



**ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE**

Rezumatul tezei de doctorat cu titlul:

**MECANISMELE MOLECULARE ALE
SECRETIEI INSULINEI IN CELULE β -
PANCREATICE**

**COORDONATOR ȘTIINȚIFIC:
DR. ȘTEFANA MARIA PETRESCU**

**DOCTORAND:
ALEXANDRU PETRUȚA-RAMONA**

**BUCUREȘTI
2015**

Cuprins (teza de doctorat in extenso)

Cuprins.....	pg. 4
Lista de abrevieri.....	pg. 9
Lista figurilor.....	pg. 11
Lista tabelor.....	pg. 16
Scopul Tezei.....	pg. 17
CAPITOLUL I.....	pg. 19
1.1. Introducere.....	pg. 19
1.2. Biosinteza insulinei în celule beta pancreatice.....	pg. 20
1.3. Structura insulinei.....	pg. 22
1.4. Relațiile dintre structura și funcțiile insulinei.....	pg. 23
1.5. Sinteza insulinei în reticulul endoplasmic.....	pg. 25
1.6. Conversia proinsulinei în insulina și peptid C.....	pg. 30
1.7. Glucoza și controlul transcripțional al insulinei.....	pg. 31
1.8. Mecanismul de degradare a proteinelor asociat reticulului endoplasmic (ERAD) în celule β -pancreatice.....	pg. 33
1.9. Autofagia și degradarea componentelor din RE.....	pg. 35
1.10. Reglarea insulinei la nivel transcripțional.....	pg. 36
1.11. Reglarea insulinei la nivel translațional.....	pg. 39
1.12. Mecanisme moleculare implicate în secreția insulinei.....	pg. 41
1.13. Exocitoza insulinei mediată de complexul SNARE.....	pg.45
Capitolul II.....	pg.48
MATERIALE ȘI METODE.....	pg. 48
2.1. MATERIALE.....	pg. 48
2.1.1. Software.....	pg. 51
2.1.2. Soluții și reactivi folosiți în tehnici de biochimie.....	pg. 51
2.1.3. Culturi celulare.....	pg. 53
2.1.4. Materiale folosite la experimente de culturi de celule.....	pg. 54
2.1.5. Materiale și reactivi folosiți în experimente de microscopie de imunofluorescența.....	pg. 58
2.1.6. Materiale și reactivi folosiți pentru tehnica de clonare a proteinei EDEM3 și Proinsulină.....	pg. 58
2.1.7. Materiale și tampoane folosite în studiul pe animale.....	pg. 60
2.1.8. Animale de laborator și loturile de pacienți nou diagnosticat.....	pg. 61
2.2. METODE.....	pg. 62
2.2.1. Transformarea prin șoc termic.....	pg. 62
2.2.2. Amplificarea și purificarea ADN plasmidial.....	pg. 63
2.2.3. Electroforeza ADN în gel de agaroză.....	pg.64
2.2.4. Clonarea proteinei EDEM3 recombinantă.....	pg.65
2.2.5. Expresia proteinei recombinante pHAT2-EDEM3 în sistem procariot.....	pg. 65
2.2.6. Purificarea proteinei recombinante pHAT2-EDEM3.....	pg. 66
2.2.7. Verificarea proteinei purificare prin tehnica Western Blot.....	pg. 67
2.2.8. Dializa proteinei de fuziune pHAT2-EDEM3.....	pg. 68
2.2.9. Concentrarea proteinei EDEM3 recombinante.....	pg. 68
2.2.10. Imunizarea iepurelui și preluarea anticorpilor policlonali anti- EDEM3.....	pg. 68
2.2.11. Verificarea specificității anticorpilor în vederea folosirii în tehnica Western blot.....	pg. 69
2.2.12. Testarea anticorpilor anti-EDEM3 în tehnica de imunoprecipitare.....	pg. 70

2.2.13. Testarea specificității anticorpilor anti EDEM3 în vederea folosirii lor în tehnica de imunofluorescență.....	pg. 70
2.2.14. Clonarea insulinei în vectorul de expresie pTriEx.....	pg. 71
2.2.15. Cultivarea celulelor.....	pg. 72
2.2.16. Transfecția tranzientă a celulelor.....	pg. 73
2.2.17. Small interfering RNA (siRNA).....	pg. 74
2.2.18. Digestia enzimatică EndoH și PNG-aza F.....	pg. 74
2.2.19. Determinarea concentrației proteice totale prin metoda BCA assay.....	pg. 75
2.2.20. Electroforeza în gel de poli(acrilamida) SDS-PAGE.....	pg. 76
2.2.21. Electroforeza în gel de poli(acrilamida) Tris-Tricina-SDS-PAGE.....	pg. 77
2.2.22. Western Blot.....	pg. 78
2.2.23. Microscopia de imunofluorescență.....	pg. 79
2.2.24. Cuantificarea expresiei insulinei intra și extracelulară prin metoda Elisa.....	pg. 80
2.2.25. Generarea transfecției stabile în sistem RetroMAX.....	pg. 81
2.2.26. Obținerea retrovirusului pentru proteinele implicate în calea ERAD.....	pg. 82
2.2.27. Generarea liniilor celulare care exprimă stabil proteinele EDEM1, EDEM2, EDEM3, OS9.1, OS9.2 și XTP.....	pg. 83
2.2.28. Analiza traficului proinsulinei prin metoda Pulse-Chase.....	pg. 84
2.2.29. Inhibarea sintezei de insulină cu cicloheximidă.....	pg. 85
2.2.30. Destabilizarea insulinei prin inhibarea activității manozidazice cu kifunensină.....	pg. 86
2.2.31. Studiul în vivo pe animale de laborator.....	pg. 87
2.2.32. Producerea retrovirusului pLPCX/pLPCX-EDEM.....	pg. 87
2.2.33. Inducerea diabetului cu streptozotocină.....	pg. 87
2.2.34. Injectarea animalelor de laborator cu retrovirus.....	pg. 88
2.2.35. Liza organelor și analiza prin Western blot a insulinei și proteinei EDEM1.....	pg. 88
2.2.36. Glucoza și testul de toleranță la glucoză.....	pg. 89
2.2.37. Pregătirea probelor pentru analiza imuno-histopatologică.....	pg. 89
2.2.38. Analiza biochimică a probelor preluate de la animalele de laborator.....	pg. 89
2.2.39. Parametrii clinici determinați în studiul în vivo pe model animal.....	pg. 89
2.2.40. Parametrii clinici determinați în studiul în vivo pe pacienți cu diabet de tip II nou diagnosticat.....	pg. 89
2.2.41. Analiza Statistică.....	pg. 92
CAPITOLUL III.....	pg. 93
REZULTATE ȘI DISCUȚII	
3.1. Producerea și caracterizarea anticorpilor policlonali anti-EDEM3	pg. 93
3.1.1. Clonarea, expresia și purificarea proteinei recombinante din sistem bacterian.....	pg. 93
3.1.2. Obținerea și caracterizarea anticorpilor policlonali anti-EDEM3.....	pg. 95
3.1.3. Testarea specificității anticorpilor anti-EDEM 3 în tehnica de imunofluorescență.....	pg. 96
3.1.4. Testarea specificității anticorpilor anti EDEM 3 în tehnica de imunoprecipitare.....	pg. 98
3.1.5. DISCUȚII.....	pg. 100
3.2. Rolul proteinelor EDEM și căii de degradare asociată reticulului endoplasmic în traficului proinsulinei.....	pg. 101
3.2.1. Expresia endogenă a proinsulinei/insulinei în linii celulare beta pancreatice.....	pg. 101

