

FAGLIG

I bachelorprojektet undersøges, om generne *Rac2* og *Cav1* spiller en rolle for betacelledestruktionen i type 1-diabetes. Resultatet er inkonklusivt. Yderligere studier er nødvendige

CELLEBIOLOGISK FORSKNINGSPROJEKT I TYPE 1-DIABETES



AF:
ANNE JØRGENSEN
Forskningsbioanalytiker
Steno Diabetes Center
Copenhagen

KATJA KEMP JACOBSEN
Vejleder og medforfatter
lektor
Københavns Professionshøjskole

Jeg blev færdiguddannet bioanalytiker på Københavns Professionshøjskole i januar 2019. På 6. semester var jeg på udveksling i Australien i professor Sam El-Ostas forskningsgruppe (Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory, Department of Diabetes, Monash University). Jeg tog på udveksling i Melbourne for at prøve kræfter med forskning, og igennem udlandsopholdet har jeg udviklet mine kompetencer og fået mod på fremadrettet at arbejde med forskningsprojekter. Jeg ved, at jeg samtidig bidrager med stærke faglige kompetencer til et tværprofessionelt forskningsmiljø.

På 7. semester afsluttede jeg mit bachelorprojekt inden for forskning i type 1-diabetes på Steno Diabetes Center Copenhagen (SDCC). Denne artikel er udarbejdet i samarbejde med min vejleder, lektor Katja Kemp Jacobsen fra Københavns Professionshøjskole.

Mit perspektiv på et spændende og udfordrende forløb

I løbet af mit uddannelsesforløb har jeg flere gange oplevet en overraskelse over, hvor stærke kompetencer vi som bioanalytikere har. Kompetencer til udvælgelse af analysemetoder og kvalitetssikring af både metode og resultater. Jeg oplever, at vi har en unik forståelse af kvaliteten af de data, der produceres. En forståelse, som er essentiel for en objektiv resultatvurdering.

Jeg er stolt over vores faglige kompetencer og håber på, at vi som profession kan blive bedre til at vise, hvad vi som bioanalytikere kan bidrage med i fx en tværprofessionel forskningsgruppe. Jeg mener, at mit uddannelsesforløb inden for forskning har udviklet min faglige selvstændighed og givet mig mod til at stå frem i en faglig og tværprofessionel kontekst fx med molekylærbiologer, biokemikere og læger.

Jeg har været glad og stolt over at få lov til at arbejde med forskning under mit uddannelsesforløb og håber på at kunne fortsætte i mit videre arbejdsliv. Lige nu arbejder jeg på SDCC, hvor jeg har

min daglige gang i forskningsgruppen Translational Type 1 Diabetes Biology Research og yderligere har modtaget midler afsat til personale med en mellemlang videregående uddannelse (MVU-midler) til mit eget forskningsprojekt.

Diabetes

Diabetes er en kronisk metabolisk sygdom med fortsat stigende forekomst. På verdensplan estimerer World Health Organization (WHO), at antallet af personer med diabetes er steget fra 108 millioner i 1980 til 422 i 2014¹. Desuden vurderer International Diabetes Federation (IDF), at antallet af personer med diabetes vil stige fra 463 millioner i 2019 til 700 millioner i 2045².

Type 1-diabetes er forårsaget af en immunmediert destruktion af de insulinproducerende betaceller i bugspytkirtlen. Denne destruktion af betacellerne resulterer i manglende produktion af insulin hos patienter med type 1-diabetes, som medfører, at glukose ikke optages af cellerne i vævet fra blodbanen.

De præcise mekanismer, der er ansvarlige for den immunmedierede betacelledestruktion, er ukendte. Men destruktoren involverer komponenter fra både det medfødte og erhvervede immunsystem, hvilket fører til lokal inflammation i bugspytkirtlen. Der er bred enighed om, at type 1-diabetes skyldes en kombination af genetiske og miljømæssige risikofaktorer som fx virusinfektioner.

Forskning, der undersøger forskellige genetiske faktorer, kan have stor betydning for kortlægningen af årsagen til udviklingen af type 1-diabetes og derfor potentielt også for udviklingen af fremtidige lægemidler og metoder for sygdomsudredning og behandling af diabetes. Dette kan fx gøres ved at undersøge de molekylære mekanismer og processer, der foregår i og omkring betacellerne under udviklingen af sygdommen.

Tidligere genetiske studier har identificeret mere end 50 genregioner, der i forskellig grad påvirker risikoen for at udvikle type 1-diabetes. For de fleste af

disse geners vedkommende er de årsagsgivende mekanismer endnu ikke beskrevet³.

