

RAPPORT ANNUEL SFD / NOVARTIS

Titre du projet :

Impact de la méthylation déficiente d'ARNt dans la fonction et la survie des cellules bêta pancréatiques

Introduction : Le diabète de type 2 (DT2) est caractérisé par la perte progressive de la masse fonctionnelle des cellules β à la suite d'agressions environnementales chez des individus génétiquement prédisposés. Les voies critiques médiatrices de la perte de cellules β dans le DT2 sont mal comprises. Les polymorphismes dans CDKAL1, une méthylthiotransférase d'ARNt, ont été associés à un risque accru de DT2. Les mutations de perte de fonction dans TRMT10A, une probable méthyltransferase d'ARNt, causent diabète de la jeunesse et microcephaly, suggérant que les modifications anormales d'ARNt peuvent mener au dysfonctionnement et à la mort des cellules β pancréatiques.

Objectifs du projet : Elucider l'impact de la méthylation de l'ARNt déficiente dans la fonction et la survie des cellules β .

Méthodes : Les lignées cellulaires de lymphoblastes ont été dérivées de patients déficients en TRMT10A, de porteurs hétérozygotes pour les mutations et d'individus en bonne santé. TRMT10A a été silencieux dans les cellules β de rat (INS-1E) et les cellules β humaines (EndoC- β H1) en utilisant l'approche de l'interférence d'ARN. Des essais d'extension d'amorce ainsi qu'une nouvelle méthode de PCR en temps réel à haute sensibilité ont été utilisés pour identifier les substrats de TRMT10A. La fragmentation de l'ARNt a été évaluée par Northern blot. La charge d'ARNt a été évaluée par incorporation d'acides aminés radioactifs. La production de ROS a été mesurée en utilisant des sondes DCF et HPF et l'apoptose a été évaluée par coloration avec des colorants nucléaires. Western blots et PCR en temps réel ont été utilisés pour mesurer l'expression des protéines et ARNm, respectivement.

Résultats : L'analyse préliminaire de méthylation d'ARNt, en utilisant des ARNt isolés à partir de lymphoblastes des individus contrôles, et des patients déficients en TRMT10A, a confirmé le rôle de TRMT10A comme une méthyltransferase d'ARNt de mammifère (Fig. 1A). Les essais d'extension d'amorce, effectués pour identifier les substrats de TRMT10A, ont montré que tRNA^{Gln} et tRNA^{iniMeth} (figure 1B-D), mais pas tRNA^{Asn}, tRNA^{Gly} ou tRNA^{His} (données non représentées) sont méthylés par TRMT10A à la guanosine en position 9. Cela indique que l'enzyme a une grande spécificité du substrat. Ces résultats ont été confirmés à l'aide d'un nouveau test basé sur la PCR en temps réel que nous avons développé pour évaluer m¹G₉ dans des ARNt spécifiques (Fig. 2A-C). Cette technique est plus sensible que les essais d'extension d'amorces et nécessite une quantité très faible d'échantillon (50 ng d'ARN total). La méthode repose sur le fait que la présence de m¹G₉ perturbe la capacité des résidus G à former des paires de bases G-C (Watson-Crick), conduisant au blocage dans la transcription reverse. Une représentation schématique des étapes expérimentales est montrée sur la figure 2A. Nous avons également utilisé cette méthode dans les cellules β humaines où nous avons réduit l'expression de TRMT10A à l'aide des ARN interférence. Ces essais ont montré que la carence en TRMT10A conduit également à l'hypométhylation de tRNA^{Gln} et tRNA^{iniMeth} dans les cellules β (Fig. 2D-F).

Pour évaluer si l'hypométhylation de l'ARNt affecte la charge des ARNt, nous avons cultivé des lymphoblastes de patients et des individus témoins dans un milieu contenant de la ³H-glutamine ou de la ³⁵S-méthionine. Après extraction totale d'ARN dans des conditions acides pour préserver la charge des ARNt, la radioactivité a été mesurée avec un scintillomètre. Le signal radioactif a été normalisé par la teneur totale en ARN. Aucune différence dans la

