



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unravelling beta cell destruction in type 1 diabetes

Kracht, M.J.L.

Citation

Kracht, M. J. L. (2019, June 25). *Unravelling beta cell destruction in type 1 diabetes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/74472>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/74472>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:

<http://hdl.handle.net/1887/74472>

Author: Kracht, M.J.L.

Title: Unravelling beta cell destruction in type 1 diabetes

Issue Date: 2019-06-25

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Type 1 Diabetes (T1D) is het gevolg van de progressieve vernietiging van de bètacellen in de alvleesklier door autoreactieve CD8⁺ T-cellen. Dit leidt tot een tekort aan insuline en verstoorde homeostase van bloedglucose. Erfelijke factoren kunnen een verhoogd risico geven op het ontwikkelen van T1D, maar de genetische aanleg is niet voldoende om de ziekte te veroorzaken. Endoplasmatisch reticulum (ER) stress in disfunctionele bètacellen veroorzaakt door omgevingsprikkels is waarschijnlijk betrokken bij het doorbreken van perifere tolerantie en het initiëren van de pathogenese. Het ER is essentieel voor insuline productie en uitscheiding door bètacellen. Verstoringen van het ER en de accumulatie van ongevouwen eiwitten leiden tot activering van de ongevouwen eiwit respons, door activatie van ER-sensoren PERK, ATF6 en IRE1 α . Deze sensoren induceren signaleringsketens die trachten de ER-belasting te verminderen en de ER-capaciteit te vergroten om de homeostase te herstellen. In dit proefschrift is het onderzoek naar de effect van het inflammatoire micromilieu op de humane bètacelfunctie en immunogeniteit beschreven.

Insuline wordt beschouwd als een belangrijk autoantigeen dat betrokken is bij de vernietiging van bètacellen bij T1D-patiënten. Het signaalpeptide van preproinsuline (PPI) is een belangrijk doelwit van CD8⁺ T-cellen. Vorming en presentatie van het epitoom SP₁₅₋₂₄ wordt mede tot stand gebracht via signaalpeptidepeptidase en ER-aminopeptidase 1 (ERAP1). In **hoofdstuk 2** hebben we aangetoond dat ER stress geïnduceerd door pro-inflammatoire cytokinen de verwerking van SP₁₅₋₂₄ vergemakkelijkt via opregulatie van ERAP1. Deze opregulatie werd gemedieerd door een afname in miR-17 via IRE1 α RNase-activiteit. MiR-17 overexpressie of remming van IRE1 α verminderde de insult veroorzaakt door pro-inflammatoire cytokinen. Deze resultaten leveren direct bewijs voor de bijdrage van ER-stress bij de auto-antigeen verwerking en de immunogeniteit van bètacellen.

T1D werd geacht te worden veroorzaakt door onvolledige T-cel selectie in de thymus. Echter, het aandeel van bètacel disfunctie voorafgaand aan ziekte verschijnselen maakt plaats voor een alternatieve verklaring waarin de bètacellen actief bijdragen aan hun ondergang. Naast het opruimen van binnendringende ziekteverwekkers, is het immuunsysteem ook getraind om disfunctionele cellen te elimineren om zo te voorkomen dat ze schadelijk worden voor het lichaam. Een bekend voorbeeld hiervan is een effectieve

antitumor reactie. In **hoofdstuk 3.1** vergeleken we het tumor micromilieu met het micromilieu van eilandjes van Langerhans tijdens ontsteking ('insulitis') en betogen dat diabetes mogelijk het resultaat is van succesvolle verwijdering van disfunctionele cellen door het immuunsysteem. Neo-epitopen zijn belangrijke doelwitten van T-cellen in een effectieve antitumor respons omdat op deze manier 'functioneel-zelf' van 'disfunctioneel-zelf' kan worden onderscheiden. Van kankercellen is aangetoond dat ze een grote variatie aan neo-epitopen genereren door middel van onder andere mutaties, alternatieve splicing, foutieve ribosomale producten en veranderingen in posttranslationele modificatie (PTM) van native eiwitten. In **hoofdstuk 3.2** wordt de bijdrage van post-transcriptionele en post-translationele modificaties in de vorming van bètacel neo-antigenen geëvalueerd. Er zijn steeds meer aanwijzingen die de rol van omgevingsstress in neo-epitop vorming in T1D pathogenese ondersteunen. Deze voorbeelden tezamen suggereren dat de vernietiging van bètacellen op een effectieve antitumor respons lijkt. Een beter begrip van de oorsprong van neoepitopen is essentieel in onze strijd tegen T1D.