En potentiel regulatorisk rolle i type 1-diabetes

Et tidligere studie fra forskningsgruppen Type 1 Diabetes Biology på SDCC har vist, at overekspression af genet cathepsin H (CTSH) har en beskyttende effekt på apoptose. Apoptose er en særlig form for celledød, hvor cellerne undergår programmeret "selvmord". Dette er relevant for type 1-diabetes, fordi betacellerne undergår apoptose ved sygdommens udvikling. Denne regulatoriske effekt af CTSH-overekspression på apoptose er ligeledes forbundet med en reduktion af proteinmængden af fosforyleret c-Jun N-terminal kinase (p-JNK), som er en stresskinase i cellen. Samt en reduktion i genekspressionen af apoptoserelaterede gener og transkriptionsfaktorer. Det er generne inducerbar nitrogenoxid syntase (iNOS), Bcl-2-like protein 11 (Bim), MYC proto-onkogene (c-Myc) og death-promoting gene 5 (DP5), som alle er involveret i cytokininduceret apoptose.

Overekspression af CTSH er endvidere forbundet med en øget ekspresion af generne Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (*Rac2*) og

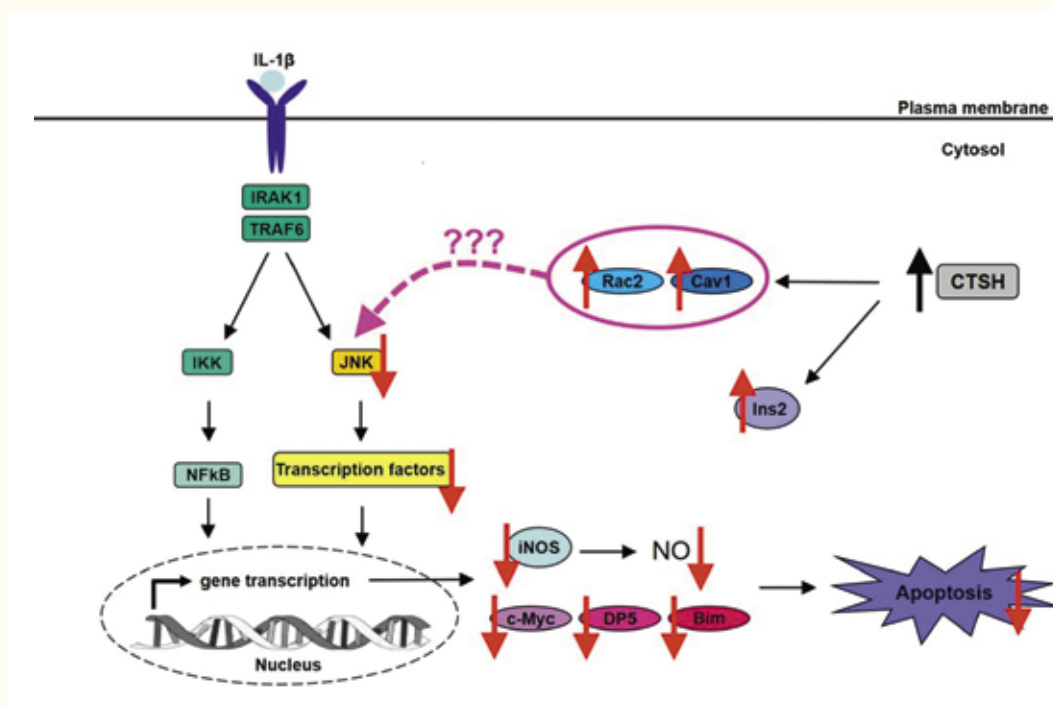
Caveolin-1 (*Cav1*), hvilket gav ideen til, at disse to gener har en regulatorisk effekt på apoptose og derfor er ansvarlige for den beskyttende effekt af CTSH på apoptotisk celledød⁴.

Rac2-genet koder for Rac2, et lille G-protein (~21kDa). Rac2 tilhører Ras-superfamilien af små proteiner, der nedbryder guanin trifosfat (GTP) og er en del af Rho-underfamilien af GTPaser.

Cav1-genet koder for proteinet Cav1 (~21kDa). Cav1 er hovedkomponenten i caveolae i cellers plasmamembran, som er en struktur, der har flere funktioner i forbindelse med celledesignering.

Denne hypotese var grundlaget for mit bachelorprojekt, hvor vi undersøgte, om *Rac2* og *Cav1* har en regulatorisk effekt på cytokininduceret apoptose i betaceller, ved at benytte en betacellelinje kaldet INS-1E. Resultaterne fra det tidligere studie er illustreret i figur 1. Figuren viser et samlet overblik over resultaterne fra apoptosesignaleringsvejen ved cytokinstimuleret apoptose. Generne er markeret med en sort pil op eller ned som indikator for øget eller nedsat ekspresion. Den forventede sammenhæng er illustreret med en stiplede pink pil med spørgsmålstegn på figuren.

»



FIGUR 1 viser en illustration af hypotesen bag bachelorprojektet. CTSH-overekspression i INS-1E-celler viser en beskyttende effekt på cytokininduceret apoptose. Overekspression af CTSH giver øget genekspression af *Rac2* og *Cav1*, hvilket kunne indikere, at de to gener er ansvarlige for den beskyttende effekt af CTSH på apoptose. Den beskyttende effekt imod cytokininduceret apoptose blev bekræftet i apoptosesignaleringsvejen gennem reducerede niveauer af JNK og downstream genekspression af iNOS, c-Myc, DP5 og Bim og øget ekspresion af insulingenet *Ins2*, som til sidst resulterer i nedsat apoptose.