3.2.2. Clonarea proinsulinei umane.....	pg. 103
3.2.3. Supraexpresia tranzientă a proteinei EDEM1 în linii secretoare de insulina.....	pg. 105
3.2.4. Modularea nivelului de expresie al proteinelor EDEM1, EDEM2 și EDEM3 în celule secretoare de insulina INS-1E.....	pg. 108
3.2.5. Efectul supraexpresiei proteinelor EDEM1, EDEM2 și EDEM3 asupra nivelului de expresiei al proinsulinei în celule INS-1E.....	pg. 109
3.2.6. EDEM1 crește semnificativ proinsulina biosintetizată.....	pg. 110
3.2.7. EDEM2 scade semnificativ expresia proinsulinei biosintetizată.....	pg. 112
3.2.8. EDEM3 crește moderat expresia proinsulinei biosintetizată.....	pg. 113
3.2.9. Rolul EDEM1 în secreția bifazică a insulinei.....	pg. 114
3.2.10. Efectul EDEM1 asupra secreției de proinsulină în trei clone cu nivel diferit de expresie al EDEM1.....	pg. 117
3.2.11. Efectul proteinelor EDEM1 și EDEM2 asupra (pro)insulinei independent de stimularea secreției de insulina cu glucoză.....	pg. 118
3.2.12. Analiza expresiei și localizării sub-celulare a proinsulinei prin microscopie confocală.....	pg. 119
3.2.13. Traficul proinsulinei/insulinei în celule beta pancreatice INS-1E.....	pg. 122
3.2.14. Supraexpresia proteinei EDEM1 scade nivelul de expresie al proteinei prohormon convertaza 2 (PC2).....	pg. 124
3.2.15. Cinetica traficului proinsulinei în celulele beta pancreatice.....	pg. 125
3.2.16. Inhibarea traficului proinsulinei cu brefeldina A în celule beta pancreatice.....	pg. 126
3.2.17. Sinteza și secreția (pro)insulinei analizată prin Western Blot în condiții reducătoare și nereducătoare.....	pg. 131
3.2.18. Rolul supraexpresiei EDEM1 în plierea proinsulinei.....	pg. 134
3.2.19. Rolul ERAD în traficul proinsulinei în celule β -pancreatice.....	pg. 135
3.2.20. Stresul din reticulul endoplasmic al celulelor beta pancreatice.....	pg. 137
3.2.21. Funcționalitatea proteinei EDEM1 exprimată stabil în linia celulară beta pancreatica INS-1E.....	pg. 139
3.2.22. Inhibarea căii de degradare asociată reticulului endoplasmic în celule beta pancreatice INS-1E.....	pg. 142
3.2.23. Discuții.....	pg. 146
3.3. Experimente în vivo.....	pg. 149
3.3.1. Rolul EDEM1 în diabetul indus cu streptozotocină la șobolani.....	pg. 149
3.3.2. Obținerea retrovirusului EDEM1.....	pg. 149
3.3.3. Inducerea diabetului cu streptozotocină (STZ) în șobolani.....	pg. 152
3.3.4. Supraexpresia proteinei EDEM1 în model diabetic animal.....	pg. 153
3.3.5. Supraexpresia proteinei EDEM1 conduce la scăderea concentrației de glucoză în ser.....	pg. 154
3.3.6. Creșterea toleranței la glucoză prin supraexpresia EDEM1.....	pg. 155
3.3.7. Efectul tratamentului cu pLPCX-EDEM1 asupra insulinei din ser.....	pg. 157
3.3.8. Complicațiile diabetului și efectul benefic al supraexpresiei proteinei EDEM1 asupra greutatei corporale a animalelor cu diabet.....	pg. 159
3.3.9. Rolul EDEM1 asupra parametrilor clinici.....	pg. 160
3.3.10. Caracteristici generale.....	pg. 162
3.3.1.1 DISCUȚII.....	pg. 164
CAPITOLUL IV.....	pg. 165
REZULTATE ȘI DISCUȚII	
4.1. Statusul oxidant și antioxidant la pacienții cu diabet zaharat	

de tip II nou diagnosticat	pg. 165
4.2. Rezultate studiul 1.....	pg. 166
4.3. Discuții studiul 1.....	pg. 170
4.4. Rezultate studiul 2.....	pg. 171
4.5. Discuții studiul 2.....	pg. 173
CAPITOLUL V.....	pg. 175
CONCLUZII GENERALE.....	pg. 175
CAPITOLUL VI.....	pg. 178
BIBLIOGRAFIE.....	pg. 178
Lista de lucrări publicate.....	pg. 193

INTRODUCERE

Diabetul zaharat de tip 2 (DZT2) este o boala metabolica cronica care apare ca rezultat al interactiei dintre factori genetici si factori de mediu [1]. DZT2 este caracterizat prin cresterea rezistentei la insulina si hiperglicemia cronica care conduce la deteriorarea functiilor celulelor beta pancreatice si reducerea masei celulelor β -panceratice [2].

