

Wirkung der bei Überernährung und Adipositas sezernierten proinflammatorischen Cytokine auf die Aktivität der Dual-Leucine-Zipper Bearing Kinase in der pankreatischen β -Zelle

Fragestellung: Überernährung und Adipositas mit postprandial gesteigerten Blutglucosespiegeln und erhöhten Spiegeln an proinflammatorischen Cytokinen gehören zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen. Um die Glucosehomöostase aufrecht zu erhalten, ist eine adäquate Masse an Insulin produzierenden pankreatischen β -Zellen notwendig. Durch Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) können proinflammatorische Cytokine wie $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ eine β -Zellapoptose induzieren und damit zu einem Verlust der β -Zellmasse und einem relativen Insulinmangel beitragen. In einer Nierenzelllinie führte die Überexpression von JNK zu der Phosphorylierung des Adaptorproteins JIP/IB-1, wodurch die Mitogen-aktivierte Tripelkinase DLK (Dual-Leucine-Zipper Bearing Kinase) von dem Adaptorprotein dissoziierte, katalytisch aktiv wurde und ihrerseits die Mitogen-aktivierte Kinase JNK aktivierte und so zu einer Signalamplifikation führte. In β -Zellen hemmte DLK den für die Aufrechterhaltung der β -Zellfunktion und -masse wichtigen Transkriptionsfaktor CREB. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob die proinflammatorischen Cytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ durch Aktivierung der DLK zu einer Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CREB und damit zu einer β -Zellapoptose führen.

Methodik: MTT-Test, Immunoblotanalysen, Immunocytochemische Fluoreszenzmikroskopie mit Doppelfärbungen, Immunpräzipitation mit *in vitro* Kinase Assays, transiente Transfektionen und Reporterassays.

Ergebnisse: $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ reduzierten konzentrations- und zeitabhängig das Überleben der Insulin produzierenden pankreatischen β -Zelllinie HIT und induzierten einen apoptotischen β -Zelltod, gemessen als eine Zunahme von fragmentierter Caspase-3 positiven Zellen. Die Überexpression der DLK, nicht aber ihrer Kinase toten Mutante, induzierte ebenfalls eine Zunahme an fragmentierter Caspase-3 positiven β -Zellen. Überexpression von DLK und die Inkubation mit den Cytokinen erhöhte die Apoptoserate überadditiv, jedoch konnte die Überexpression der Kinase toten DLK Mutante nur die $\text{TNF}\alpha$ induzierte Apoptose vermindern. Beide Cytokine erhöhten die Phosphorylierung und damit die Aktivität von JNK. Nur die $\text{TNF}\alpha$ induzierte JNK Phosphorylierung wurde durch eine

Reduktion von zellulärer DLK mittels small interference RNA (RNAi) vermindert. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen aktivierte nur $TNF\alpha$, nicht $IL-1\beta$, die Aktivität der zellulären immunpräzipitierten DLK. Ein JNK-Inhibitor hemmte die $TNF\alpha$ induzierte DLK Aktivität. Beide Cytokine hemmten die Aktivität vermittelt durch den β -zellprotektiven Transkriptionsfaktors CREB und seiner DNA-Bindungssequenz, in unterschiedlicher Qualität: $IL-1\beta$ verminderte leicht sowohl die durch Membrandepolarisation wie auch durch cAMP-stimulierte CRE/CREB abhängige Transkription. Im Gegensatz dazu verminderte $TNF\alpha$ in ähnlicher Weise wie DLK nur die durch Membrandepolarisation stimulierte CRE/CREB abhängige Gentranskription. Die Reduktion des zellulären DLK Gehaltes durch RNAi verminderte die $TNF\alpha$ induzierte Hemmung der CRE abhängigen Gentranskription.

Schlussfolgerung: Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivierung der DLK nicht zu der β -zellapoptotischen Wirkung von $IL-1\beta$ beiträgt. Die Aktivierung von DLK durch $TNF\alpha$ könnte jedoch zu der Amplifikation von β -zelltoxischen JNK aktivierenden Signalen beitragen und so die Aktivität der β -zellprotektiven Transkriptionsfaktors CREB hemmen und zu einer β -Zellapoptose beitragen. Diese Wirkung könnte ein neuartiger Mechanismus sein wie $TNF\alpha$ zu dem Verlust der β -Zellmasse und damit zu der Pathogenese von Diabetes mellitus beiträgt.

Effect of the during supernutrition and obesity secreted pro-inflammatory cytokines on the activity of the dual-leucine-zipper bearing kinase in pancreatic β -cells

Aims/hypothesis: Supernutrition leading to obesity with increased postprandial blood glucose levels and elevated levels of pro-inflammatory cytokines is a major risk factor for the pathogenesis of many diseases. An appropriate mass of insulin producing pancreatic β -cells is crucial for the maintenance of glucose homeostasis. Through activation of the c-Jun-N-terminal kinase (JNK), pro-inflammatory cytokines like $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ have been shown to induce β -cell apoptosis, resulting in loss of β -cells and a relative lack of insulin. The transcription factor CREB, pivotal for maintaining β -cell function and mass, is inhibited by the dual-leucine-zipper bearing kinase (DLK). DLK amplifies JNK activating β -cell toxic signals. The aim of the present study was to investigate whether $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ by activating DLK inhibit CREB transcriptional activity thus leading to β -cell apoptosis. Material and methods: Biochemical assays including immunocytochemistry, immunoblots and kinase assays were employed. Results: $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ decreased the survival of the insulin producing pancreatic β -cell line HIT in a concentration- and time-dependent manner. As revealed by immunocytochemistry, both cytokines enhanced the number of apoptotic β -cells depending on time and concentration, indicating an apoptotic cell death. Over expression of DLK but not its kinase dead mutant induced apoptosis and enhanced cytokine-induced apoptosis. In the presence of the DLK mutant, only $\text{TNF}\alpha$ -caused apoptosis was not further enhanced. Although both cytokines increased the phosphorylation and thus the activation of JNK, only $\text{TNF}\alpha$ -induced JNK phosphorylation was decreased by a reduction of cellular DLK by small interference RNA. Consistent with this, only $\text{TNF}\alpha$ elevated the enzymatic activity of cellular immunoprecipitated DLK. An inhibitor of JNK prevented $\text{TNF}\alpha$ -induced DLK activity. $\text{TNF}\alpha$ inhibited like DLK the membrane depolarisation stimulated transcriptional activity conferred by CREB and its DNA binding-site, the CRE. Reduction of cellular DLK prevented the inhibitory effect of $\text{TNF}\alpha$ on CRE-directed transcription. $\text{IL-1}\beta$ decreased CRE/CREB-directed transcription independent of the stimulus used. Conclusion/interpretation: These results suggest that $\text{IL-1}\beta$ -induced β -cell apoptosis does not depend on the activation of DLK. In contrast, the $\text{TNF}\alpha$ -induced DLK activation might account to the amplification of β -cell toxic JNK activating signals thereby inhibiting the β -cell protective transcription factor CREB and contributing to β -cell apoptosis. This effect might present a novel mechanism how $\text{TNF}\alpha$ induces β -cell apoptosis thus contributing to the pathogenesis of diabetes mellitus.