Et *in vitro*-modelsystem for udviklingen af type 1-diabetes

I arbejdet på bachelorprojektet blev der anvendt et *in vitro*-modelsystem, hvor INS-1E-celler blev dyrket og efterfølgende stimuleret med proinflammatoriske cytokiner. Formålet var at efterligne den immunreaktion, der ses i udviklingen af type 1-diabetes. Figur 2 viser et flowdiagram over det eksperimentelle design for bachelorprojektet.

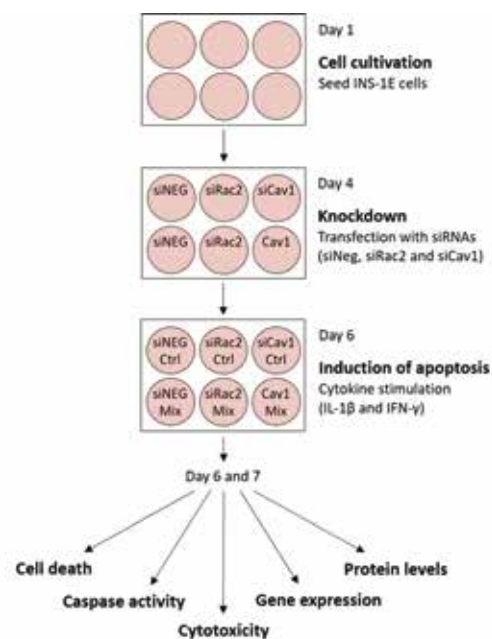
For at undersøge, om generne *Rac2* og *Cav1* har en regulatorisk effekt på apoptose, blev der udført knockdown af ekspresionen af de to gener ved hjælp af genspecifikke siRNA'er. siRNA'er er korte RNA-molekyler, der binder specifikt til *Rac2* og *Cav1* i DNA'et i cellekernen og derved blokerer for ekspresionen af de pågældende gener.

Det første mål var at undersøge effekten af knockdown af *Rac2* og *Cav1* på apoptose. Dette blev undersøgt ved hjælp af tre forskellige assays; Cell Death Detection ELISA-, Caspase-Glo 3/7- og CytotoxFlour Cytotoxicity-assay, som giver kvantitative mål for total celledød, apoptose og nekrose (cellemembranen går i stykker). Det andet mål var at undersøge de regulatoriske effekter af knockdown af *Rac2* og *Cav1* på insulinsekretionen, hvilket blev målt med et ELISA-assay specifikt for insulin. Det tredje mål var at undersøge, om knockdown af *Rac2* og *Cav1* ændrede ekspresionen af generne iNOS, c-Myc, DP5 og Bim, som er kendt for at være forbundet med cytokinstimuleret apoptose i betaceller. Det blev gjort ved hjælp af qPCR og Western Blot.

De opnåede resultater fra bachelorprojektet viste desværre ikke nogen regulatorisk effekt på *Rac2* og *Cav1*, hverken på cytokininduceret betacelleapoptose eller genekspression.

Mere viden er nødvendig

Yderligere studier er nødvendige for at fastslå, om *Rac2* og *Cav1* spiller en rolle for betacelledestruktionen i type 1-diabetes. En bedre forståelse af mekanismerne, der ligger til grund for betacelledestruktionen i type 1-diabetes, vil kunne bidrage til at finde årsagen til type 1-diabetes og identificere potentielle biomarkører til diagnostik, prognose og udvikling af nye lægemidler, som på sigt vil kunne hjælpe personer med diabetes. ■



FIGUR 2 viser et overblik over det eksperimentelle design. INS-1E-cellerne blev sået og derefter dyrket i tre dage (dag 1-3). Knockdown af de to specifikke gener *Rac2* og *Cav1* ved transfektion med siRNA (dag 4). Cytokinstimulering for at inducere apoptose (dag 6). Apoptose blev undersøgt ved hjælp af tre forskellige assays baseret på total celledød, caspaseaktivitet (apoptose) eller cytotoxicitet (nekrose). RNA eller protein blev høstet og behandlet for at udføre real-time qPCR og western blotting (dag 6 og 7).

¹WHO (2016). Global report on diabetes. World Health Organization. 1-88.

²International Diabetes Federation (2019). IDF diabetes atlas – 9th edition 2019.

³Størling, Joachim, and Flemming Pociot. "Type 1 diabetes candidate genes linked to pancreatic islet cell inflammation and beta-cell apoptosis". *Genes* 8.2 (2017): 72.

⁴Fløyel, Tina, et al. "CTSH regulates β -cell function and disease progression in newly diagnosed type 1 diabetes patients". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.28 (2014): 10305-10310.