Insulina este un hormon responsabil in mentinerea homeostaziei glucozei fiind secretat de celulele beta pancreatice din insulele Langerhans ale pancreasului. Proinsulina este sintetizata de ribozomii atasati reticulului endoplasmic (RE) ca precursor al insulinei [3]. In lumenului RE proinsulina este pliata prin formarea a trei puncti disulfidice. Precursorul proinsulinei este alcatuit din lantul A (21 aminoacizi, lantul B (30 aminoacizi) si peptidul C, ca punte de legatura intre A si B. (fig. 1) [4].

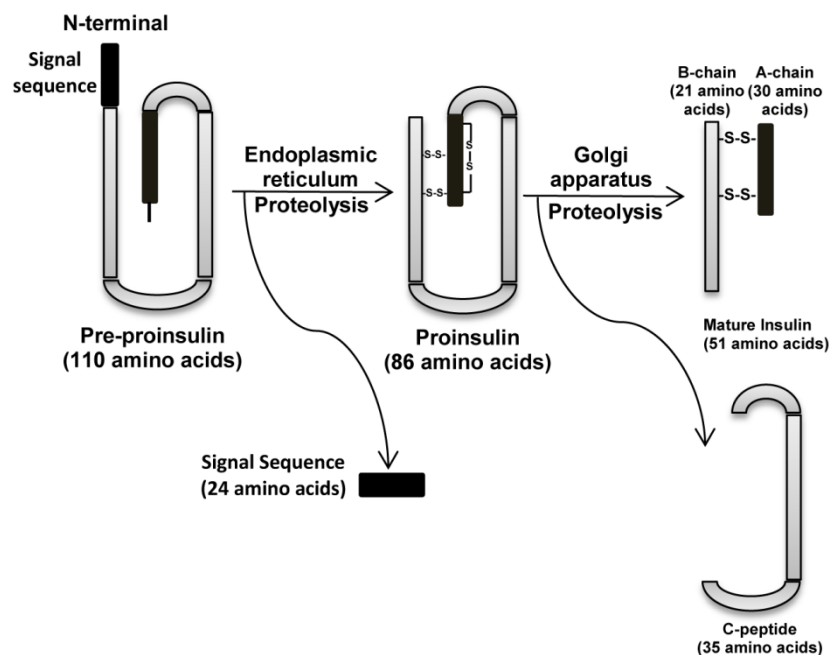


Figura 1. Sinteza și secreția insulinei în celulele beta pancreatice. Preproinsulina este sintetizată de ribozomii atași de reticulul endoplasmic rugos după care este translocată în lumenul reticulului endoplasmic unde este convertită în proinsulina prin îndepărtarea peptidei semnal. Aici, proinsulina este pliată prin formarea a trei puncte disulfurice. Proinsulina corect pliată este apoi transportată la aparatul Golgi unde este impachetată în vezicule de secreție. În interiorul granulelor de secreție proinsulina este scindată în insulina matură și peptid-C și este stocată, sub forma hexamerului conectat prin zinc, până în momentul eliberării prin exocitoză indusă prin stimuli [5].

Ulterior, proinsulina corect pliată este transportată din RE în aparatul Golgi unde este impachetată în vezicule. Procesarea proinsulinei în insulina și peptid C are loc în veziculele de

secretie sub actiunea endopeptidazelor (PC1/3 si PC2) si carboxipeptidazei E [6]. In aceste vezicule insulina matura este stocata, sub forma hexamerului, pana in momentul eliberari prin exocitoza indusa prin stimul. [7]. Glucoza este principalul stimul de secretie care moduleaza eliberarea insulinei din celulele beta. Glucoza este transportata in celulele beta prin intermediul transportorului de glucoza, GLUT-2 si dupa fosforilarea ei de catre glucokinaza este metabolizata pentru a genera ATP [8]. Un raport ATP/ADP crescut determina inchiderea canalelor de K_{ATP} ceea ce permite acumularea ionilor de potasiu in celula, depolarizarea ulterioara a membranei, deschiderea canalelor de Ca_{2+} dependente de voltaj, influxul de Ca_{2+} [9]. Concentratiile intracelulare mari de calciu stimuleaza la randul lor fuziunea veziculelor cu membrana plasmatica si eliberarea continutului lor prin exocitoza [10].

Secretia insulinei ca urmare a stimularii prin glucoza este un proces bifazic in care prima faza de secretie implica eliberarea rezervei de insulina gata de secretie (readily releasable pools, RRP) de la nivelul membranei plasmaticice si are loc in aprox. 5-10 minute dupa stimulare. Cea de-a doua faza de secretie implica transportata spre membrana plasmatica a rezervei de insulina (reserved pool) pentru a putea fi eliberata prin exocitoza [11].

In urma stimularii cu glucoza pana la 50% din totalul proteinelor sintetizate in aceste celule sunt reprezentate de insulina, indicand faptul ca celulele beta pancreatice prezinta un reticul endoplasmic extrem de versatil, iar sinteza si procesarea insulinei reprezinta principala activitate a celulelor beta pancreatice [12].

Reglarea corecta a homeostaziei proteinelor in celula este critica pentru sanatatea intregului organism. Proteinele intracelulare si cele secretate trebuie sa fie sintetizate si mentinute in cantitati adecvate, pliate in conformatia corecta si modificate corespunzator post-translational, pentru a fi directionate spre destinatia finala unde sa isi poata exercita functia biologica [13]. In cele mai multe cazuri, esecul reglarii corecte la orice punct de control din celula produce disfunctia la nivel celular, ducand la dezvoltarea unor boli, precum diabetul zaharat de tip 2 [14].

