

Abstract

Project Code : TRG5980017

Project Title : Functional studies of Paired box 4 (Pax4) in pancreatic beta-cells

Investigator : Jatuporn Sujitjoon

E-mail Address : jatuporn.suj@mahidol.ac.th, tangnina19@gmail.com

Project Period : June 2016 - Nov 2018

Polymorphisms of *Paired box 4 (PAX4)* were associated with type 2 diabetes (T2D) in East Asian population and mutations of *PAX4* caused maturity onset diabetes of the young, type 9 (MODY9). The role of Pax4 in pancreatic beta-cell survival and/or proliferation has been reported and a decrease in beta-cell number contributes to the pathogenesis of T2D and MODY. To better understand the critical role that Pax4 exerts in pancreatic beta-cells, this study generated *Pax4* knockdown INS-1 832/13 cells using specific siRNA and identified transcriptional regulatory network of genes involved in beta-cell survival. *PAX4* knockdown (KD) cells displayed a 2.5-fold increase in beta-cell apoptosis and reduce in beta-cell viability. Down-regulation of *Wnt3a*, *Bcl2l1*, and *Bcl2l2* gene and protein were confirmed in *PAX4* KD cells. *Wnt3a* and *Bcl2l2* (Bcl-w) were firstly described as target genes regulated by Pax4. Overexpression of *PAX4* did not show any significant increase transcriptional activity on the *Wnt3a* and *Bcl2l2* promoters, while it had significantly increased transcriptional activity on the *Bcl2l1* promoter. The cells overexpressing HNF1A or HNF4A had significantly increased *Wnt3a* promoter activity, and those cells expressing HNF1A can also stimulate *Bcl2l2* gene promoter. Decreased expression of *Hnf1a*, but not *Hnf4a*, was observed in *Pax4* KD cells. Furthermore, we show that Pax4 may play roles in the regulation of *Hnf1a* gene expression. This finding suggests that decreased *Wnt3a* gene expression may be partly controlled by HNF4A and HNF1A, which is regulated by *PAX4*. For *Bcl2l1* gene promoter, we demonstrate that overexpression of *PAX4*, HNF1A, and HNF1A can activate the promoter activity. In addition, we confirm the crucial role of *PAX4* in maintaining beta-cell number and survival of human pancreatic beta-cell line (1.1B4). In conclusion, Pax4 is a crucial transcription factor regulating beta-cell survival via *Wnt3a* signaling and anti-apoptotic pathways. The understanding of *PAX4* function and its downstream target may offer a promising approach for endogenous replenishment of the lost beta-cell mass for DM treatment.

Keywords: Paired box 4, *PAX4*, MODY9, Beta-cell survival, Anti-apoptosis

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5980017

ชื่อโครงการ : การศึกษาหน้าที่ของโปรตีน Paired box 4 ในเซลล์เบต้าจากตับอ่อน

ชื่อนักวิจัย : จตุพร สุจิตร์จุล/ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : jatuporn.suj@mahidol.ac.th, tangnina19@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : มิถุนายน 2559 ถึง พฤศจิกายน 2561

ความแปรผันของยีน *Paired box 4* หรือ *PAX4* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่สอง ในประชากรชาวเอเชียตะวันออก และการกลายพันธุ์ของยีนยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเบาหวานชนิดโมติที่ 9 อีกด้วย โปรตีนนี้มีบทบาทสำคัญในเซลล์เบต้าจากตับอ่อน ช่วยสนับสนุนการเพิ่มจำนวนเซลล์และช่วยป้องกันการตายของเซลล์เบต้าในสภาวะต่างๆ ซึ่งการที่เซลล์เบต้ามีจำนวนลดลงนับเป็นพยาธิกำเนิดหนึ่งของโรคเบาหวานทั้งชนิดที่สองและโมติ ดังนั้น เพื่อเพิ่มองค์ความรู้ในเรื่องหน้าที่ของโปรตีน Pax4 ในเซลล์เบต้าในการควบคุมการอยู่รอดของเซลล์ การศึกษานี้จึงทำการลดการแสดงออกของยีนในเซลล์เบต้าด้วยการใช้ siRNA และศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอยู่รอดของเซลล์รวมถึงกลไกระดับโมเลกุลของ Pax4 ในการควบคุมยีนเหล่านี้ด้วย ผลการศึกษาพบว่า เมื่อลดการแสดงออกของ Pax4 พบอัตราการตายของเซลล์เบต้าของหนูสูงขึ้นถึง 2.5 เท่า และมีอัตราการรอดของเซลล์ที่ลดลง นอกจากนี้ ยังพบการแสดงออกของยีนและโปรตีน *Wnt3a*, *Bcl2l1* (*Bcl-xL*), และ *Bcl2l2* (*Bcl-w*) ลดลงในเซลล์ที่ถูกลดการแสดงออกของ Pax4 ซึ่งการศึกษานี้เป็นการรายงานแรกที่แสดงว่า Pax4 น่าจะมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีน *Wnt3a* และ *Bcl2l2* การศึกษานี้ยังพบว่า PAX4 ไม่สามารถกระตุ้น *Wnt3a* และ *Bcl2l2* ได้โดยตรง แต่สามารถกระตุ้น *Bcl2l1* ได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี luciferase promoter assay นอกจากนี้ ยังแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน HNF1A หรือ HNF4A สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ *Wnt3a* promoter activity ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน HNF1A สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ *Bcl2l2* promoter นอกจากนี้ Pax4 อาจมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน *Hnf1a* อีกด้วย เซลล์เบต้าที่ถูกลดการแสดงออกของ Pax4 พบระดับการแสดงออกของยีน *Hnf1a* ลดลงแต่ไม่มีผลต่อยีน *Hnf4a* ดังนั้น การแสดงออกของยีน *Wnt3a* น่าจะถูกควบคุมด้วย HNF4A และ HNF1A ซึ่งถูกควบคุมด้วยโปรตีน PAX4 สำหรับยีน *Bcl2l1* นั้นน่าจะถูกควบคุมด้วยโปรตีน PAX4 และ HNF-1A และ HNF-4A นอกจากการศึกษาในเซลล์เบต้าจากหนูแล้ว ผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นความสำคัญของ PAX4 ที่ช่วยควบคุมการอยู่รอดของเซลล์เบต้าจากตับอ่อนของมนุษย์อีกด้วย โดยสรุป Pax4 เป็นโปรตีนสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมการอยู่รอดของเซลล์เบต้าจากตับอ่อน โดยอาศัยการทำงานผ่าน *Wnt3a* signaling ที่น่าจะช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์และผ่านทางสร้างโปรตีนที่ช่วยต่อต้านการตายของเซลล์ ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของ PAX4 และยีนเป้าหมายที่ถูกควบคุมโดย PAX4 นี้จะนำไปสู่การค้นหาแนวทางการรักษาที่ดีขึ้นในการหาวิธีสร้างเซลล์เบต้าทดแทนเซลล์เบต้าที่ลดลง เพื่อใช้สำหรับการรักษาโรคเบาหวานในอนาคต

คำหลัก : Paired box 4, PAX4, โรคเบาหวานชนิดโมติ, การอยู่รอดของเซลล์เบต้าจากตับอ่อน, ภาวะด้านการตายของเซลล์