charge d'ARNt n'a été détectée entre les patients et les contrôles ce qui suggère que la présence ou l'absence de m¹G₉ n'affecte pas la charge des ARNt (Fig. 3). Puisque les ARNt hypomodifiés peuvent être dégradés ou fragmentés nous avons effectué une analyse de Northern dans des ARNt isolés à partir de lymphoblastes des témoins et des patients déficientes en TRMT10A, pour évaluer si l'hypométhylation des l'ARNt conduit à une fragmentation et / ou une dégradation de l'ARNt. Ces expériences ont montré des fragments 5' tRNA^{Gln} accrus chez les patients par rapport aux témoins (Fig. 4). Le modèle de fragmentation suggère que l'absence de m₁G⁹ conduit à la fragmentation spécifique de l'ARNt plutôt qu'à la dégradation aléatoire des ARNt. Aucune fragmentation n'a été observée pour tRNA^{iniMeth}, tRNA^{Asn} ou tRNA^{His}, ce qui suggère que l'absence de m¹G₉ affecte seulement certaines espèces d'ARNt (Fig.4). Nous avons déjà montré que la carence en TRMT10A induit une apoptose des cellules β. Nos données préliminaires indiquent que la réduction de l'expression de TRMT10A dans les cellules β conduit au stress oxydatif mesuré par le diacétate 2', 7'-dichlorodihydrofluorescéine (H2DCFDA) (Fig. 5B). Nous avons également montré que la déficience en TRM10A active la voie intrinsèque d'apoptose, évaluée par le clivage de la caspase-9 et la libération du cytochrome c (Fig. 5C et D), dans les cellules β de rat et humaines, et augmente l'expression et l'épissage de la protéine pro-apoptotique Bim (Fig. 5E et F). En outre, nos résultats suggèrent que Bim est un médiateur clé de l'apoptose induite par la carence de TRMT10A car la réduction en l'expression de Bim empêche l'apoptose induite par la déficience en TRMT10A (Fig.5G). Le glucagon-like peptide 1 (GLP-1) est une hormone sécrétée par les cellules endocrines intestinales en réponse à l'apport alimentaire. Dans les cellules β, elle stimule la formation d'AMPc, augmente la sécrétion d'insuline et favorise la survie des cellules β. Des analogues de GLP-1 à longue durée d'action, par exemple l'exendine-4, ont été développés pour le traitement de la DT2. Nos résultats préliminaires montrent que l'inducteur de l'AMPc forskoline et l'exendine-4 protègent les cellules β déficientes en TRMT10A (Fig. 6), ce qui suggère que les analogues de GLP-1 peuvent avoir un potentiel thérapeutique pour les patients déficients en TRMT10A.

Conclusions et expériences en cours : Nous avons confirmé que TRMT10A est une méthyltransférase d'ARNt de mammifères qui modifie résidu de guanosine à la position 9 des certains ARNt. Nous avons identifié tRNA^{Gln} et tRNA^{iniMeth} comme les substrats de TRMT10A. Nous avons développé une nouvelle méthode de PCR en temps réel pour étudier la méthylation de l'ARNt et nous avons confirmé nos résultats dans les cellules β-déficientes en TRMT10A. Nous avons montré que la méthylation de l'ARNt médiée par TRMT10A n'influence pas la charge d'ARNt, mais est nécessaire pour empêcher la fragmentation d'ARNt spécifiques. Puisque les fragments d'ARNt sont une nouvelle classe des ARN non codants qui peuvent réguler les processus cellulaires en modulant l'expression génique et la survie cellulaire, nous évaluons actuellement si les fragments d'ARNt identifiés sont responsables de l'activation de la voie intrinsèque d'apoptose observée dans les cellules β déficientes en TRMT10A.

Nous avons montré que les analogues de GLP-1 peuvent avoir un potentiel thérapeutique dans le cadre d'une déficience en TRMT10A. Nous étudions actuellement les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette protection. Les études protéomiques des cellules β déficitaires en TRMT10A sont actuellement en cours (en collaboration avec le Dr Kris Gevaert, Université de Gand, Belgique) et nous travaillons également activement à la différenciation des cellules souches pluripotente induites (iPSC) des sujets témoins et des patients déficientes en TRMT10A dans des β- cellules. Nous prévoyons avoir des résultats au sujet de ces questions au cours de la prochaine période de rapport.