Degradarea si indepartarea proteinelor incorect pliate din RE este cunoscuta sub denumirea de degradare asociata reticulului endoplasmic (ERAD) [15]. Polipeptidele nou sintetizate si incorect pliate sunt captate de chaperoane (calnexina/calreticulina) si enzimele de pliere Bip/PDI ca si proteinele de soc termic HSP47 pentru a fi ajutate sa se plieze. Polipeptidele corect pliate sunt transportate in aparatul Golgi cu ajutorul masinarii de transport. Proteinele care nu au dobandit conformatia corect pliata sunt recunoscute specific si izolate de catre sistemul de recunoastere ERAD (proteinele EDEM, Erdj5, Bip, Sel1L, OS9 si XTP3B) si sunt transferate masinarii de dislocare (HRD1, Derlin, Herp si p97). Apoi,

proteinele incorect pliate sunt retrotranslocate in citosol prin dislocon si poli-ubiquitinate, pentru a fi, in final, degradate prin proteazom [16]. Proteinele din familia EDEM (ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1) EDEM 1, EDEM2 si EDEM3 sunt manozidaze implicate in controlul calitatii plierii proteinelor si al degradarii substratelor ERAD [17]. Pana acum, cele mai multe studii au investigat mecanismul prin care substratele ERAD sunt recunoscute de catre proteinele EDEM si nu se cunosc multe lucruri despre alte functii ale acestor proteine [18].

SCOPUL TEZEI

Teza de doctorat își propune descifrarea rolului căii de degradare a proteinelor asociată reticulului endoplasmic, ERAD, în traficul proinsulinei și elucidarea mecanismului celular prin care ERAD modulează secreția insulinei. Acest lucru a fost posibil datorită suportului teoretic și practic care mi-a fost oferit în cadrul Departamentului de Biologie Moleculară a Celulei, din Institutul de Biochimie, unde există expertiză în investigarea mecanismelor moleculare ale procesului de biosinteză și degradare a proteinelor secretorii. Cercetări recente în cadrul Departamentului au demonstrat un rol important în calea ERAD al proteinei EDEM1, în degradarea antigenelor tumorale a căror maturare are loc în RE [19].

La nivelul celulei beta pancreatice, homeostazia proteinelor în RE este un proces de care depinde în mare măsură secreția insulinei, de aceea degradarea proteinelor prin calea

ERAD poate fi esențială pentru funcționarea celulei. Pornind de la aceste rezultate, mi-am propus să cercetez în cadrul acestei teze dacă proteinele EDEM și calea asociată ERAD sunt implicate în biosinteza proinsulinei și în traficul intracelular al insulinei. De asemenea, un alt obiectiv a fost testarea rolului fiziologic al proteinelor implicate în ERAD în modele experimentale animale.

REZULTATE

Rolul proteinelor EDEM in traficul proinsulinei

Pentru a evalua rolul proteinelor EDEM in traficul proinsulinei intr-o prima faza am obtinut linii celulare beta pancreatice INS-1E ce supraexprima proteinele EDEM1 (INS-1E-EDEM1), EDEM2 (INS-1E-EDEM2) si respectiv EDEM3 (INS-1E-EDEM3) si am analizat

efectul acestor proteine asupra proinsulina in comparatie cu celulele INS-1E-Ctrl (ce exprima vectorul gol-pLPCX).

Cand EDEM1 a fost supraexprimat stabil in celulele INS-1E s-a putut observa o crestere dependenta de concentratia glucozei a continutului de proinsulina. Supraexpresia EDEM2 a avut un efect opus si a determinat o scadere a continutul de insulina comparativ cu celulele control. Asemnator supraexpresiei proteinei EDEM1, supraexpresia proteinei EDEM3 a crescut moderat continutul de insulina. Aceste rezultate sugereaza faptul ca in liniile celulare beta pancreatice INS-1E proteinele EDEM sunt implicate in traficul proinsulinei.

Efectul supraexpresiei proteinei EDEM1 asupra secretiei bifazice de insulina

Dupa ce am demonstrat faptul ca supraexpresia proteinei EDEM1 creste sinteza si secretia de proinsulina am investigat efectul supraexpresiei sale asupra fazei I de secretie a insulinei ca raspuns la stimularea prin glucoza. Celulele INS-1E-EDEM1 stimulate cu trei concentratii diferite de glucoza au aratat o crestere semnificativa a continutului intracelular si secretiei de insulina in prima faza de secretie comparativ cu celulele control (transduse cu vectorul pLPCX).

In continuare, am investigat rolul EDEM1 in faza II de secretie a insulinei stimulata prin glucoza. Interesant, expresia si secretia proinsulinei au fost crescute in celulele INS-1E-EDEM1. Cuantificarea intensitatii relative a benzilor de proinsulina din gel a aratat o crestere de expresie de proinsulina cu 5% la stimularea celulelor cu concentratie bazala de glucoza si 20% la stimulare celulelor cu concentratie crescuta de glucoza in celule INS-1E-EDEM1 comparativ cu celulele control (INS-1E-PLPCX). Prin Western Blotting atunci cand filmul a fost expus pentru o perioada mai indelungata de timp a putut fi detectata si insulina in celulele INS-1E-EDEM1 dar nu si in celulele control.

Impreuna, toate aceste rezultate sugereaza faptul ca EDEM1 este implicat in ambele faze de secretiei ale insulinei crescand capacitatea celulelor beta de a raspunde la stimularea cu glucoza.

Efectele supraexpresiei EDEM1 asupra distributiei subcelulare a proinsulinei

Efectul supraexpresiei proteinei EDEM1 asupra traficului proinsulinei a fost determinat prin imunofluorescenta si vizualizare la microscopul confocal. Pentru aceasta, au fost analizate prin microscopie confocala probe de imunofluorescenta folosind celulele INS-1E-Ctrl si respectiv INS-1E-EDEM1 folosind anticorpi specifici fata de insulina sau PDI (marker pentru RE).

