. Questi effettori, a valle della chinasi JNK, svolgono inoltre un ruolo importante nella modulazione della vitalità β cellulare in condizioni di T1D e T2D ^{18,19}. I nostri dati mostrano come il concomitante silenziamento di Bim, DP5, PUMA e HRI, proteggeva completamente le β cellule pancreatiche dall'apoptosi HRI KD-indotta (Figura 3B). Inoltre, la sensibilizzazione all'apoptosi indotta da palmitato o citochine infiammatorie nelle cellule β pancreatiche HRI-deficienti, era abolita dopo silenziamento dei tre effettori di JNK (Figura 3C-D).

Questi ultimi risultati evidenziano l'importanza di JNK e dei suoi downstream target come importanti effettori dei meccanismi protettivi β cellulari HRI-mediati.

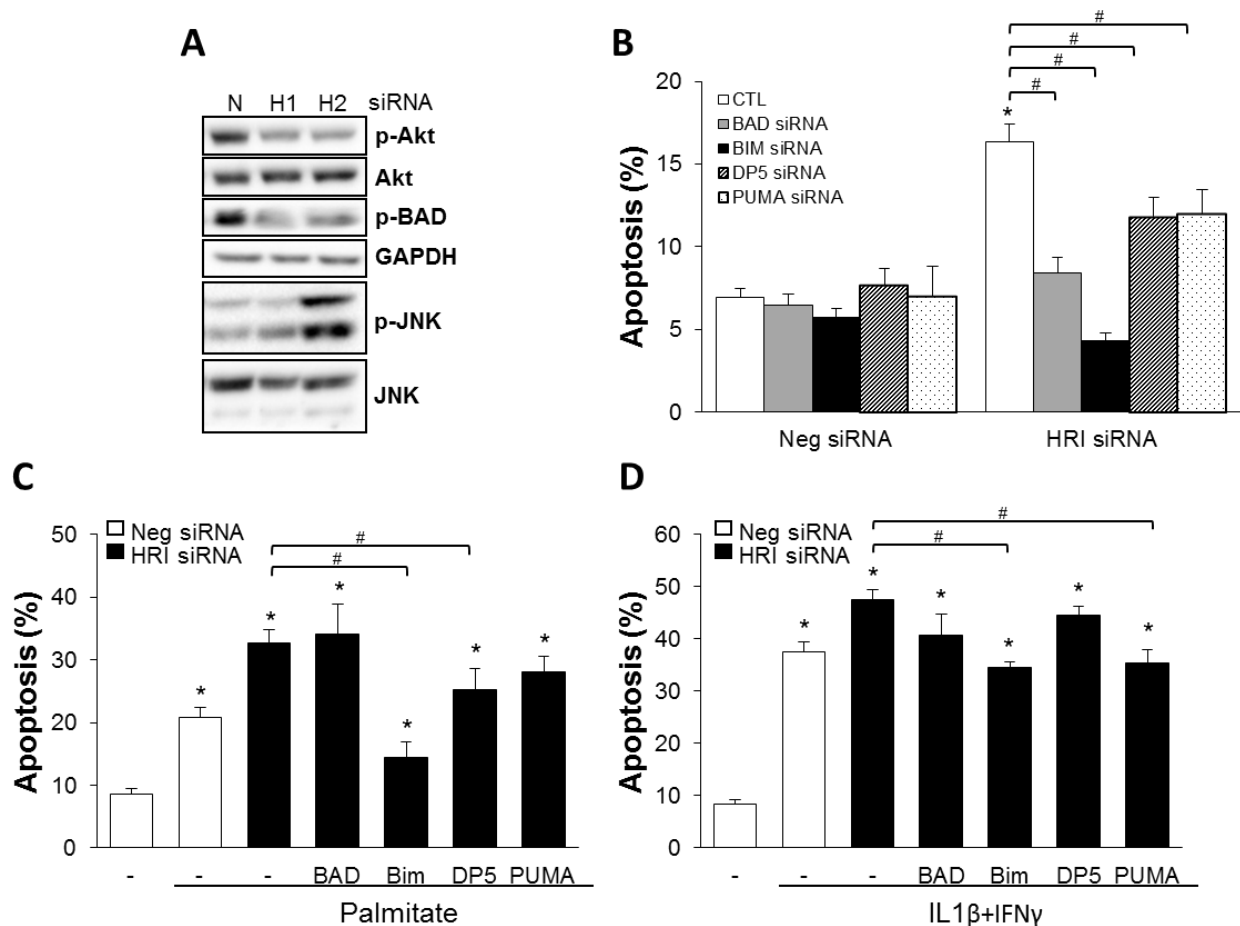


Figure 3. (A) Analisi densitometrica della fosforilazione di Akt, fosforilazione di BAD e fosforilazione di JNK in cellule INS-1E transfettate con siRNA negativo (N) o HRI siRNA (H1-H2). Livelli di espressione di Akt, GAPDH e JNK sono stati usati come controllo di caricamento delle proteine. (B) Apoptosi in cellule INS-1E transfettate con siRNA negativo (N) o HRI siRNA in combinazione con BAD, Bim, DP5 e/o PUMA siRNA ed esposte a (C) palmitato o (D) citochine infiammatorie. *p<0.05 vs Neg siRNA o controllo non trattato (-); #p<0.05 come indicato.