➤ **Ce travail a été ou sera présenté lors des réunions internationales et nationales suivantes en présentation orale ou par poster présenté:**

1. **Igoillo-Esteve M**, Cosentino C, Atta M, Ravanat JL, Eizirik DL, Cnop M. Elucidation des mécanismes pathogènes du diabète induit par une déficience en TRMT10A et identification des nouvelles approches thérapeutiques. Congrès Annuel de la Société Francophone du diabète. 2017. Lille, France.
2. Cosentino C, Atta M, Ravanat JL, Diaz Villamil E, Toivonen S, Pachera N, Eizirik DL, Cnop M, **Igoillo-Esteve M**. TRMT10A deficiency causes tRNA hypomethylation and tRNA fragmentation – a novel mechanism for human and rodent β -cell demise. Islet Study Group and Beta Cell workshop. **2017**. Dresden, Germany.
3. Cosentino C, Oltean T, Atta M, Ravanat JL, Eizirik DL, Miriam Cnop, **Igoillo-Esteve M**. Deficiency in the tRNA methyltransferase TRMT10A activates the intrinsic pathway of apoptosis in pancreatic β -cells. 52nd annual meeting, European association for the study of Diabetes (EASD) **2016**. Munich, Germany.
4. **Igoillo-Esteve M**. tRNA modifications and disease: “Studying the role of TRMT10A deficiency in diabetes and microcephaly” Interdisciplinary Biomedical Research Seminars, IRIBHM. *Invited lecture*. September 22nd **2016**. Campus Erasme. ULB.

➤ **Un manuscrit relatif à ce projet est actuellement en préparation :**

TRMT10A deficiency leads to tRNA hypomethylation and tRNA fragmentation - a novel mechanism for human and rodent β -cell demise. Cosentino C, Atta M, Ravanat JL, Diaz Villamil E, Deglasse JP, Jonas JC, Eizirik DL, Cnop M, **Igoillo-Esteve M**.

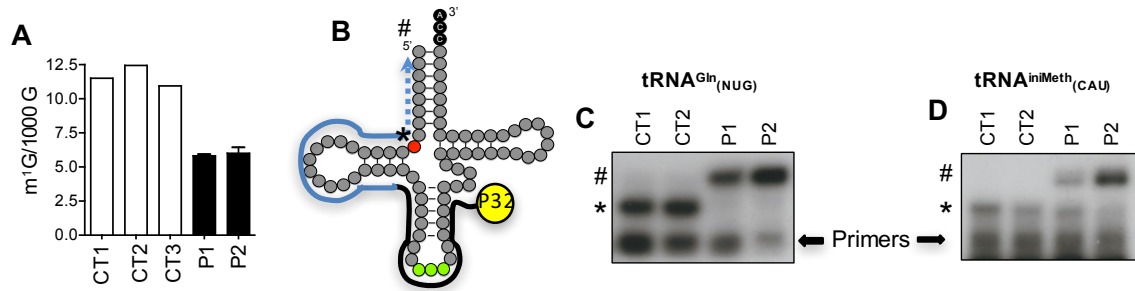


Fig. 1. TRMT10A deficiency impairs tRNA^{Gln} and tRNA^{iniMeth} guanosine methylation. tRNAs were purified from lymphoblasts from three controls (CT1-3), and two TRMT10A-deficient patients (P1-2). (A) Analysis of guanosine methylation (m¹G) on the isolated tRNAs. m¹G was quantified by ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The results are expressed as number of methylated guanosines per 1000 guanosines (m¹G/1000G), n=1-2. (B-D) Assessment of guanosine 9 methylation (m¹G₉) in specific tRNAs by primer extension assay. Purified tRNAs were reverse transcribed using P³² radiolabeled primers targeting tRNA^{Gln}, and tRNA^{iniMeth} both bearing G₉. The amplification products were separated in denaturing polyacrylamide gels and the radioactive signal was detected by autoradiography. (B) Schematic representation of the assay. The red circle represents G₉, green circles represent the anticodon. The black line represents the radiolabeled oligonucleotides used as primers. m¹G₉ stops the reverse transcription generating short amplicons (*). In the absence of m¹G₉ the reverse transcription continues up to the 5' end of the tRNA (blue dotted lines) generating longer amplification products (#). (C and D) Representative autoradiography for each tRNA n=3-4.