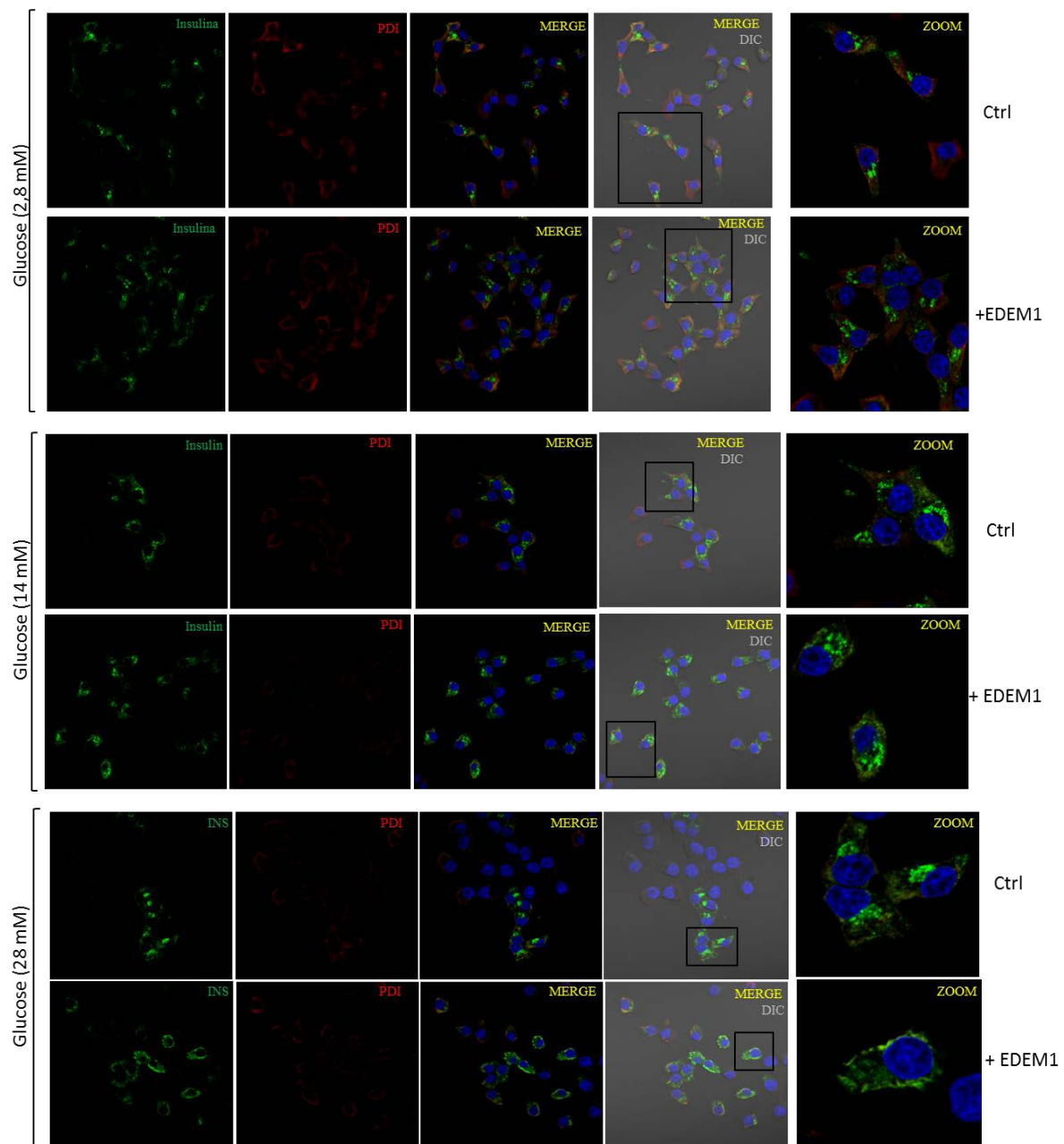


Figura 2. Distributia subcelulara a proinsulinei este modulata de supraexpresia proteinei EDEM1 in linia celulara maligna de sobolan INS-1. Celulele INS-1E-Ctrl si

INS-1E-EDEM1 au fost mentinute in mediu fara glucoza dupa care au fost tratate cu concentratii diferite de glucoza. Ulterior, celulele au fost fixate si procesate pentru marcarea proinsulinei (verde), PDI (marker RE) (rosu) si respectiv a ADNului (albastru). Sunt aratate imagini reprezentative pentru trei experimente individuale.

Marcarea insulinei in celulele INS-1E_EDEM1 a fost mai crescuta decat in celulele control, sugerand prezenta unei cantitati mai mari de insulina in aceste celule. Mai mult, celulele stimulate cu o concentratie crescuta de glucoza au aratat o acumulare a proinsulinei in vecinatatea membranei plasmactice sugerand o pregatire a acesteia pentru secretie.

Efectul supraexpresiei proteinei EDEM1 asupra timpului de injumatatire al proinsulinei

Examinarea stabilitatii proinsulinei a fost realizata prin tratarea celulelor cu cicloheximida si masurarea fractiunilor de proinsulina la 20, 40 si 60 de minute.

Testul la cicloheximida (CHX) a aratat ca insulina a fost mai stabila in celulele cu EDEM1 supraexprimat. Mai mult, a crescut atat continutul celular al proinsulinei cat si cantitatea de proinsulina secretata. Cuantificarile densitometrice ale benzilor de proinsulina din gel de tricina au aratat ca stabilitatea proinsulinei a fost crescuta prin supraexpresia lui EDEM1 si timpul sau de injumatatire a crescut de la aproximativ 20 min la 40 min.

EDEM1 este functional in celulele INS-1E-EDEM1

Se stie din literatura ca EDEM1 are rol in calea de degradare ERAD fiind implicat in identificarea si trimiterea spre degradare a proteinelor incorect pliate. Pentru a demonstra ca in celulele INS-1E-EDEM1, EDEM1 supraexprimat este functional am testat abilitatea acestuia de a accelera degradarea proteinei NHK (mutanta nula Hong Kong a α 1-antitripsinei). Datele din literatura au demonstrat ca degradarea NHK este dependenta de EDEM1. Asa cum era de asteptat supraexpresia proteinei EDEM1 a accelerat degradarea proteinei NHK indicand faptul ca EDEM1 supraexprimat este functional in celulele beta pancreatice INS-1E-EDEM1.

In timp ce supraexpresia proteinei EDEM1 a accelerat degradarea mutantei NHK, continutul de proinsulina a crescut, fapt care a fost in concordanta cu rezultatele anterioare.

In continuare, a fost suprimata degradarea asociata RE prin inhibarea activitatii manozidazice cu kifunensina si urmarita expresia proinsulinei intracelulare si extracelulare

in linia care exprima stabil EDEM1 sau in linia control (pLPCX). In urma tratamentului cu kifunensina s-a observat o scadere a proinsulinei intracelulara cat si secretata atat in celule control cat si celule INS-1E-EDEM1.