La riduzione della secrezione insulinica β -cellulare è uno degli eventi più precoci nella storia naturale del T2D ed è un marcatore della stessa nel T1D. Alla base di essa concorrono difetti di funzione e di massa β -cellulare, variamente intrecciati a seconda del tipo di diabete e della fase della storia naturale della malattia. Per esaminare il coinvolgimento della chinasi HRI in questi basilari meccanismi di

declino della massa funzionale β cellulare, è stata misurata la secrezione insulinica glucosio indotta in cellule INS-1E HRI KD. L'assenza di HRI induceva un aumento dei livelli di insulina glucosio-indotte rispetto al controllo (Figura 4A). Il contenuto cellulare totale di insulina non era alterato dalla deficienza di HRI (Figura 4B). Ulteriori esperimenti sono necessari per chiarire il coinvolgimento della chinasi HRI nella mediazione della funzionalità β cellulare.

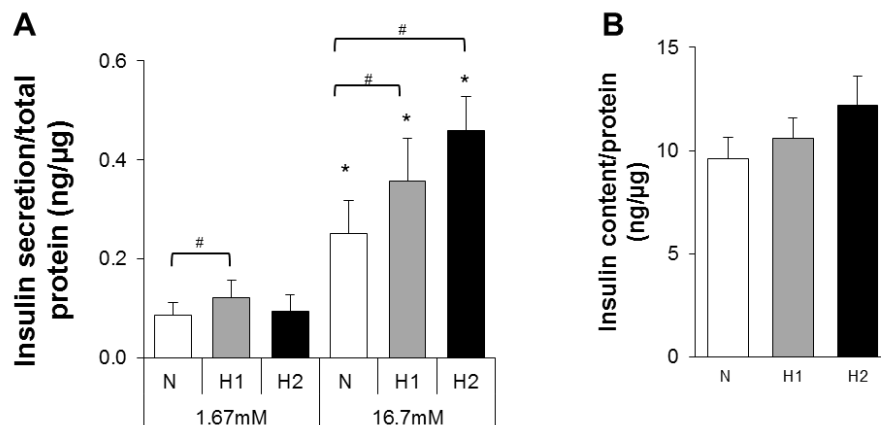


Figure 4. (A) Rapporto tra insulina secreta e proteine totali in cellule INS-1E transfettate con siRNA negativo (N) o HRI siRNA (H1-H2) e trattate con 1.67mM o 16.7mM di glucosio. (B) Rapporto tra contenuto insulinico totale e proteine totali in cellule INS-1E transfettate come nel pannello A. * $p < 0.05$ vs N; # $p < 0.05$ come indicato.

CONCLUSIONE

Questo studio ha permesso di definire il ruolo cruciale della chinasi HRI nel mediare la sopravvivenza β cellulare, sia in condizioni basali che diabetogeniche, attraverso i pathway molecolari di Akt/BAD e JNK.

La chinasi HRI rappresenta perciò un nuovo affascinante target per la modulazione del destino β cellulare e potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica per la cura del diabete mellito.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable β -cell. *BiochemSoc Trans* 2008.
- ² Marchetti P et al. The endoplasmic reticulum in pancreatic β cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* 2007.
- ³ Ron D. & Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007.
- ⁴ Suragani RN et al. Heme-regulated eIF2 kinase activated Atf4 signaling pathway in oxidative stress and erythropoiesis. *Blood* 2012.
- ⁵ Igarashi J et al. Autophosphorylation of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase and the role of the modification in catalysis. *FEBS J* 2011.
- ⁶ Zarei M et al. Heme-Regulated eIF2 α Kinase Modulates Hepatic FGF21 and Is Activated by PPAR β/δ Deficiency. *Diabetes* 2016.
- ⁷ Lu L et al. Translation Initiation Control by Heme-Regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase in Erythroid Cells under Cytoplasmic Stresses. *Mol. Cell Biol* 2001.
- ⁸ Cnop M et al. RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate. *Diabetes* 2014.
- ⁹ Villate O et al. Nova1 is a master regulator of alternative splicing in pancreatic β cells. *Nucleic Acids Res* 2014.
- ¹⁰ Asfari M et al. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 1992.
- ¹¹ Lee AH et al. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003.
- ¹² Srinivasan S et al. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3 β in mouse insulinoma cells. *Diabetes* 2005.
- ¹³ Kaneto H et al. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic β -cell dysfunction and insulin resistance. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2006.
- ¹⁴ Kaneto H et al. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J. Biol. Chem* 2002.
- ¹⁵ Cnop M et al. Mechanism of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes. Many Differences, Few Similarities. *Diabetes* 2005.
- ¹⁶ Mittal SP et al. Dose-dependent differential response of mammalian cells to cytoplasmic stress is mediated through the heme-regulated eIF2 α kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 2014.
- ¹⁷ Gurzov EN & Eizirik DL. Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of β -cell death and dysfunction. *Trends Cell Biol.* 2011.
- ¹⁸ Cunha DA et al. Death protein 5 and p53-upregulated modulator of apoptosis mediate the endoplasmic reticulum stress-mitochondrial dialog triggering lipotoxic rodent and human β -cell apoptosis. *Diabetes* 2012.
- ¹⁹ Nogueira TC et al. GLIS3, a susceptibility gene for type 1 and type 2 diabetes, modulates pancreatic β cell apoptosis via regulation of a splice variant of the BH3-only protein Bim. *PLoS Genet.* 2013.