

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**



**Bakalářská práce**

**Mechanismy indukce apoptózy pankreatických  $\beta$ -buněk  
v důsledku stresu endoplazmatického retikula při  
diabetu 2. typu**

**Apoptosis of pancreatic  $\beta$ -cells induced by endoplasmic  
reticulum stress and its mechanisms in type 2 diabetes**

**Daniela Glatzová**

**Školitel: Mgr. Vlasta Němcová**

**Praha 2010**

**Poděkování patří mé školitelce Mgr. Vlastě Němcové z Oddělení buněčné a molekulární biologie 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy za pomoc, cenné rady a neskonalou trpělivost, které mi poskytla při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu během mého studia.**

**Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala sama s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svojí školitelkou.**

**Daniela Glatzová**

**Praha 2010**

## Abstrakt

Vzrůstající incidence onemocnění diabetes mellitus 2. typu představuje jeden z hlavních zdravotních problémů 21. století. Roste množství důkazů pro to, že incidence diabetu 2. typu koreluje s narůstající mírou obezity a že důležitým faktorem hrajícím roli při vzniku tohoto onemocnění je zvýšená hladina glukózy a mastných kyselin v krvi. Chronicky zvýšené koncentrace těchto živin indukují apoptózu pankreatických  $\beta$ -buněk, která následně přispívá k progresi onemocnění. Navzdory intenzivnímu výzkumu však nejsou mechanismy takto indukované ztráty  $\beta$ -buněk stále objasněny. Narůstá množství důkazů o tom, že jedním z klíčových procesů apoptózy  $\beta$ -buněk vyvolané působením glukózy a mastných kyselin je indukce stresu endoplazmatického retikula. Cílem této práce je shrnout současné znalosti o indukcii apoptózy vlivem stresu endoplazmatického retikula u pankreatických  $\beta$ -buněk ve vztahu k diabetu 2. typu.

**Klíčová slova:** apoptóza, diabetes mellitus 2. typu, pankreatické  $\beta$ -buňky, stres endoplazmatického retikula

## Abstract

Increasing incidence of type 2 diabetes represents one of the principal threats to human health in the 21st century. Strong evidence indicates that the rise in incidence of type 2 diabetes is correlated with increasing levels of obesity and that important factor playing role in the development of this disease is an elevation in circulating glucose and fatty acids. Chronically increased concentration of these nutrients was shown to induce apoptosis of pancreatic  $\beta$ -cells that subsequently contributes to diabetes progression. Despite intensive research, molecular mechanisms underlying this  $\beta$ -cells loss are still unclear. However, there is increasing evidence that one of the key processes involved in glucose and fatty acid-induced  $\beta$ -cell death is induction of endoplasmic reticulum stress. The aim of this work is to summarize the recent knowledge about induction of apoptosis by endoplasmic reticulum stress in pancreatic  $\beta$ -cells in relation to type 2 diabetes.

**Key words:** apoptosis, endoplasmic reticulum stress, pancreatic  $\beta$ -cells, type 2 diabetes

# Obsah

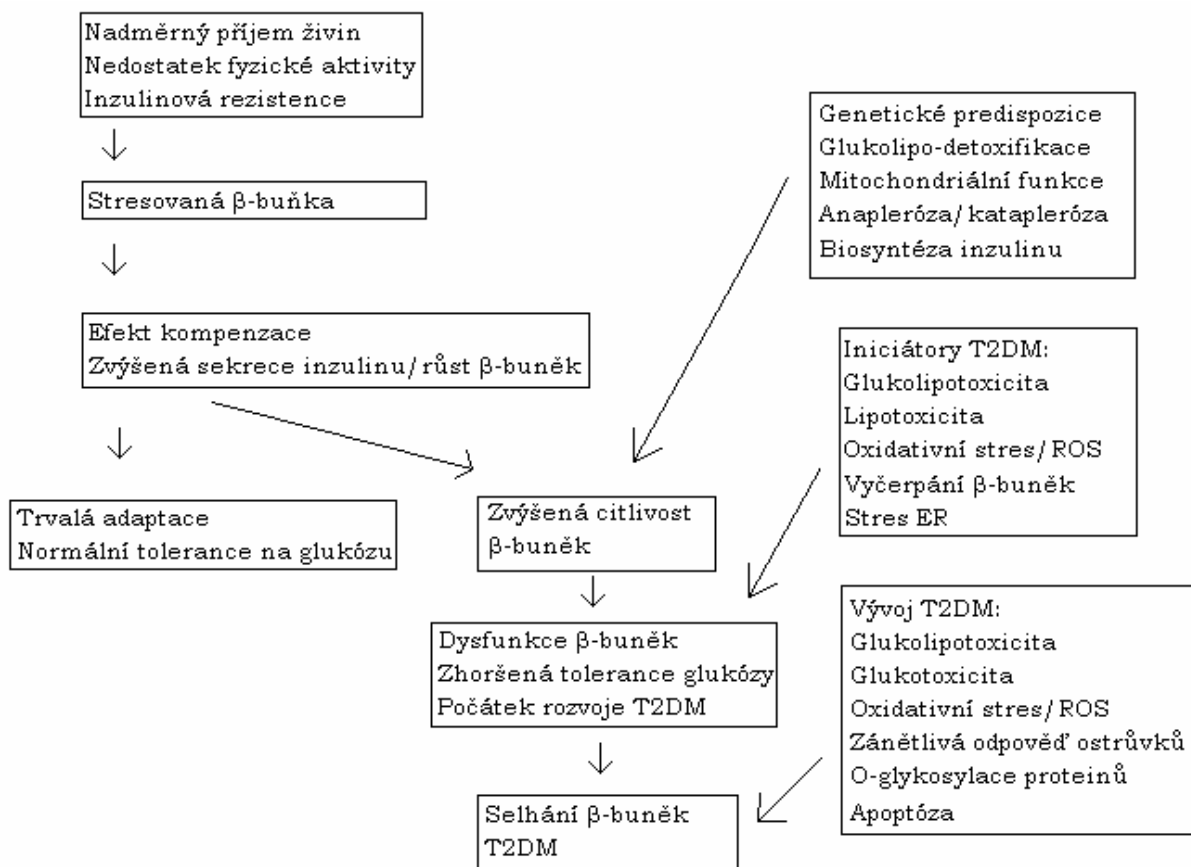
1	Úvod	...	6
2	Stres ER	...	8
2.1.	Dráha UPR	...	8
2.1.1	IRE1 $\alpha$	...	9
2.1.2	PERK	...	11
2.1.3	ATF6	...	12
2.2.	Další mechanismy, kterými se buňka brání stresu ER	...	13
2.2.1	ER-asociovaná degradace	...	13
2.2.2	Autofagocytóza	...	14
3	Geneticky podmíněné syndromy vedoucí k apoptóze pankreatických $\beta$ -buněk vlivem stresu ER	...	15
3.1	Wolcott-Rallisonův syndrom	...	15
3.2	Wolframův syndrom	...	15
3.3	Myší model Akita	...	16
4	Apoptóza indukovaná stresem ER v pankreatických $\beta$ -buněkách	...	18
4.1	Indukce apoptózy pankreatických $\beta$ -buněk v důsledku stresu ER u T2DM	...	19
4.1.1	Role glukózy	...	19
4.1.2	Role mastných kyselin	...	20
4.2	Mediátory apoptózy $\beta$ -buněk indukované stresem ER	...	22
4.2.1	Indukce apoptózy $\beta$ -buněk prostřednictvím transkripčního faktoru CHOP	...	22
4.2.2	Indukce apoptózy $\beta$ -buněk prostřednictvím JNK kinázy	...	23
4.2.3	Role Ca <sup>2+</sup>	...	24
4.2.4	Role kaspázy 12	...	26
5	Závěr	...	28
6	Seznam zkratk	...	29
7	Seznam použité literatury	...	30

# 1 Úvod

Diabetes mellitus 2. typu (T2DM) patří mezi civilizační choroby způsobené moderním životním stylem spojeným s nadměrným přejídáním, sníženou fyzickou aktivitou a z toho vyplývající obezitou. K rozvoji tohoto onemocnění dochází ve většině případů u geneticky predisponovaných jedinců. Genetické pozadí tohoto onemocnění je však nejednoznačné a roli zde kromě velké genetické variability hraje i velké množství exogenních činitelů (přehledně v Lebovitz 1999).