Presupunand ca inhibarea activitatii manozidazice impiedica legarea proteinei EDEM1 de proteina SEL1L (un component important al complexului ERAD), putem presupune ca traficul proinsulinei este dependent de calea ERAD.

Discutii

In aceasta teza, am investigat rolul proteinelor EDEM1, EDEM2 si EDEM3 in modularea traficului proinsulinei. Rezultatele obtinute indica faptul ca in celulele beta pancreatice proteinele EDEM sunt implicate in traficul proinsulinei.

Am gasit ca EDEM1 este implicat in ambele faze de secretie ale insulinei, crescand sinteza si secretia insulinei. De asemenea, am aratat ca timpul de injumatatire al proinsulinei a crescut in celule ce supraexprima EDEM1. Experimentele de imunofluorescenta au aratat atat o crestere semnificativa a expresiei proinsulinei, cat si un numar crescut de granule de secretie in vecinatatea membranei plasmatiche pregatite pentru secretie in urma stimulării cu glucoza.

ROLUL FIZIOLOGIC AL PROTEINEI EDEM1 IN MODEL DIABETIC ANIMAL

Rolul EDEM1 asupra tolerantei la glucoza

In diabet functia celulei beta este perturbata, aceasta nu mai produce suficienta insulina sau nu mai raspunde corespunzator la insulina, instalandu-se fenomenul de rezistenta la insulina. O metoda de investigare a diabetului în clinica, este testul de toleranța la glucoza. Metoda presupune administrarea unei cantități destul de crescuta de glucoza și monitorizarea răspunsului celulei beta pancreatice, care trebuie să declanșeze semnale de crestere a nivelului insulinei pentru a scadea nivelul glucozei din sange.

Diabetul a fost indus in model animal de sobolan Wister prin injectarea acestora cu streptozotocina [20]. Actiunea streptozotocinei în celule beta pancreatice este însoțita de alterarea nivelului insulinei din ser și cresterea concentrație glucozei. Schimbarile care se produc, dezvoltarea hiperglicemiei și scăderea nivelului insulinei din sange reflecta dereglarea funcției celulei beta pancreatice [21]. STZ deterioreaza oxidarea glucozei [22] și scade biosinteza și secreția de insulină [23]. S-a observat ca STZ in primul rand anuleaza răspunsul

celulei beta la glucoza, care inițial încerca să compenseze printr-o revenire temporara, dar care este urmata de deteriorarea și pierderea permanenta a celulelor beta [24]

Administrarea constructului retroviral si determinarea glicemiei din sange s-au efectuat zilnic in cele trei grupuri de animale (lotul 1-STZ, lotul 2, +STZ-pLPCX, lotul 3, +STZ-EDEM1) [25]. In acest studiu testul a fost realizat imediat dupa inducerea diabetului și la sfârșitul experimentului, după tratament pentru a evalua rolul EDEM1 in răspunsul celulei beta pancreatice la glucoza.

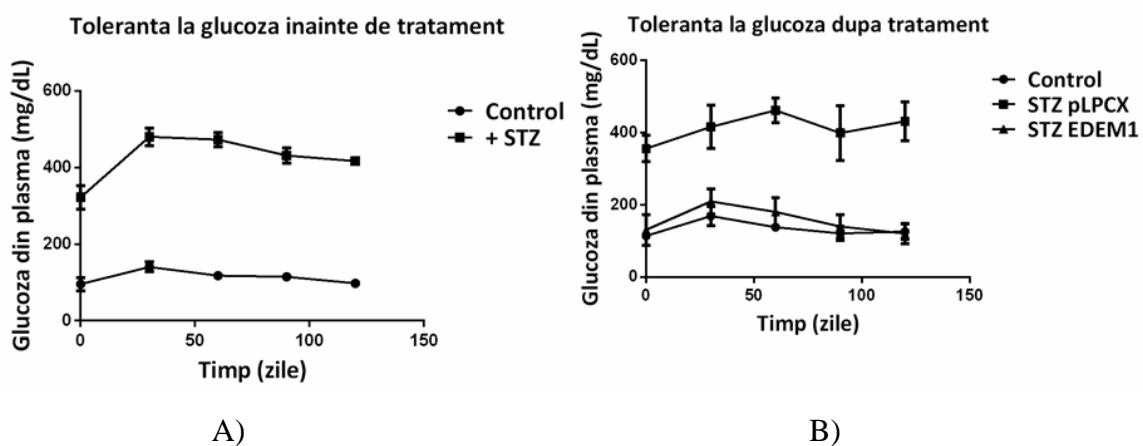


Figure 3. Creșterea toleranței la glucoză prin trasductia pLPCX-EDEM1 în model diabetic animal. Glucoza a fost administrata in cele trei loturi de animale. Toleranța la glucoză a fost monitorizata imediat după administrarea glucozei inainte de tramentul cu pLPCX-EDEM1 (fig. 3A) și după trament (fig 3B). Graficele sunt reprezentate ca medie ± SEM.

Tratamentul cu streptozotocina a condus la scaderea tolerantei la glucoza in lotul (+STZ) comparativ cu lotul control (-STZ). In schimb, toleranta la glucoza a fost semnificativ îmbunătățită in lotul STZ+EDEM1 ($P < 0,001$). Totodata, grupul de animale tratate +STZ-pLPCX la sfârșitul tratamentului au prezentat toleranta scazuta la glucoza.

Aceste date sugerează că proteina EDEM1 are un rol important in cresterea tolerantei la glucoza, probabil prin îmbunatașirea funcției celulei beta pancreatice, creșterea capacitații de secretie a insulinei si de răspuns la concentrații de glucoza crescute.

Rolul proteinei EDEM1 in hiperglicemia indusa cu streptozotocina in model animal

Cu scopul de a elucida efectul transducerii EDEM1 asupra hiperglicemiei in model diabetic animal au fost determinate zilnic concentratiile de glucoza din sange.