Op basis van deze hypothese hebben we in **hoofdstuk 4** insuline onderzocht als bron van neo-epitopen die zijn gegenereerd door onconventionele translationele processen. De hoge translatie snelheid van insuline in bètacellen, in combinatie met de intrinsieke fysiologische productiedruk tijdens metabolische behoeften, maken insuline een interessante kandidaat. Dit leidde tot de identificatie van een alternatief open leesraam binnen het insuline-mRNA. De productie van dit defecte ribosomale product is geassocieerd met ER-stress, zoals werd waargenomen in surrogaat bètacellen. Interessant is dat het resulterende polypeptide een zeer immunodominante N-terminus bevat dat kan worden gepresenteerd in zowel HLA klasse I als klasse II. CD8⁺ T-cellen gericht tegen dit epitop werden in een hogere frequentie in de circulatie van patiënten gevonden. Bovendien waren deze CD8⁺ T-cellen in staat menselijke bètacellen geïsoleerd uit de alvleesklier te vernietigen *in vitro*. Dit proces werd versterkt door ontstekingsfactoren duidend op de mogelijke relevantie hiervan in het ziekteproces.

Hoofdstukken 2, 3 en 4 benadrukken het belang van ER stress bij de verwerking en vorming van bètacel (neo)epitopen en auto-immuniteit. Daarom is het vermogen om ER stress te monitoren essentieel voor het begrijpen van het ziekteproces en kan het bijdragen aan de ontwikkeling van behandelingstherapieën. In **hoofdstuk 5** hebben we een bioluminescente

reporter-test ontworpen voor het ER-stress in menselijke bètacellen te detecteren. Dit reporterconstruct codeert voor een XBP1-Gaussia luciferase fusie-eiwit. In stress situaties wordt endogeen XBP1 geknipt door IRE1 α , wat een verschuiving van het leesraam veroorzaakt waardoor gedurende translatie de C-terminus van het eiwit wordt verlengd. Op een vergelijkbare manier zit de C-terminale Gaussia luciferase in dit fusieconstruct alleen in het correcte leesraam na IRE1 α gemedieerde splicing, wat resulteert in stress geïnduceerde expressie van luciferase. De kwantificatie van ER stress bleek gelijkwaardig aan klassieke ER stress-kwantificeringsmethoden, maar was minder bewerkelijk in uitvoering. Bovendien kan met behulp van een humane insuline promotor, de reporter specifiek tot expressie worden gebracht in bètacellen. Zodoende kan specifiek de ER stress status van bètacellen in geïsoleerde menselijke pancreaseilandjes worden bepaald. We voorzien dat deze reporter kan worden gebruikt om de oorsprong van ER stress te begrijpen en als screeningplatform voor het ontwikkelen van geneesmiddelen om ER stress te verminderen.

Insuline productie door bètacellen is van cruciaal belang, tegenstrijdig hieraan is dat insuline ook een van de belangrijkste autoantigenen is in T1D. Naast insuline en INS-DRiP, hebben we een splice variant van het insuline gen ontdekt dat bestaat uit de PPI signaalpeptide, de insuline B-chain en de C-terminus van INS-DRiP. In **hoofdstuk 6** analyseerden we deze insuline varianten in menselijke eilandjes van Langerhans met behulp van specifieke custom-made antisera. In overeenstemming met onze eerdere resultaten werd de N-terminus van INS-DRiP, waar het CD8 T-cel epitoom zich bevindt, gedetecteerd in bètacellen. De C-terminus van INS-DRiP werd niet gedetecteerd, wat erop kan duiden dat het polypeptide niet als volledig polypeptide bestaat, mogelijk als gevolg van snelle afbraak van 'non-STOP' eiwitten. Het mRNA dat codeert voor INS-splice is aanwezig in bèta- en deltacellen, maar het polypeptide lijkt beperkt te zijn tot deltacellen. Om specifiek te zijn, was het INS-splice eiwit gelokaliseerd in de granules van deltacellen. We vermoeden dat dit gerelateerd is aan de aanwezigheid van het signaalpeptide in INS-splice, dat de co- en posttranslationale verwerking stuurt. Hoewel de functie van INS-splice nog onbekend is, stellen wij voor dat deze splice variant mogelijk verband houdt met de ontwikkeling van beta- en deltacellen gedurende organogenese, maar het is ook denkbaar dat het bijdraagt aan het behouden van de plasticiteit van volwassen hormoon producerende cellen, aangezien alternatieve splicing een belangrijk mechanisme is bij organogenese en het

behoud van pluripotentie. De lokalisatie in deltacel granules suggereert ook een potentiële paracrine of endocriene functie.

ER stress in bètacellen lijkt T1D etiologie te stimuleren door het aantrekken en activeren van afweercellen, een verhoogde verwerking en presentatie van auto-antigenen en de productie van neo-epitopen. De formatie van neo-epitopen speelt mogelijk een cruciale rol in het verlies van perifere tolerantie. De identificatie van deze neo-epitopen is dus belangrijk voor bestudering en het begrijpen van ziekteprogressie, maar ook voor de ontwikkeling van immunotherapieën om de perifere bètacel tolerantie te herstellen. Daarnaast toont ons onderzoek het belang van onderzoek naar de oorzaken van bètacel disfunctie en stelt herstel van ER homeostase voor als potentieel therapeutisch doelwit.