Reakcí pankreatických  $\beta$ -buněk na zvýšený příjem živin v potravě a na inzulínovou rezistenci, která je častým průvodním jevem obezity, je zvýšení sekrece inzulínu, ve snaze udržet normální hladinu glukózy v krvi. Tento proces se nazývá kompenzační. Zahrnuje nárůst množství  $\beta$ -buněk, zvýšenou produkci inzulínu a zároveň zvýšenou vnímavost pro živinami indukovanou sekreci inzulínu. U většiny lidí je tato kompenzace dostatečně účinná a k rozvoji diabetu nedojde. Avšak u části populace nestačí a po určité době dojde k vyčerpání  $\beta$ -buněk, jejich dysfunkci a z toho vyplývající inzulínové deficienci, glukózové intoleranci a následně hyperglykémii. Důsledkem je postupný zánik  $\beta$ -buněk apoptózou, programovanou buněčnou smrtí (viz Obr. 1).

Za hlavní induktory apoptózy  $\beta$ -buněk u T2DM jsou považovány zvýšená hladina mastných kyselin a glukózy v krvi. Výzkumy posledních let ukazují, že klíčovou úlohu v patogenezi diabetu 2. typu a apoptóze pankreatických  $\beta$ -buněk, která ho provází, hraje stres endoplazmatického retikula (ER).



Obr. 1. Schéma mechanismu dysfunkce  $\beta$ -buněk během diabetu mellitu 2. typu (upraveno podle Prentki et Nolan 2006).

## 2 Stres ER

Sekretorické buňky jsou i za běžných fyziologických podmínek vystaveny velkému kolísání v množství potřeby nově translatovaných proteinů, které je třeba přivést do nativní konformace. Správná funkce ER, organely zodpovědné za produkci proteinů sekretovaných z buňky, je pro tyto buňky velmi důležitá. Závažnými stresovými faktory pro ER jsou změny v oxidativním prostředí, které je zde aktivně udržováno a které je nezbytné pro tvorbu disulfidických můstků a dosažení správné konformace proteinů. K takovýmto změnám může docházet například při hypoxii a působením různých oxidačních a redukčních činidel (toxických látek). Také změna v metabolismu  $\text{Ca}^{2+}$  závažně ovlivňuje  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní proteiny, například Bip, Grp94 nebo calreticulin, které tento kationt potřebují pro svou správnou funkci. Podobný účinek jako výše zmíněné stresory mohou mít i mutace v proteinech syntetizovaných do ER. Ty mohou vést k tomu, že proteiny nemohou zaujmout správnou konformaci a kumulují se v lumen ER. Hromadění špatně složených proteinů má za následek spuštění signálních drah, které se souhrně označují jako UPR (unfolded protein response). Dysfunkce UPR hraje velmi důležitou úlohu v mnohých lidských onemocněních. Diabetes mellitus 2. typu je jedním z nich (Scheuner et Kaufman 2008).

### 2.1 Dráha UPR

Na pankreatické  $\beta$ -buňky jsou kladené vysoké nároky, co se týče rychlé a adekvátní reakce na proměnlivou potřebu produkce inzulinu. Uvádí se, že i bez příjmu potravy tvoří produkce inzulinu 40-50% celkové produkce proteinů krysích  $\beta$ -buněk. S tím souvisí i nutnost rychlé reakce  $\beta$ -buňky na změnu podmínek tak, aby se zabránilo zahlcení chaperonů, které napomáhají ke správnému složení proteinů v ER, a tím nárůstu množství nesbalených proteinů, včetně inzulinu, uvnitř organely. Tyto reakce jsou



řízené pomocí UPR (přehledně v Marciniak et al. 2006). V rámci této odpovědi dochází k indukci exprese chaperonů a tím zvýšení kapacity ER, translace nových proteinů je dočasně pozastavena a proteiny, které nejsou schopné dosáhnout v ER své nativní konformace, jsou transportovány z ER do cytosolu a degradovány proteasomem. Tento proces je nazýván ER-asociovaná degradace (ERAD, viz kap. 2.2.1). Důležitou úlohu hraje též autofagocytóza. Společně s částí ER může být tímto mechanismem odstraněna část proteinů, které již nemohou dosáhnout své nativní konformace, a ER tak zmenšuje svojí velikost. Pokud se žádnými z těchto kroků nepodaří dosáhnout homeostázy ER, je spuštěna apoptóza a buňka umírá.

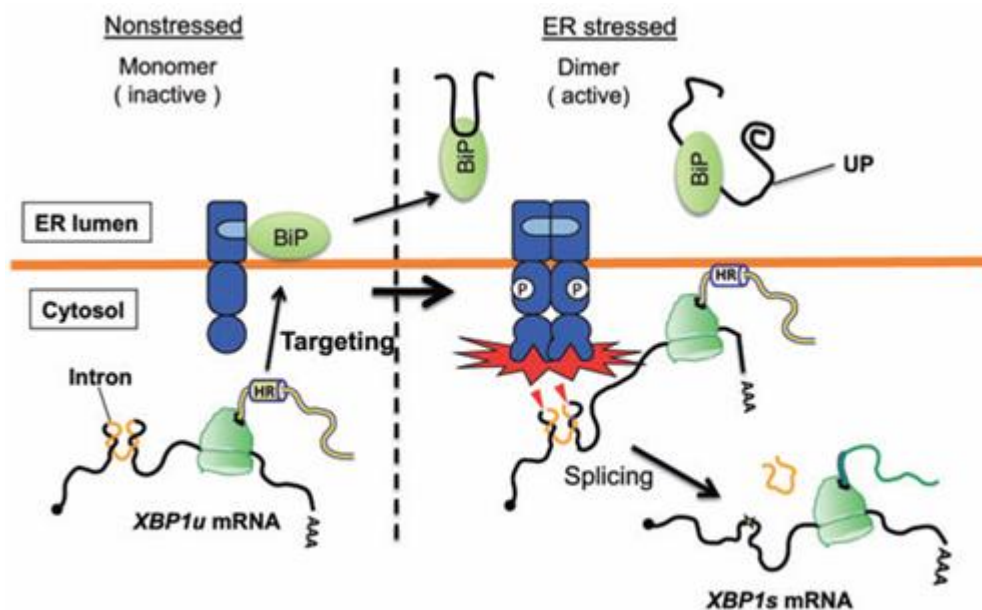
Zatímco u kvasinek UPR zahrnuje pouze jednu signální dráhu, a to aktivaci proteinu IRE1, následné naštěpení HAC1 mRNA a indukci transkripce odpovídajících genů pro UPR (Welihinda et al. 1996, Niwa et al. 2005), v savčích buňkách je systém UPR rozvinutější. Kromě IRE1 se na signalizaci UPR v ER podílí ještě dvě další molekuly: proteiny ATF6 a PERK (Okada et al. 2002).

### 2.1.1 IRE1 $\alpha$

IRE1 $\alpha$  (inositol-requiring ER-to-nucleus signal kinase 1 $\alpha$ ) je transmembránovým proteinem ER, schopným reagovat na zvyšující se množství špatně sbalených proteinů v lumen ER. V savčích buňkách se nacházejí dva typy IRE1, IRE1 $\alpha$  a IRE1 $\beta$ . Protein IRE1 $\alpha$  je exprimován ve všech buňkách těla, nejvíce však v placentě a pankreatu (Tirasophon 1998), zatímco IRE1 $\beta$  je exprimován pouze v epitelálních buňkách gastrointestinálního traktu (Wang et al. 1998).

IRE1 $\alpha$  je v evoluci eukaryot velmi konzervovaný. Za normálních podmínek interaguje s jeho N-koncovou doménou orientovanou do lumen ER molekulární chaperon Bip, protein z rodiny HSP70, a brání tak jeho aktivaci. Bip je hlavním chaperonem ER, váže se přechodně na mnohé nascentní

proteiny v ER a napomáhá jejich správnému sbalení. Pokud se v ER akumulují nesložené proteiny, Bip se na ně přednostně váže a uvolní se tak z vazby na IRE1 $\alpha$ . IRE1 $\alpha$  poté oligomerizuje a aktivuje se transautofosforylací (Bertolotti et al. 2000). C-koncová část IRE1 $\alpha$ , nacházející se v cytosolu, je efektorovou doménou. Nese proteinkinázovou a RNázovou enzymatickou aktivitu. Autofosforylací IRE1 $\alpha$  se jeho RNázová (endonukleázová) doména aktivuje a vystřihuje intron z XBP1 mRNA (viz Obr. 2). Sestřihem dochází k posunutí čtecího rámce a translací této sestřižené mRNA vzniká funkční transkripční faktor, který v jádře heterodimerizuje s proteinem NF-Y. Dosud bylo popsáno, že se váže na 2 typy cis-aktivních elementů v genových promotorech, a to ERSE (ER stress response element) a UPRE (unfolded protein response element), které kontrolují expresi genů nutných pro UPR jako jsou například geny pro proteiny sloužící k degradaci špatně sbalených proteinů. (Yoshida et al. 2001, Lee et al. 2003).