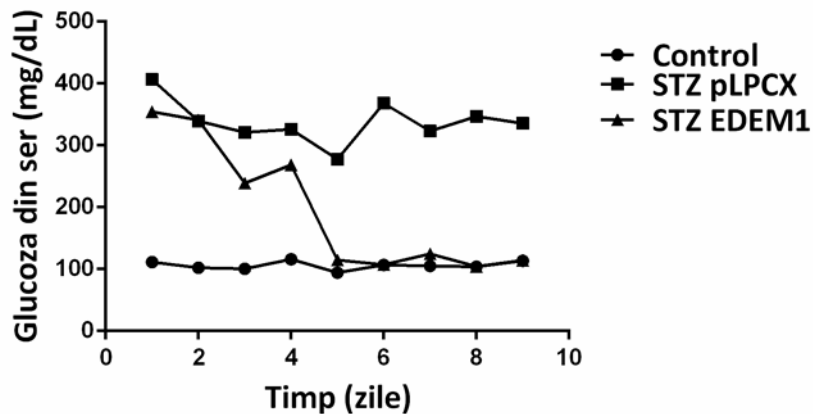


Figura 4. Scaderea concentratiei de glucoza din sange prin transductia EDEM1 in model diabetic animal. Cantitatea de glucoza din sange (mg/dl) a fost monitorizata zilnic, după 8h de la privarea de hrana. Valorile reprezinta media \pm SD (Lot control (şobolani fara diabet) n=4, Lot STZ-pLPCX (lot cu diabet indus si injectati cu pLPCX, n=4), lot STZ-EDEM1 (lot cu diabet indus si injectati cu pLPCX-EDEM1, n=9). Asterix (*) prezinta diferenta inalt semnificativa faşa de grupul control (pLPCX), ($p < 0,0014$, ***).

Analiza masuratorilor concentratiei de glucoza din sange a semnalat o scadere semnificativa in grupul +STZ-EDEM1, la sfarsitul experimentului valorile glucozei ajungand la nivelul glicemiilor determinate in lotul control (-STZ). In schimb, valorile glicemiilor determinate in lotul +STZ-pLPCX, au prezentat valori peste 300mg/dl, indicand prezenta diabetului (fig.4).

Rolul EDEM1 asupra insulinei in model diabetic animal

In urma tratamentului cu constructii retrovirale PLPCX and PLPCX-EDEM1 a fost determinata concentratia insulinei din serul si pancreasul celor trei grupuri prin ELISA si Western Blot.

A)

B)

C)

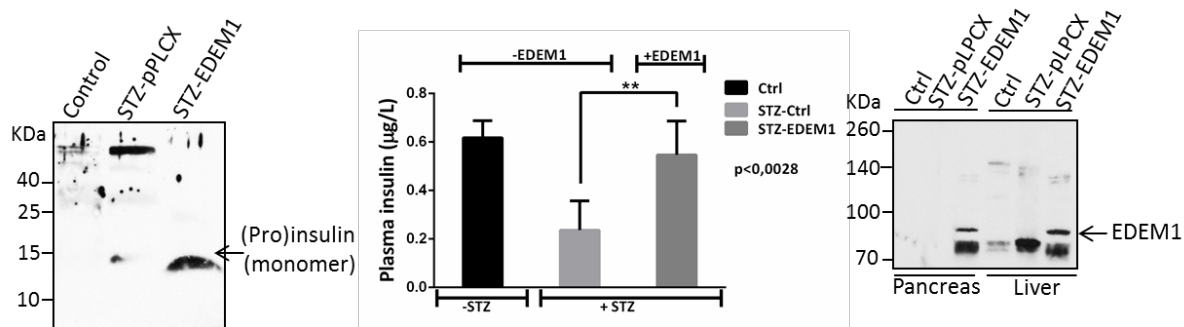


Figure 5. Efectul tratamentului cu pLPCX-EDEM1 asupra insulinei din ser. Nivelul insulinei din ser imediat după inducerea diabetului cu STZ (2 zile), B) arată nivelul insulinei din ser după 7 zile de tratament. Concentrația insulinei din ser s-a determinat prin metoda Elisa (kit Rat/Mouse Insulin). Toate valorile sunt exprimate ca medie \pm DS. **, $P < 0,0028$.

Concentrația de insulină determinată prin metoda ELISA a fost semnificativ crescută în grupul +STZ-EDEM1 comparativ cu grupul +STZ-PLPCX. De asemenea, determinarea insulinei prin Western Blot a indicat faptul că transducția proteinei EDEM1 a condus la detectarea proinsulinei sub forma monomerului, comparativ cu grupul +STZ-pLPCX, unde proinsulina a fost detectată sub forma de oligomeri.

Pentru validarea eficienței de transducție a constructului în modelul diabetic folosit a fost analizată expresia proteinei EDEM1 în ficat și pancreas prin Western Blot, detectând un nivel crescut de expresie a EDEM1 în grupul +STZ-EDEM1 (Fig.5).

Discuții

În capitolul precedent am arătat că supraexpresia proteinei EDEM1 crește sinteza și secreția proinsulinei. În studiul prezentat în acest capitol am investigat rolul fiziologic al proteinei EDEM1 în model diabetic animal.

Testul de toleranță la glucoză a arătat că animalele la care s-a administrat EDEM1, au prezentat o creștere a toleranței la glucoză, sugerând că pancreasul dispune de o rezervă de insulină și răspunde la stimulare cu glucoză. Concentrația insulinei eliberată în sânge a fost semnificativ crescută în grupul de animale tratate cu EDEM1, comparativ cu grupul control. Detectia insulinei prin Western blot în grupul +STZ-EDEM1 a sugerat faptul că insulină este detectabilă majoritar sub forma monomerului de insulină, în comparație cu grupul +STZ-PLPCX unde a fost detectată insulină sub forma de oligomeri și doar o cantitate mică în forma monomerului de insulină.