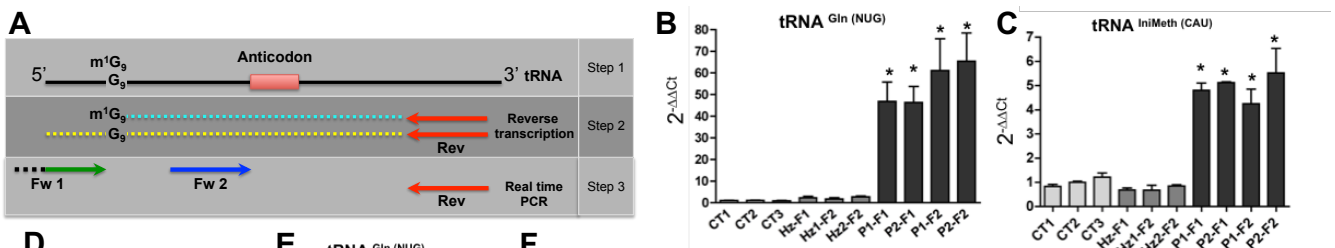


Fig. 2. TRMT10A deficiency impairs tRNA^{Gln} and tRNA^{iniMeth} guanosine methylation. tRNA methylation was assessed by real-time PCR. (A) Schematic representation of the experiment. Purified tRNAs (Step 1) were reverse transcribed (Step 2) using reverse primers targeting tRNA^{Gln} or tRNA^{iniMeth}. The synthesized cDNA was then used as template in real time PCR using the following primer combinations: (Fw1 + Rev) and (Fw2 + Rev) (Step 3). The presence of m¹G₉ blocs the reverse transcription leading to a short amplicon (blue dotted line in panel H), and no PCR amplification is obtained when Fw1 + Rev primers are used. In the absence of m¹G₉ the reverse transcription continues until the 5' end of the tRNA (yellow dotted line) allowing PCR amplification with Fw1 + Rev primers. The PCR amplification with Fw2 + Rev is not modified by the presence m¹G₉. (B and C) real-time PCR data for the specified tRNAs on tRNAs-enriched total RNA isolated from lymphoblasts from three controls (CT1-3), three heterozygous carriers (Hz) for TRMT10A nonsense mutations from two independent families (F1 and F2), and two TRMT10A-deficient patients from each family (P1-2 F1) and (P1-2 F2). (D) TRMT10A mRNA expression in EndoC-βH1 cells. Two different siRNAs targeting human TRMT10A (siTRMT10A #3 and #4) were used to silence TRMT10A gene expression, n=3. Gene expression was normalized to the reference gene GAPDH. (E and F) real-time PCR data for the specified tRNAs on tRNAs-enriched total RNA isolated from RNAi-mediated TRMT10A-deficient EndoC-βH1 cells. The results are expressed as 2^{-ΔΔCt} and are means ± SE of n=3-4 independent experiments.

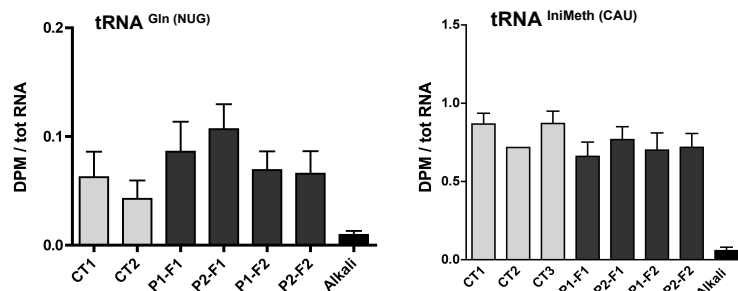


Fig.3. TRMT10A-mediated tRNA methylation does not modify tRNA charging. Lymphoblasts from controls (CT 1-3) and TRMT10A-deficient patients (P1 and 2) from two different families (F1 and F2) were incubated in glutamine or methionine-free medium for 15 min to induce tRNA uncharging. Then the samples were incubated for 10 min in the presence of radiolabelled ³⁵S-Methionine or ³H-Glutamine. The cells were then collected by centrifugation, washed to eliminate the unincorporated radioactive amino acids, and lysed for RNA extraction in acidic conditions (pH 4.5). This allows tRNA charging preservation. One sample was alkali-treated (pH 9) for 30 min to complete uncharge the tRNAs. This sample was used as negative control (Alkali). Radioactivity was measured by radiometric analysis. The results means ± SE, and are expressed as DPM

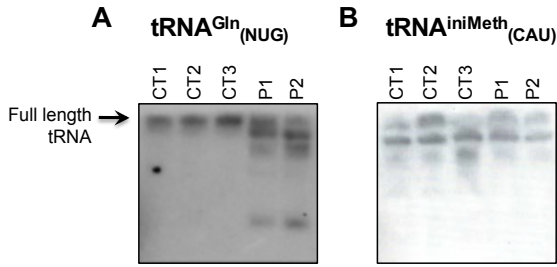


Fig. 4. TRMT10A deficiency leads to tRNA_{Gln} fragmentation. Processing of both pre-tRNA and mature tRNA can give rise to small RNA fragments, a process enhanced by deficient tRNA modifications. tRNA fragmentation was analyzed by northern blot using radiolabeled probes designed to target 5' halves. tRNA^{Gln} was differentially fragmented in patient samples compared to controls (A), while no difference in fragmentation was observed for tRNA^{iniMeth} (B). Panels show representative autoradiographies, n=2-3 independent experiments.