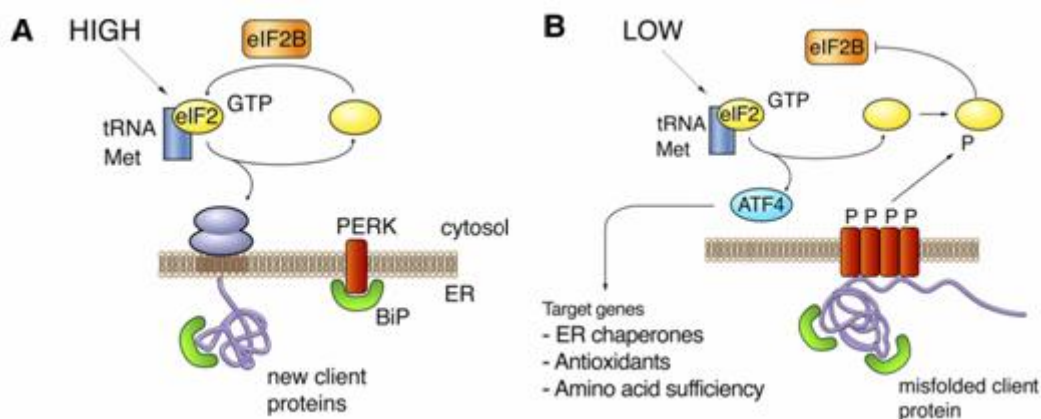
Obr.2. Schéma aktivace IRE1 $\alpha$  a následného štěpení XBP-1 mRNA (převzato z Kohno et al. 2009).

### 2.1.2 PERK

PERK je také transmembránovým proteinem ER. Podobně jako IRE1 $\alpha$  reaguje na stres ER oligomerizací, aktivací a následnou signalizací do jádra. Je zajímavé, že k jeho aktivaci dochází velmi podobným způsobem jako u IRE1, přestože jejich lumenální domény nevykazují téměř žádnou podobnost (Bertolotti et al. 2000). Mechanismus aktivace je stejně jako u IRE1 založený na oddisociování chaperonu Bip, který udržuje PERK v inaktivním stavu, pokud je na něj navázán (Yoshida et al. 2001). Aktivovaný PERK má mnohem větší afinitu pro svůj substrát, translační iniciační protein eIF2, než jeho neaktivovaná forma.

Syntéza proteinů u eukaryot je regulována hlavně na úrovni iniciace translace. Translace začíná, pokud jsou mRNA a iniciační (Met)-tRNA navázané na velkou podjednotku ribosomu. Transkripční iniciační faktor eIF2 je GTP vazebný protein, který přináší na ribozom iniciační (Met)-tRNA (přehledně v Kozak 1999) (viz Obr. 3.). Aktivovaný PERK fosforyluje  $\alpha$ -podjednotku eIF2 na Ser51, tím brání hydrolýze jeho GTP a vzniku ternárního komplexu, což má za následek inhibici celkové translace mRNA a snížení množství nově příchozích proteinů do ER (Harding et al. 2000a).

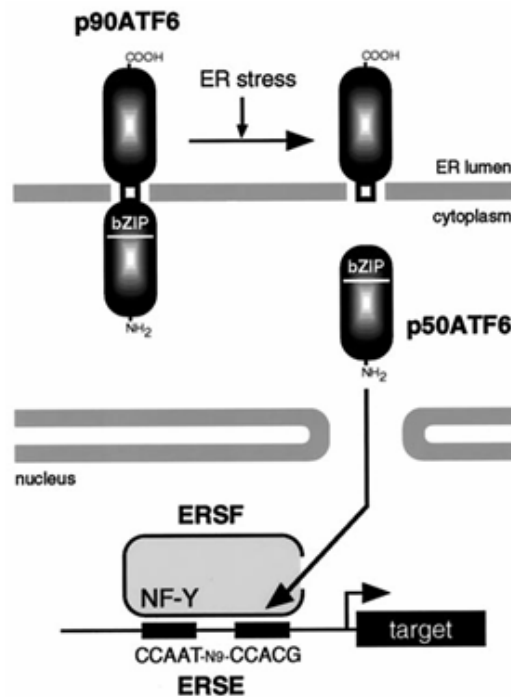
Fosforylace eIF2 $\alpha$  však vede také ke specifickému zvýšení translace některých mRNA, např. mRNA pro transkripční faktor ATF4, který vstupuje do jádra a iniciuje transkripci genů kódujících antioxidantní proteiny (Harding et al. 2000b) a také genu CHOP (C/EBP homologous protein). CHOP je sám transkripčním faktorem a indukcí exprese proapoptotických genů zprostředkovává spuštění apoptózy v případě, že homeostáza ER již nejde obnovit (Harding et al. 2000b).



Obr.3. Schéma regulace translace fosforylací eIF2 (převzato z Marciniak et Ron 2006).

### 2.1.3 ATF6

ATF6 je transmembránovým ER proteinem, syntetizovaným jako neaktivní prekurzor. Jeho C-koncová doména orientovaná do lumen ER obsahuje Golgi lokalizační signál, který je za normálních okolností maskován interakcí s chaperonem Bip. N-koncová cytosolická část ATF6 obsahuje DNA vazebnou doménu. Stejně jako u IRE1 $\alpha$  a PERK je aktivace ATF6 spojena regulována vazbou chaperonu Bip. Jakmile se v lumen ER začnou hromadit špatně sbalené proteiny, Bip se na ně váže a odmaskuje tak Golgi lokalizační signál v ATF6. ATF6 je následně rozpoznán jako Golgi rezidentní protein. Po transportu do Golgiho aparátu je sestřížen protézami S1P a S2P. Od proteinu je odštěpena nejprve lumenální doména a poté je celý protein uvolněn odštěpením od membrány v cytosolické části. Uvolněná cytosolická část putuje do jádra, kde funguje jako transkripční faktor (Shen et al. 2002). Váže se společně s obecným transkripčním faktorem NF-Y/CBP na sekvence označované jako ER stres responsivní elementy (ERSE) v promotorech cílových genů. Tímto způsobem aktivuje ATF6 expresi proteinů Bip, GRP94 a calreticulinu a také transkripčních faktorů XBP1 a CHOP (Yoshida et al. 2000) (viz Obr. 4).



Obr.4. Schéma aktivace ATF6 a jeho působení v jádře (převzato z Haze et al. 1999).

## 2.2 Další mechanismy, kterými se buňka brání stresu ER

V buňce jsou přítomny dva hlavní systémy, které udržují buněčnou homeostázu a degradují nefunkční či jinak poškozené proteiny a jiné makromolekuly popřípadě celé organely a to ubiquitin-proteasomový systém a autofagocytóza.

### 2.2.1 ER-asociovaná degradace

Proteiny, které z nejrůznějších důvodů nedosáhnou nativní konformace, jsou po nějaké době z ER odstraněny ER-asociovanou degradací (ERAD systém). Tyto proteiny jsou retrotranslokovány z ER do cytosolu, kde jsou označeny ubiquitinem a následně degradovány v 26S proteasomu. Doba, po které jsou proteiny odstraněny (tento systém je nejlépe popsán u N-glykosylovaných proteinů, které reprezentují velkou většinu proteinů

syntetizovaných v ER), je určena počtem calnexinových cyklů, během kterých se protein snaží dosáhnout nativní konformace (přehledně v Sorokin et al. 2009; Lederkremer 2009). U myši kmene Akita, modelu používaného pro studium procesů spojených se stresem ER (viz kap. 3.3), bylo prokázáno, že během probíhajícího stresu ER dochází k zvýšené expresi složek systému ERAD, které jsou nezbytné pro odstraňování špatně složeného insulinu (Allen et al. 2004).

### 2.2.2 Autofagocytóza

Autofagocytóza je degradační systém, určený k odbourávání celých buněčných částí. Mechanismus tvorby autofagosomu a mechanismus určení cíle, který má být degradován, nejsou vyjasněné. Záleží totiž velice na buněčném typu, ve kterém autofagocytóza probíhá a také na substrátu, který má být degradován. V každém případě však dochází k dopravení autofagosomového váčku do lysozomu, kde dojde k degradaci jeho obsahu a recyklaci základních stavebních molekul (přehledně v Levine et al. 2004).