CONCLUZII GENERALE

- ✓ Au fost obținute linii celulare pancreatice ce exprimă un nivel crescut de expresie al proteinelor EDEM1, EDEM2, EDEM3 și s-a demonstrat implicarea acestora în traficul proinsulinei în celule beta pancreatice
- ✓ Supraexpresia proteinei EDEM1 crește atât proinsulina intracelulară cât și secreția insulinei fiind implicată în ambele faze ale secreției a insulinei.
- ✓ Prin microscopie confocală s-a demonstrat că în prezența proteinei EDEM1 și a unei concentrații crescute de glucoză (folosită ca stimul) localizarea subcelulară a proinsulinei fiind detectată în imediată apropiere a membranei plasmatică sugerând că aceasta este pregătită pentru a fi secretată.
- ✓ Prin experimente de imunoprecipitare și urmărirea în timp (pulse-chase) s-a arătat că supraexpresia EDEM1 crește atât rata de injumătățire a proinsulinei cât și rata de secreție.
- ✓ Supraexpresia EDEM1 a condus la creșterea nivelului de expresie al unor proteine implicate în ERAD.
- ✓ EDEM1 accelerează degradarea formei incorect pliată a proteinei α 1-antitripsina (NHK), indicând faptul că EDEM1 supraexprimat este funcțional în linia beta pancreatică INS-1E.
- ✓ Administrarea constructului retroviral pLPCX-EDEM1 în modelul diabetic animal a condus la creșterea concentrației de insulină, toleranța la glucoză și scăderea hiperglicemiei la valori normale.
- ✓ Rezultatele prezentate sugerează că EDEM1 poate fi implicat și în alte procese celulare, în plus față de calea ERAD, precum creșterea sintezei și secreției de proinsulină și poate fi folosit cu succes în scop terapeutic în diabet.

MULTUMIRI

In primul rand vreau sa multumesc conducatorului de doctorat Dr. Stefana Petrescu pentru suport, indrumarile si discutiile stiintifice si mai ales pentru ca m-a acceptat in laboratorul Dansei unde am invatat tot ce stiu astazi.

Vreau sa aduc multumiri speciale membrilor comisiei de doctorat, Dr. Anca Roseanu, Profesor Dr. Mircea Leabu, Acad. Constantin Ionescu-Tragoviste pentru citirea critica a tezei si sugestiile primite

Vreau sa multumesc Dr. Daniela Lixandru si Dr. Bogdana Vargolici pentru ajutorul acordat in realizarea experimentele *in vivo*.

De asemenea, vreau sa multumesc Dr. Simona Ghenea care m-a ajutat la clonarea proteinelor EDEM3 si Proinsulinei si care impreuna cu Gabriela Chiritoiu au clonat genele EDEM in sistem retroviral.

Si nu in ultimul rand vreau sa multumesc celor dragi mie, familiei mele care m-au inteles si m-au sustinut neconditionat in toti acesti ani si carora vreau sa le dedic acesta teza.

BIBLIOGRAFIE SELECTATA

1. Ling, C. and L. Groop, *Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes*. Diabetes, 2009. **58**(12): p. 2718-25.
2. Kasuga, M., *Insulin resistance and pancreatic beta cell failure*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1756-60.
3. Eizirik, D.L., A.K. Cardozo, and M. Cnop, *The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus*. Endocr Rev, 2008. **29**(1): p. 42-61.
4. Fu, Z., E.R. Gilbert, and D. Liu, *Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes*. Curr Diabetes Rev, 2013. **9**(1): p. 25-53.
5. Ren, J., et al., *Pancreatic islet cell therapy for type I diabetes: understanding the effects of glucose stimulation on islets in order to produce better islets for transplantation*. J Transl Med, 2007. **5**: p. 1.
6. Itoh, Y., et al., *Prohormone convertases (PC1/3 and PC2) in rat and human pancreas and islet cell tumors: subcellular immunohistochemical analysis*. Pathol Int, 1996. **46**(10): p. 726-37.
7. Jewell, J.L., E. Oh, and D.C. Thurmond, *Exocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(3): p. R517-31.
8. Tiedge, M. and S. Lenzen, *Regulation of glucokinase and GLUT-2 glucose-transporter gene expression in pancreatic B-cells*. Biochem J, 1991. **279** (Pt 3): p. 899-901.
9. Kang, G., et al., *A cAMP and Ca²⁺ coincidence detector in support of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in mouse pancreatic beta cells*. J Physiol, 2005. **566**(Pt 1): p. 173-88.
10. Hou, J.C., L. Min, and J.E. Pessin, *Insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis*. Vitam Horm, 2009. **80**: p. 473-506.

11. Huang, M. and J.W. Joseph, *Assessment of the metabolic pathways associated with glucose-stimulated biphasic insulin secretion*. *Endocrinology*, 2014. **155**(5): p. 1653-66.
12. Sun, J., et al., *Proinsulin misfolding and endoplasmic reticulum stress during the development and progression of diabetes*. *Mol Aspects Med*, 2015. **42**: p. 105-18.
13. Hartley, T., et al., *Endoplasmic reticulum stress response in an INS-1 pancreatic beta-cell line with inducible expression of a folding-deficient proinsulin*. *BMC Cell Biol*, 2010. **11**: p. 59.
14. Kaufman, R.J., et al., *The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(6): p. 411-21.
15. Tiwari, A., et al., *SDF2L1 interacts with the ER-associated degradation machinery and retards the degradation of mutant proinsulin in pancreatic beta-cells*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 9): p. 1962-8.
16. He, K., et al., *PDI reductase acts on Akita mutant proinsulin to initiate retrotranslocation along the Hrd1/Sel1L-p97 axis*. *Mol Biol Cell*, 2015. **26**(19): p. 3413-23.
17. Avezov, E., et al., *Endoplasmic reticulum (ER) mannosidase I is compartmentalized and required for N-glycan trimming to Man5-6GlcNAc2 in glycoprotein ER-associated degradation*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(1): p. 216-25.
18. Cormier, J.H., et al., *EDEM1 recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex*. *Mol Cell*, 2009. **34**(5): p. 627-33.
19. Cioaca, D., et al., *C-terminus glycans with critical functional role in the maturation of secretory glycoproteins*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19979.
20. Delaney, C.A., et al., *Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability*. *Biochem Pharmacol*, 1995. **50**(12): p. 2015-20.
21. West, E., O.R. Simon, and E.Y. Morrison, *Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats*. *West Indian Med J*, 1996. **45**(2): p. 60-2.
22. Vaca, P., et al., *Nicotinamide induces differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells*. *Exp Cell Res*, 2008. **314**(5): p. 969-74.
23. Nukatsuka, M., et al., *Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity*. *J Endocrinol*, 1990. **127**(1): p. 161-5.
24. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. *Diabetologia*, 1985. **28**(7): p. 412-9.
25. Rousseau, A., et al., *TRAF4 is a novel phosphoinositide-binding protein modulating tight junctions and favoring cell migration*. *PLoS Biol*, 2013. **11**(12): p. e1001726.