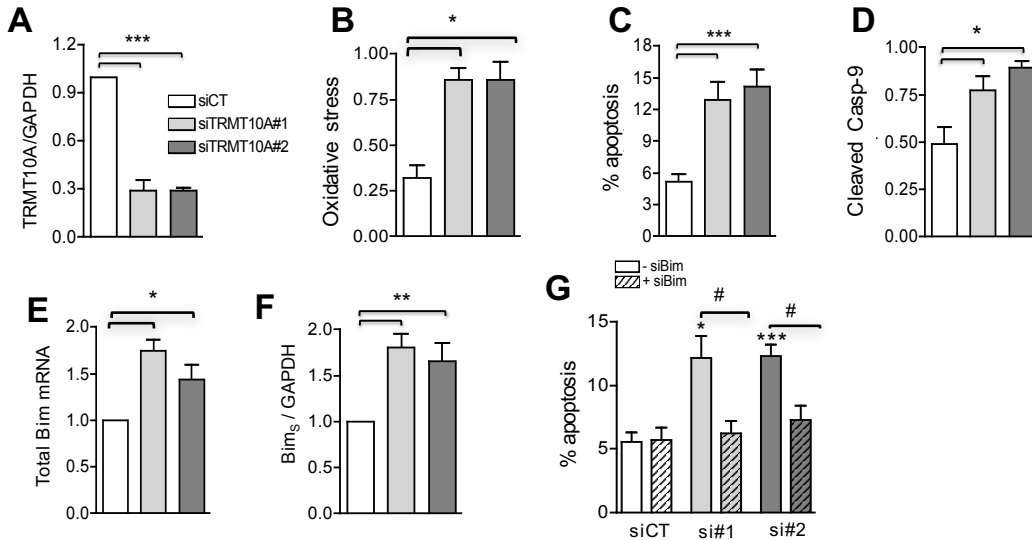


Fig. 5. TRMT10A deficiency activates the intrinsic pathway of apoptosis in β -cells. TRMT10A expression was silenced (siTRMT10A) or not (siCT) for 48h in INS-1E using two siRNAs targeting rat TRMT10A (si#1 and #2). TRMT10A mRNA expression was analyzed by real-time PCR (A). Oxidative stress was assessed by DCF (B). β -cell apoptosis was examined by Hoechst/propidium iodide staining (C). Activation of the intrinsic pathway of apoptosis was assessed by Western blots for cleaved caspase-9 (D). Caspase-9 expression was normalized to the reference proteins GAPDH and α -tubulin, respectively. The graphic is the densitometric quantification of the Western blots. (E and F) Total Bim and Bim small mRNA expression examined by real-time PCR 48 h after TRMT10A knockdown. (G) double knockdown of TRMT10A and Bim. INS-1E cells were transfected with siCT, or the two siRNAs targeting rat TRMT10A (si#1 and #2) alone or combined with Bim siRNA (siBim). β -cell apoptosis was examined by Hoechst/propidium iodide staining. Data are shown as means \pm SE of n=5-11 independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, siTRMT10A vs siCT, #p<0.05, siTRMT10A/Bim vs siTRMT10A by paired t test.

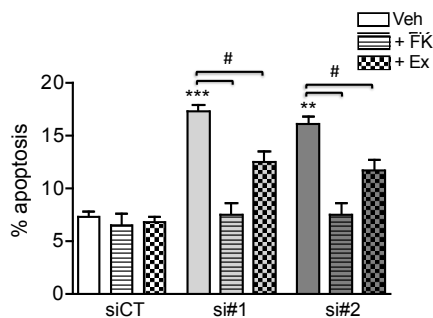


Fig.6. cAMP inducers prevent TRMT10A deficiency-induced apoptosis in β -cells. INS-1E cells were transfected with a control siRNA (siCT), or siRNAs targeting rat TRMT10A (#1, #2). After transfection the cells were treated or not for 48 h with 20 μ M forskolin (FK) or 50 nM exendin-4 (Ex). β -cell viability was assessed by Hoechst/propidium iodide staining. Results are mean \pm SE of n=3-5 independent experiments. **p<0.01, ***p<0.001 siTRMT10A vs siCT, #p<0.05, siTRMT10A (+FK or Ex) vs siTRMT10A (Veh).