Je prokázáno, že stres ER spouští autofagocytózu (Yorimitsu et al. 2006). Během UPR dochází k expanzi ER, díky které se snižuje koncentrace nesložených proteinů v ER a předchází se tak jejich možné agregaci. Za indukci autofagocytózy je zodpovědný IRE1 $\alpha$ , a to jak v kvasinkovém systému, tak i v savčích buňkách (Bernales et al. 2006). Ogata et al. indukovali stres ER v *IRE1*<sup>-/-</sup> knockoutovaných myších buňkách a zjistili, že ke spuštění autofagocytózy nedocházelo. Ve své práci uvádějí, že za indukci autofagocytózy stojí UPR dráha IRE1 $\alpha$  a aktivace JNK, která je schopná spustit apoptózu. V ranných stádiích stresu ER, jak se zdá, má však spíše protektivní účinky, a ke spuštění apoptózy dochází až při prodloužené aktivaci IRE1 $\alpha$  (Ogata et al. 2006).

## 3 Geneticky podmíněné syndromy vedoucí k apoptóze pankreatických $\beta$ -buněk vlivem stresu ER

### 3.1 Wolcott-Rallisonův syndrom

Spojitosť mezi stresem ER a diabetem byla poprvé odhalena u vzácné autozomálně recesivní formy juvenilního diabetu, nazvaného Wolcott-Rallisonův syndrom. U pacientů dochází k ztrátě  $\beta$ -buněk a následné inzulinové deficienci, onemocnění však není spojeno s autoimunitní reakcí namířenou proti  $\beta$ -buňkám tak jako je tomu u diabetu 1. typu. Jeho příčinou je mutace v serin/treoninové kinázové doméně proteinu PERK, která způsobuje, že je PERK neaktivní a není schopen fosforylovat eIF2 $\alpha$  (Rubio-Cabezas et al. 2009). Bez fosforylovaného eIF2 $\alpha$  nedochází při UPR k utlumení proteosyntézy a stres ER se nadále zvyšuje, což vede k zvýšené míře odumírání pankreatických  $\beta$ -buněk apoptózou (Harding et al. 2000b).

Existuje myší model tohoto onemocnění s deletovaným PERK (*Perk*<sup>-/-</sup>). Po narození vykazuje pankreas těchto myší naprosto normální funkci, po jisté době však začne docházet k degeneraci ostrůvků, ztrátě  $\beta$ -buněk způsobené nepřiměřeným stresem ER a následně k rozvoji diabetu 2. typu. Růstové defekty, které se objevují v kosterní tkáni i v tkáni pankreatu, jsou velice podobné těm, které lze spatřit u Wolcott-Rallisonova modelu u lidí (Zhang et al 2002).

### 3.2 Wolframův syndrom

Wolframův syndrom je další vzácné lidské autozomálně recesivní onemocnění způsobené neautoimunitní ztrátou  $\beta$ -buněk a neurologickými dysfunkcemi. Tato nemoc je způsobena mutací ve WFS1 genu kódujícím transmembránový glykoprotein ER, který hraje důležitou funkci v udržování homeostázy ER pankreatických  $\beta$ -buněk, nicméně přesný mechanismus,

jakým je protein WFS1 zapojen v regulaci ER stresu není objasněn. Je však známo, že je aktivován stresem ER a jeho exprese je regulována proteiny IRE1 $\alpha$  a PERK. Po aktivaci WFS1 dochází k utlumení stresu ER, jeho inaktivace způsobuje apoptózu  $\beta$ -buněk (Takeda et al. 2001; Fonseca et al. 2005). V  $\beta$ -buňkách pacientů s Wolframovým syndromem a u WFS1<sup>-/-</sup> myši dochází kvůli neaktivnímu WFS1 k neutlumitelnému stresu ER, který následně vede až k apoptóze  $\beta$ -buněk (Fonseca et al. 2010). Tento protein má také vliv na hospodaření s ionty Ca<sup>2+</sup>, což může v případě jeho inaktivace také přispívat k vzniku stresu ER (Osman et al. 2003).

Je zřejmé, že tento protein je velmi významnou součástí UPR v  $\beta$ -buňkách, bohužel není mnoho studií, které by se tímto proteinem v souvislosti se stresem ER zabývaly podrobněji.

### 3.3 Myší model Akita

Modelovým organismem pro studium apoptózy pankreatických  $\beta$ -buněk indukované ER stresem je myší model Akita. U této myši dochází po narození k rozvoji hyperglykémie, ztrátě  $\beta$ -buněk a ke vzniku diabetu 2. typu (Yoshioka et al. 1997). Za diabetickým fenotypem tohoto modelu stojí missense mutace (Cys96Tyr) v genu Ins2 kódujícím inzulin. Myši (včetně tohoto modelu) mají dvě nealelické verze genů pro inzulin, a to Ins1 a Ins2. Většina inzulinu produkovaného v buňce je produktem genu Ins2. Mutace Cys96Tyr v tomto genu vede ke konformačním změnám v molekule inzulinu a zabraňuje jí v dosažení nativní konformace.

Během rozvoje diabetu jsou v pankreatu této myši detekovatelné proteiny Bip a CHOP, které patří mezi markery stresu ER. Pokud je u těchto zvířat přítomna ještě heterozygotní forma mutace genu pro transkripční faktor CHOP, diabetes se objeví sice později, ale nástupu nemoci není kompletně zabráněno. V případě homozygotní formy poškození genu kódujícího CHOP, nedochází překvapivě ani k oddálení nástupu nemoci, z čehož vyplývá, že za indukci apoptózy vlivem stresu ER u tohoto



modelového organismu stojí ještě další signální dráhy, zřejmě se jedná o JNK a kaspázou 12 zprostředkovanou apoptózu (Oyadomari et al. 2002).

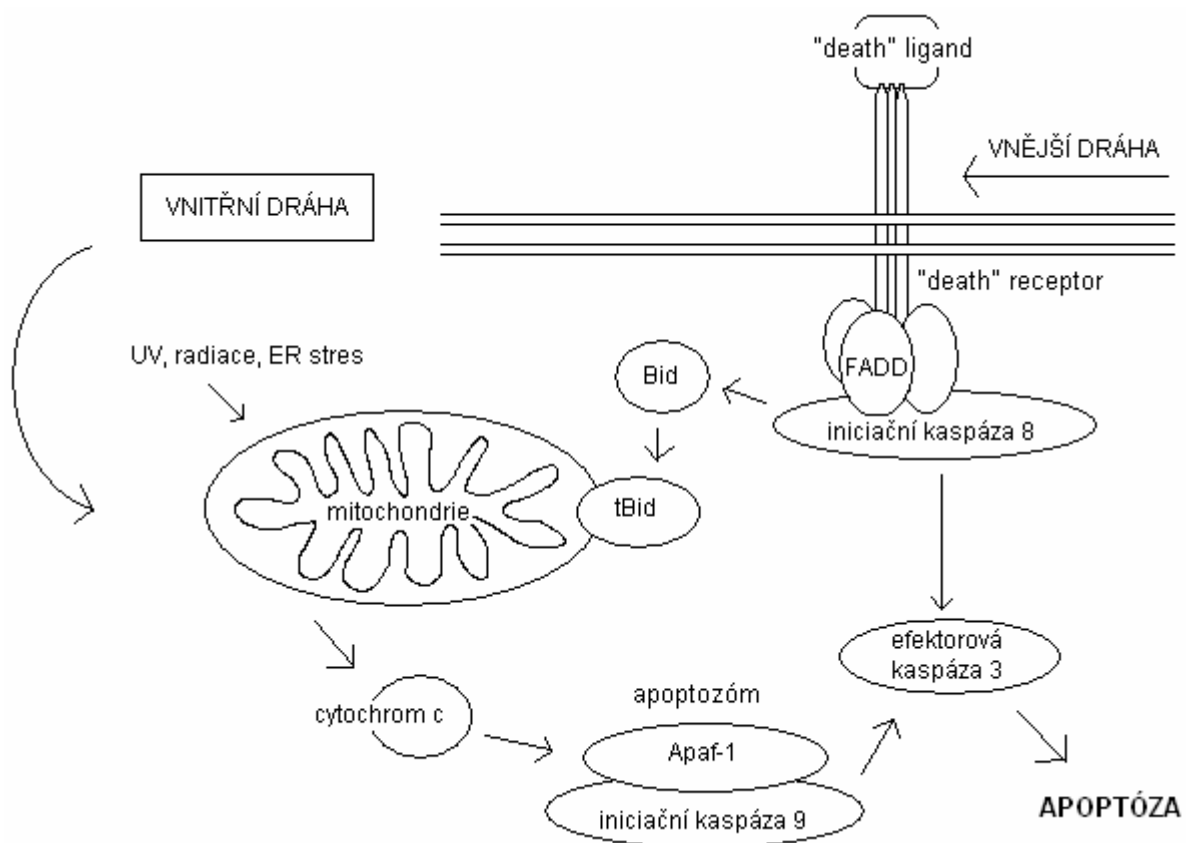
## 4 Apoptóza indukovaná stresem ER v pankreatických $\beta$ -buňkách

Apoptóza je druh programované buněčné smrti nepostradatelný v embryonálním vývoji, udržování zdravých tkání těla a v odstraňování poškozených či nežádoucích buněk z těla. V savčích buňkách existují dvě hlavní apoptotické dráhy, a to vnější (receptorová) a vnitřní (mitochondriální) (přehledně v Chalah et al. 2008) (viz Obr.5).

Vnější dráha je aktivována agregací tzv. „death“ receptorů rodiny TNFR (tumor necrosis factor receptor) na povrchu buňky. Nejlépe prostudovaný je receptor Fas, který zprostředkovane aktivuje iniciační prokaspázu 8. Aktivovaná kaspáza 8 poté iniciuje kaspázovou kaskádu aktivací exekučních kaspáz 3, 6 a 7, které štěpí proteinové struktury v buňce a iniciují tak apoptózu (Kurokawa et Kornbluth 2009).

Vnitřní dráha je spuštěna vnitrobuněčným signálem např. působením  $\gamma$  a UV záření, poškozením DNA, virovou infekcí či stresem ER. Tato dráha je provázena otevřením PTP (permeability transition pore), což je kanál vytvořený ve vnější mitochondriální membráně. Integrita mitochondriální membrány a otevření PTP jsou regulovány rovnováhou mezi proapoptotickými (Bax, Bad, Bak) a antiapoptotickými (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) proteiny rodiny Bcl-2. Tyto proteiny ve své podstatě buď stabilizují (antiapoptotické) či destabilizují (proapoptotické) membrány organel, které hrají roli v apoptóze (mitochondrie a ER). Mezi funkce proapoptotických proteinů rodiny Bcl-2 (Bax a Bik) patří i výlev  $Ca^{2+}$  z lumen ER a aktivace kaspázy 12 (přehledně v Chalah et al. 2008; Oakes et al. 2003).

Po otevření PTP dojde k vylití proapoptotických faktorů z intermembránového prostoru mitochondrie. Mezi tyto faktory patří mimo jiné i cytochrom c (Brenner et Mak 2009), který vazbou s iniciační prokaspázou 9 do apoptosomu umožní její aktivaci. Aktivní kaspáza 9 iniciuje stejně jako kaspáza 8 kaspázovou kaskádu a tím iniciuje apoptózu (Kurokawa et Kornbluth 2009).



Obr.5. Schematické znázornění vnitřní a vnější apoptotické dráhy.

## 4.1 Indukce apoptózy pankreatických $\beta$ -buněk v důsledku stresu ER u T2DM

### 4.1.1 Role glukózy

Glukóza je pro  $\beta$ -buňky nejen důležitým zdrojem energie, ale stimuluje též sekreci inzulinu a buněčnou proliferaci. Pokud však dojde k chronické hyperglykémii, tzn. že se po dlouhou dobu vyskytuje v krvi vysoká hladina cukrů, má glukóza na  $\beta$ -buňky devastující účinky nazývané jako glukotoxicita. Při glukotoxicitě dochází k desenzitizaci  $\beta$ -buněk k působení glukózy, jejich vyčerpání a následnému snížení sekrece inzulinu. U pacientů s diabetem 2. typu přispívá chronická hyperglykémie nejen k mortalitě, ale

také k projevu průvodních onemocnění s diabetem spojených (zvýšené riziko infarktu myokardu, selhání ledvin, slepota a mnohé další) (Kitabchi et al. 2009).

Na množství glukózy je závislá i syntéza inzulinu. Ta je kontrolována prostřednictvím IRE1 $\alpha$ . Během přechodného vystavení pankreatických  $\beta$ -buněk vysoké hladině glukózy v krvi posiluje IRE1 $\alpha$  inzulinovou syntézu. Avšak při chronicky vysokých hladinách glukózy může dojít k hyperaktivaci IRE1 $\alpha$  a zastavení inzulinové syntézy. Efekt hyperaktivace IRE1 $\alpha$  je reversibilní, pokud však nedojde do určité doby ke snížení koncentrace glukózy, může hyperaktivované IRE1 $\alpha$  indukovat apoptózu  $\beta$ -buněk (Lipson et al. 2006).

Z výsledků experimentu, který Lipson et al. prováděli na linii potkaních  $\beta$ -buněk a myších pankreatických ostrůvcích, vyvodili hypotézu dvojí aktivace IRE1 $\alpha$ . Působili na  $\beta$ -buňky linie INS-1 přechodně vysokými dávkami glukózy. Nedetekovali však v buňkách aktivní transkripční faktor XBP-1 a ani aktivaci JNK dráhy. Tuto aktivaci IRE1 $\alpha$  nazvali adaptační a souvisela právě s výše zmíněným zastavením inzulinové syntézy. V druhém případě, kdy působili na  $\beta$ -buňky vysokými dávkami glukózy po dlouhou dobu, docházelo k aktivaci IRE1 $\alpha$  způsobem známým pro silný stres ER. Došlo k sestříhu XBP-1 mRNA a aktivaci XBP-1 a také k indukci apoptózy zprostředkované aktivací JNK dráhy (Lipson et al. 2006). Z těchto výsledků jednoznačně vyplývá, že glukotoxicita vedoucí k apoptóze  $\beta$ -buněk je způsobená vyvoláním dlouhodobého stresu ER.

#### 4.1.2 Role mastných kyselin

Zvýšené množství mastných kyselin v krvi je jedním z průvodních jevů obezity. Jejich dlouhodobě vysoká hladina poškozuje pankreatické  $\beta$ -buňky a stejně jako chronicky zvýšená hladina glukózy v krvi, hrají i mastné kyseliny důležitou roli ve vzniku inzulinové rezistence a v patogenezi diabetu 2. typu (Boden 2008). Ukazuje se, že klíčovým mechanismem, kterým mastné kyseliny poškozují  $\beta$ -buňky a přispívají tak k rozvoji diabetu, je

apoptóza indukovaná stresem ER (Lai et al. 2008). Mezi různými druhy mastných kyselin však existuje značný rozdíl v potenciálu vyvolávat stres ER a v indukovat apoptózu (Cunha et al. 2008).

Největší vliv na efekt mastných kyselin má přítomnost dvojných vazeb v molekule mastné kyseliny. Mastné kyseliny, které nemají ve své molekule dvojnou vazbu se označují jako nasycené (např. kyselina palmitová a kyselina stearová), mastné kyseliny obsahující ve své molekule aspoň jednu dvojnou vazbu se označují jako nenasycené (např. kyselina palmitolejová a kyselina olejová).

Byly provedeny různé experimenty, během kterých se porovnával vliv různých mastných kyselin na  $\beta$ -buňky, bohužel často se výsledky jednotlivých výzkumných skupin liší i v případě používání stejného experimentálního modelu. Například Kharroubi et al. inkubovali INS-1E linii potkaních  $\beta$ -buněk s mastnými kyselinami palmitovou (nasycená mastná kyselina s 16-ti uhlíky) a olejovou (mononenasycená mastná kyselina s 18-ti uhlíky). Obě mastné kyseliny indukovaly apoptózu  $\beta$ -buněk a zvyšovaly expresi CHOP, ATF4, XBP-1, ATF6 a Bip. Indukce apoptózy byla tedy spuštěna stresem ER. Mezi efektem obou mastných kyselin byl však rozdíl v tom, že kyselina palmitová indukovala apoptózu  $\beta$ -buněk v signifikantně vyšší míře než kyselina olejová (Kharroubi et al. 2004).

Je třeba zmínit ještě jeden experiment s mastnými kyselinami, který se zabýval indukcí apoptózy prostřednictvím stresu ER. Karaskov et al. také zkoumali vliv kyseliny palmitové a olejové na  $\beta$ -buňky linie INS-1. Při působení kyseliny olejové nedocházelo k signifikantní aktivaci UPR stejně jako v experimentech výzkumné skupiny Cunha et al., ale podobně jako Kharroubi et al. autoři detekovali apoptózu  $\beta$ -buněk. Působení kyseliny palmitové na INS-1  $\beta$ -buňky významně zvyšovalo množství mRNA pro transkripční faktory ATF4, XBP-1 a CHOP, což dokládá účast stresu ER v indukcí apoptózy. Během experimentu bylo navíc zjištěno, že se kyselina palmitová v ER kumuluje ve formě nerozpustných triglyceridů a mění morfologii ER. Je velmi pravděpodobné, že tato akumulace měla za následek

disturbanci vnitřního prostředí ER a s tím spojený stres ER způsobený hromaděním špatně sbalených proteinů (Karaskov et al. 2006).

Z výsledků těchto experimentů je zřejmé, že nasycená mastná kyselina palmitová způsobuje apoptózu  $\beta$ -buněk, zatímco mononenasycená kyselina olejová má slabý nebo žádný vliv na indukci apoptózy.

Nenasycené mastné kyseliny mohou mít na  $\beta$ -buňky i protektivní účinky. Diakogiannaki et al. zkoumali vliv kyseliny palmitové a palmitoolejové (mononenasycená mastná kyselina s 16-ti uhlíky) na indukci apoptózy stresem ER na  $\beta$ -buněčné linii BRIN-BD11. Tyto buňky byly vystavené působení jak obou dvou mastných kyselin zároveň, tak i každé zvlášť. Během inkubace s kyselinou palmitovou došlo ke zvýšení množství mRNA pro ATF4 a CHOP. Potvrdili, že kyselina palmitová indukuje stres ER a apoptózu  $\beta$ -buněk. Oproti tomu kyselina palmitoolejová neindukovala stres ER ani při velmi vysokých koncentracích. V případě, že byly  $\beta$ -buňky inkubovány s oběma druhy mastných kyselin zároveň, docházelo dokonce k významnému snížení stresu ER v porovnání s působením kyseliny palmitové. Zjištěné množství ATF4 a CHOP bylo dokonce nižší než v kontrolních buňkách. Kyselina palmitoolejová měla tedy protektivní účinky vůči stresu ER vyvolaném působením kyseliny palmitové. Mechanismus, kterým docházelo k inhibici stresu ER, však neobjasnili (Diakogiannaki et al. 2008).

Vliv mastných kyselin na indukci stresu ER v  $\beta$ -buňkách je ve stádiu intenzivního výzkumu. Výsledky studií jsou často nesourodé a je zapotřebí ještě hodně práce k objasnění mechanismu jejich působení.

## 4.2 Mediátory apoptózy $\beta$ -buněk vyvolané stresem ER

### 4.2.1 Indukce apoptózy prostřednictvím transkripčního faktoru CHOP

CHOP je transkripční faktor aktivovaný v drahách UPR během stresu ER pankreatických  $\beta$ -buněk (viz kapitola UPR). Je potvrzeno mnohými

pracemi, že CHOP zprostředkovává indukci apoptózy pankreatických  $\beta$ -buněk (Ariyama et al. 2008; Oyadomari et al. 2002). Přesný mechanismus indukce apoptózy prostřednictvím tohoto transkripčního faktoru však není doposud plně objasněn.

Blokace tohoto transkripčního faktoru během stresu ER v  $\beta$ -buňkách způsobila oddálení indukce apoptózy, apoptóze však nezabránila (Cunha et al. 2008). Je pravděpodobné, že společně s CHOPem hrají v indukci apoptózy roli ještě další faktory, například aktivace JNK či kaspázy 12 (viz níže).

#### 4.2.2 Indukce apoptózy $\beta$ -buněk prostřednictvím JNK kinázy

JNK kináza je součástí velké rodiny MAP kináz (mitogen activated protein kinase), které jsou zapojeny v mnoha signálních drahách v buňce. V savčích buňkách se účastní regulace buněčné proliferace, diferenciace, zánětlivé odpovědi a apoptózy (přehledně v Davis 2000). JNK kináza je aktivována aktivovaným IRE1 $\alpha$  prostřednictvím adaptorového proteinu TRAF2 (Urano et al. 2000).

Z výsledků studií na pankreatických  $\beta$ -buňkách vyplývá, že JNK je aktivována stresem ER, indukovaným jak vysokou hladinou glukózy, tak i mastných kyselin, a může indukovat apoptózu (Lipson et al. 2006; Cunha et al. 2008).

Podrobněji se mechanismem indukce apoptózy prostřednictvím JNK v  $\beta$ -buňkách zabývali Martinez et al. Indukovali stres ER a apoptózu v myší  $\beta$ -buněčné linii MIN6 působením kyselin palmitové a olejové. Zjistili, že došlo k aktivaci JNK, kaspázy 3, transkripčního faktoru CHOP a také transkripčního proteinu Foxo1 (Forkhead box O1). Během zkoumání tohoto transkripčního faktoru došli k závěru, že je aktivován výhradně stresem ER a že jeho aktivátorem je JNK. Přítomnost negativně dominantní alely Foxo1 vedla u  $\beta$ -buněk MIN6 indukovaných mastnými kyselinami k výraznému snížení exprese transkripčního faktoru CHOP a množství aktivní kaspázy

3, čímž autoři prokázali roli Foxo1 v indukci apoptózy prostřednictvím stresu ER (Martinez et al. 2008).

V jiných experimentech, neprováděných však na pankreatických  $\beta$ -buňkách, byla aktivovaná JNK schopna fosforylací inhibovat antiapoptotické proteiny Bcl-2 a Bcl-X<sub>L</sub> (Yamamoto et al. 1999) a usnadnit tak permeabilizaci mitochondriální membrány zprostředkovanou proapoptotickými členy rodiny proteinů Bcl-2 a vylití cytochromu c z mitochondrií (Tournier et al. 2000). Je možné, že i u  $\beta$ -buněk dochází k indukci apoptózy podobným způsobem.

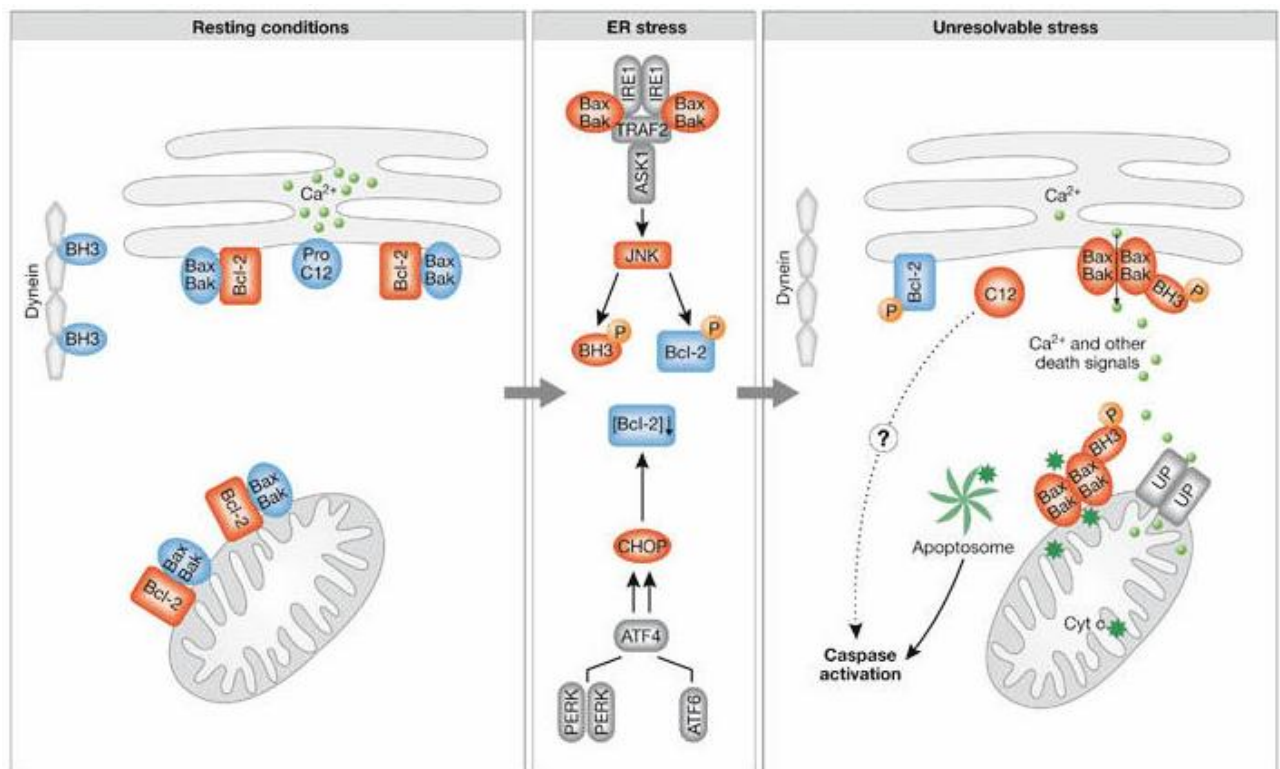
#### 4.3.3 Role Ca<sup>2+</sup>

Velice důležitá je role ER jako zásobárny buněčného Ca<sup>2+</sup>, které je signální molekulou, a proto je jeho koncentrace v cytosolu je udržována na nízké úrovni. Jeho vnitrobuněčná koncentrace má vliv na téměř všechny buněčné pochody. Koncentrace Ca<sup>2+</sup> v lumen ER i v cytosolu je udržována ATP-dependentními Ca<sup>2+</sup> pumpami, kterými je Ca<sup>2+</sup> čerpán z cytosolu do lumen ER. Rychlý únik Ca<sup>2+</sup> z ER do cytosolu je zprostředkován IP<sub>3</sub>R (inositol trifosfátové receptory) a RyR (ryanodinové receptory), kterými (Puzianowska-Kuznicka et Kuznicki, 2009). Vylití Ca<sup>2+</sup> z ER během probíhajícího stresu může být pro buňku fatální. Náhlý nárůst koncentrace Ca<sup>2+</sup> v cytosolu může aktivovat kalcium senzitivní proteiny (např. calpain, calcineurin či calreticulin), které mohou způsobit indukci apoptózy. Například aktivovaný calpain sestřihuje a aktivuje proapoptotické proteiny rodiny Bcl-2, Bax a Bid, které způsobují vylití cytochromu c z mitochondrie a mohou tak mít přímý vliv na indukci apoptózy. Aktivovaný calpain také aktivuje iniciační kaspázu 12, lokalizovanou v membráně ER, která může spustit apoptózu aktivací exekučních kaspáz (Mandic et al. 2002; Momoi 2004). Aktivovaný calcineurin fosforyluje proapoptotický protein rodiny Bcl-2 Bad. Aktivovaný Bad na sebe váže proteiny Bcl-2 a Bcl-X<sub>L</sub>, které patří mezi antiapoptotické členy rodiny Bcl-2. Tím uvolní z vazby na Bcl-2 proapoptotické členy rodiny Bcl-2, proteiny Bax a Bak, které zprostředkovávají uvolnění cytochromu c



z mitochondrií a následnou aktivaci iniciační kaspázy-9 (Wang et al. 1999) (viz obr.6).

Existuje mnoho článků zabývajících se souvislostí stresu ER a výlevu  $\text{Ca}^{2+}$  s apoptotickými procesy v buňce (přehledně v Szegezdi et al. 2009). Je zřejmé, že homeostáza  $\text{Ca}^{2+}$  je s apoptózou úzce propojena. Avšak informace o roli  $\text{Ca}^{2+}$  konkrétně v apoptóze pankreatických  $\beta$ -buněk jsou velice omezené. V několika experimentech s mastnými kyselinami indukujícími apoptózu  $\beta$ -buněk byla zjištěna přítomnost stresu ER a zároveň i vylití zásob  $\text{Ca}^{2+}$  z lumen ER. Například Cunha et al. působili na INS-1E  $\beta$ -buňky a na lidské pankreatické ostrůvky kyselinou palmitovou a olejovou. Ve všech případech docházelo k výlevu  $\text{Ca}^{2+}$  a k apoptóze  $\beta$ -buněk. Stres ER byl detekován přítomností transkripčního faktoru CHOP a JNK s tím, že k aktivaci JNK docházelo pouze během působení kyselinou palmitovou. Během experimentu byly v případě  $\beta$ -buněčné linie INS-1E detekované navíc ještě aktivní iniciační kaspáza 12 a exekuční kaspázy 3 a 7 (Cunha et al.2008).



Obr.6. Role proteinů rodiny Bcl-2 za nestresových podmínek a během stresu ER (převzato z Szegezdi et al. 2006).

Choi et al. použili pro experiment myší  $\beta$ -buněčnou linii MIN6. Indukce stresu ER a apoptózy působení kyseliny palmitové vedlo k aktivaci transkripčního faktoru CHOP, výlevu cytochromu c z mitochondrií, aktivaci kaspázy 3 a k defosforylaci proapoptického proteinu rodiny Bcl-2 Bad. Protein Bad je substrátem pro calcineurin (Wang et al. 1999), který musel být s největší pravděpodobností aktivován výlevem  $\text{Ca}^{2+}$  z ER. Při použití blokátoru calcineurinu k apoptóze téměř nedocházelo (Choi et al. 2007). Autoři tak prokázali roli stresu ER a kalcium dependentních proteinů v indukci apoptózy  $\beta$ -buněk vyvolané působením mastných kyselin.

#### 4.2.4 Role kaspázy 12

Kaspáza 12 je hlavní kaspázou, účastníci se stresu ER (Momoi 2004). Může být aktivována dvěma různými způsoby, oba mají původ ve stresu ER. Prvním z nich je aktivace prostřednictvím IRE1 $\alpha$  (Yoneda et al. 2001) kdy se na aktivované IRE1 $\alpha$  naváže adapterový protein TRAF2 (Urano et al. 2000). Na TRAF2 se potom naváže inaktivní prokaspáza 12 a zaktivuje se sestřihem (Yoneda et al. 2001). K aktivaci druhým ze způsobů dochází během výlevu  $\text{Ca}^{2+}$  z lumen ER při stresu. Jak bylo již zmíněno v kapitole o  $\text{Ca}^{2+}$ , kaspáza 12 je aktivována calpainem (Mandic et al. 2002). Morishima et al. publikovali, že substrátem aktivované kaspázy 12 je prokaspáza 9, k indukci apoptózy touto cestou není tedy zapotřebí permeabilizace mitochondriální membrány a vylití cytochromu c (Morishima et al. 2002).

Kaspáza 12 je zachovaná u všech obratlovců. U většiny lidské populace (například u Evropanů a původních obyvatel Severní Ameriky) došlo v genu pro kaspázu 12 k několika mutacím, díky kterým je translatována v nefunkční, zkrácené verzi. V části lidské populace však dochází k translaci plné verze, jedná se hlavně o obyvatele subsaharské afriky a středního východu (Kachapati et al. 2006). Je pravděpodobné, že kaspáza 12 hraje roli v exekuci apoptózy i v lidské populaci, bohužel výzkum na lidech nebyl proveden. Výzkumů na zvířecích  $\beta$ -buňkách je také

poskrovnu, ale např. Cunha et al. 2008 detekovali přítomnost aktivní kaspázy 12 během stresu ER u myší  $\beta$ -buněčné linie, je tedy zřejmé, že tato kaspáza má nezanedbatelnou roli v indukci apoptózy. Kaspáza 12 je velmi důležitou složkou apoptotických drah spoštěných stresem ER, je proto překvapivé, že studiu mechanismu jejího působení během vzniku diabetu 2. typu není věnováno více pozornosti alespoň na zvířecích modelech.

## 5 Závěr

O pankreatických  $\beta$ -buňkách je již řadu let známo, že jsou náchylné k stresu ER. Přesto byla až do nedávné doby apoptóza  $\beta$ -buněk při diabetu 2. typu spojována hlavně s účinky glukózy a mastných kyselin na metabolismus. Narůstá však množství důkazů, že významnou roli v indukci apoptózy pankreatických  $\beta$ -buněk hraje stresová signalizace ER vyvolaná působením zvýšených hladin mastných kyselin a glukózy v krvi.

Zprostředkovateli signálu mezi stresem ER a apoptózou jsou CHOP a JNK, avšak přesný způsob, jakým indukují apoptózu, není dosud spolehlivě objasněn. Nedávná studie odhalila souvislost JNK s transkripčním faktorem Foxo1, což by mohlo vnést po podrobnějším prozkoumání více světla do této problematiky.

Dalším prostředníkem mezi stresem ER a apoptózou  $\beta$ -buněk je výlev  $\text{Ca}^{2+}$  ze zásob ER do cytoplasmy, mechanismus však zatím také přesně objasněn není. Výlev vápníku má zřejmě za následek aktivaci kalcium dependentních proteáz calpainu a calcineurinu. Calpain je schopen aktivovat iniciační kaspázu 12, ta následně aktivuje iniciační kaspázu 9 a exekuční kaspázy 3, 6 a 7. Výlev  $\text{Ca}^{2+}$  tak může tímto způsobem indukovat apoptózu. Při působení mastných kyselin dochází i k aktivaci proapoptických členů rodiny Bcl-2, je velmi pravděpodobné, že jejich aktivace je zprostředkována aktivovaným calcineurinem.

Výzkum stresu ER v pankreatických  $\beta$ -buňkách ve vztahu ke vzniku diabetu 2. typu se teprve dostává do popředí zájmu vědeckých laboratoří. I přes relativně malé množství informací lze však ER  $\beta$ -buněk považovat za organelu, primárně rozhodující o jejich osudu. Je zapotřebí ještě hodně práce pro objasnění veškerých mechanismů působení stresu ER. Výsledky výzkumu by však mohly nabídnout nové přístupy k prevenci a léčbě diabetu mellitu 2. typu.

## 6 Seznam zkratek:

ATF4	activating transcription factor 4
ATF6	activating transcription factor 6
Bip	immunoglobulin heavy-chain binding protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Caspase	cysteine-dependent aspartate-specific protease
eIF2 $\alpha$	eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$
ER	endoplasmic reticulum
ERAD	endoplasmic reticulum associated degradation
ERSE	endoplasmic reticulum stress response element
ERSE	endoplasmic reticulum stress response factor
Foxo1	Forkhead box O1
CHOP	C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) homologous protein= GADD153 (growth arrest-and DNA damage-inducible gene)
IP <sub>3</sub> R	inositol 1,4,5-triphosphate receptor
IRE1 $\alpha$	inositol-requiring ER-to-nucleus signal kinase 1 $\alpha$
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
MAPK	mitogen activated protein kinase
mRNA	mediátorová RNA
PERK	(RNA-dependent protein kinase)-like ER kinase
PTP	permeability transition pore
ROS	reactive oxygen species
RyR	ryanodine receptor
T2DM	diabetes mellitus 2. typu
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRAF2	TNF-receptor associated factor
UPR	unfolded protein response
UPRE	unfolded protein response element
XBP-1	X-box binding protein 1

## 7 Seznam použité literatury:

Allen JR, Nguyen LX, Sargent KE, Lipson KL, Hackett A, Urano F: High ER stress in beta-cells stimulates intracellular degradation of misfolded insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 324(1):166-70, 2004

Ariyama Y, Tanaka Y, Shimizu H, Shimomura K, Okada S, Saito T, Yamada E, Oyadomari S, Mori M, Mori M: The role of CHOP messenger RNA expression in the link between oxidative stress and apoptosis. *Metabolism* 57(12):1625-35, 2008

Bernales S, McDonald KL, Walter P: Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* 4(12):e423, 2006

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D: Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2(6):326-32, 2000

Boden G: Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37(3):635-46, 2008

Brenner D, Mak TW: Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21(6):871-7, 2009

Chalah A, Khosravi-Far R: The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol* 615:25-45, 2008

Choi S, Kim H, Shin H, Jang H, Lee K, Kim Y, Kang S, Chun J, Kang Y: Involvement of Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptotic signals in palmitate-induced MIN6N8a beta cell death. *Mol Cell Endocrinol* 272:50-62, 2007

Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, Moore F, Rasschaert J, Cardozo AK, Bellomo E, Overbergh L, Mathieu C, Lupi R, Hai T, Herchuelz A, Marchetti P, Rutter GA, Eizirik DL, Cnop MJ: Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 121(Pt 14):2308-18, 2008

Diakogiannaki E, Welters HJ, Morgan NG: Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids. *J Endocrinol* 197(3):553-63, 2008

Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, Urano F: WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 280(47):39609-15, 2005

Fonseca SG, Ishigaki S, Oslowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, Hayashi E, Ishihara H, Oka Y, Permutt MA, Urano F: Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* 120(3):744-55, 2010

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D: Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6(5):1099-108, 2000b

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D: Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5(5):897-904, 2000a

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K: Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10(11):3787-99, 1999

Kachapati K, O'Brien TR, Bergeron J, Zhang M, Dean M: Population distribution of the functional caspase-12 allele. *Hum Mutat* 27(9):975, 2006

Karaskov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, Volchuk A: Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 147(7):3398-407, 2006

Kharroubi I, Ladrière L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL: Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145(11):5087-96, 2004

Kitabchi AE, Umpierrez GE, Miles JM, Fisher JN: Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabetes Care* 32(7):1335-43, 2009

Kohno K: Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. *J Biochem* 147(1):27-33, 2009

Kozak M: Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234(2):187-208, 1999

Kurokawa M, Kornbluth S: Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 138(5):838-54, 2009

Lai E, Bikopoulos G, Wheeler MB, Rozakis-Adcock M, Volchuk A: Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(3):E540-50, 2008

Lebovitz HE: Type 2 diabetes: an overview. *Clin Chem* 45(8 Pt 2):1339-45, 1999

Lederkremer GZ: Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr Opin Struct Biol* 19(5):515-23, 2009

Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH: XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23(21):7448-59, 2003

Levine B, Klionsky DJ: Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6(4):463-77, 2004

Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, Nguyen LX, Foss E, Bortell R, Rossini AA, Urano F: Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 4(3):245-54, 2006

Mandic A, Viktorsson K, Strandberg L, Heiden T, Hansson J, Linder S, Shoshan MC: Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 22(9):3003-13, 2002

Marciniak SJ, Ron D: Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 86(4):1133-49, 2006

Martinez SC, Tanabe K, Cras-Méneur C, Abumrad NA, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA: Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Diabetes* 57(4):846-59, 2008

Momoi T: Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat* 28(1-2):101-5, 2004



Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y: An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277(37):34287-94, 2002

Niwa M, Patil CK, DeRisi J, Walter P: Genome-scale approaches for discovering novel nonconventional splicing substrates of the Ire1 nuclease. *Genome Biol* 6(1):R3, 2005

Oakes SA, Opferman JT, Pozzan T, Korsmeyer SJ, Scorrano L: Regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Pharmacol* 66(8):1335-40, 2003

Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K: Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 26(24):9220-31, 2006

Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K: Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 366(Pt 2):585-94, 2002

Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, Mueckler M: Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem* 278(52):52755-62, 2003

Oyadomari S, Araki E, Mori M: Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 7(4):335-45, 2002

Prentki M, Nolan CJ: Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116(7):1802-12, 2006

Puzianowska-Kuznicka M, Kuznicki J: The ER and ageing II: calcium homeostasis *Ageing Res Rev* 8(3):160-72, 2009

Rubio-Cabezas O, Patch AM, Minton AL, Flanagan SE, Edghill EL, Hussain K, Balafrej A, Deeb A, Buchanan CR, Jefferson IG, Mutair A, Hattersley AT, Ellard S: Wolcott-Rallison Syndrome Is the Most Common Genetic Cause of Permanent Neonatal Diabetes in Consanguineous Families. *J Clin Endocrinol Metab* 94(11): 4162-4170, 2009

Scheuner D, Kaufman RJ: The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev* 29(3):317-33, 2008

Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R: ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 3(1):99-111, 2002

Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP: Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc)* 74(13):1411-42, 2009

Szegezdi E, Macdonald DC, Ní Chonghaile T, Gupta S, Samali A: Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(5):C941-53, 2009

Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watanabe Y, Shinoda K, Oka Y: WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet* 10(5):477-84, 2001

Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ: A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 12(12):1812-24, 1998

Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ: Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288(5467):870-4, 2000

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D: Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287(5453):664-6, 2000

Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC: Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284(5412):339-43, 1999

Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D: Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *Embo J* 17(19):5708-17, 1998

Welihinda AA, Kaufman RJ: The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and trans-phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *J Biol Chem* 271(30):18181-7, 1996

Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ: BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 19(12):8469-78, 1999

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M: Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276(17):13935-40, 2001

Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ: Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* 281(40):30299-304, 2006

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K: XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107(7):881-91, 2001

Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K: ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 20(18):6755-67, 2000

Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A: A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* 46(5):887-94, 1997

Zhang P, McGrath B, Li S, Frank A, Zambito F, Reinert J, Gannon M, Ma K, McNaughton K, Cavener DR: The PERK eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase is required for the development of the skeletal system, sostnatal growth, and the function and viability of the pankreas. *Mol Cell Biol* 22(11): 3864-3874, 2002