

P. MIRANDOLA<sup>1,2,3</sup>,  
I. SPONZILLI<sup>4,\*</sup>, M. VANELLI<sup>4</sup>,  
M. VITALE<sup>1,2,3</sup>

## Obesità ed espressione della proteina chinasi Cε nelle cellule del sangue periferico

PROGRESS IN NUTRITION  
VOL. 14, N. 2, 127-131, 2012

### TITLE

Obesity and Protein kinase Cε epsilon expression in peripheral blood cells

### KEY WORDS

Western blot, insulin receptors, BMI, diabetes, signaling

### PAROLE CHIAVE

Western blot, recettori dell'insulina, BMI, diabete, signaling

<sup>1</sup>Dipartimento di Anatomia Umana, Farmacologia a e Scienze Medico Forensi, Università di Parma  
<sup>2</sup>Centro Interdipartimentale di Morfologia, Biometria e composizione Corporea (CMBC), Università di Parma  
<sup>3</sup>Centro di Oncologia Molecolare e Traslazionale (COMT), Università di Parma

<sup>4</sup>Dipartimento dell'Età Evolutiva, Sezione di Auxologia e Metabolico-Nutrizionale, Università di Parma

\* Attualmente presso il Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. Marco Vitale

Dipartimento di Anatomia Umana, Farmacologia a e Scienze Medico Forensi, Università di Parma

via Grasmci 14 - 431265 - Parma

Tel. 0521 033032 - Fax: 0521 033033

E-mail: Marco.vitale@unipr.it

### Summary

The so-called Metabolic Syndrome is a clustering of metabolic disorders, including insulin resistance, obesity, hyperglycemia, dyslipidemia, and hypertension, mainly caused by overnutrition and sedentary lifestyles particularly in developed countries as well as genetic predisposition. Obesity, insulin resistance and type 2 diabetes are associated and caused by the upregulation of the protein kinase C (PKC)ε expression in hepatic, adipose, pancreatic and skeletal tissue. It is well known that PKCε affects insulin receptor (IR) signaling and regulates both insulin secretion and clearance. Here, we have studied the expression levels of PKCε and IR in peripheral blood cells of obese children. Moreover, we have analyzed the correlation between PKCε/IR ratio with the BMI in adult underwent to high caloric food diet. As a final point, the role of PKCε as therapeutic target for management of obesity was discussed.

### Riassunto

Le sindromi metaboliche, un gruppo di disordini del metabolismo che includono insulino-resistenza, obesità, iperglicemia, dislipidemia e ipertensione; sono principalmente causate nelle società avanzate da un'eccessiva nutrizione, uno stile di vita sedentario ma anche da predisposizioni genetiche. L'obesità, l'insulino-resistenza e il diabete di tipo 2 sono associate a – e in parte causate da – l'aumento dell'espressione della proteina chinasi C (PKC)ε nel tessuto epatico, pancreatico, adiposo e muscolare scheletrico. È stato ampiamente dimostrato che PKCε interferisce con il signaling del recettore dell'insulina (IR) e con la secrezione e la clearance dell'insulina stessa. Noi abbiamo studiato i livelli di espressione di PKCε e IR nelle cellule mononucleate del sangue di bambini obesi. Inoltre abbiamo analizzato la correlazione esistente tra il rapporto PKCε/IR e il BMI in un adulto volontario sottoposto a regime dietetico ipercalorico. Infine, viene discusso il ruolo di PKCε quale potenziale bersaglio terapeutico nel trattamento dell'obesità.

## Introduzione

L'obesità è una malattia multifattoriale per la quale sono state identificate componenti genetiche, basi immunitarie e preponderanti fattori ambientali (dieta ipercalorica) (1-4). Le basi genetiche dell'obesità sono prevalentemente costituite da mutazioni a carico di geni che inducono o sono strettamente associati ad insulino-resistenza e diabete mellito (5-8). Tra le alterazioni molecolari che inducono la resistenza insulinica e la patogenesi del diabete di tipo 2 (DT2), è stato osservato essere presente un aumento dell'espressione di alcune isoforme della famiglia delle proteine chinasi C (PKC) (9). Infatti l'isoforma  $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ), che è aumentata nel tessuto adiposo, nel fegato e nelle *insulae* pancreatiche di soggetti con DT2 è responsabile di alcuni aspetti della resistenza insulinica (10-13). Si è dimostrato che PKC $\epsilon$  è in grado di interferire con la fosforilazione e l'attivazione dei mediatori del signalling del recettore insulinico (come IRS-1, IRS-2, Akt e FOXO-1), riducendo e spegnendo la trasduzione del segnale del recettore dell'insulina (IR) (11, 12, 14, 15). Inoltre, recentemente, è stato dimostrato che PKC $\epsilon$ , aumentando i livelli di espressione del fattore trascrizionale HMGA-1, può inibire l'espressione di IR (16). Similmente, noi abbiamo dimostrato

che l'aumento dell'espressione di PKC $\epsilon$  induce un aumento del fattore trascrizionale FOXO-1 che a sua volta inibisce, come HMGA-1, la trascrizione del gene di IR (18). Gli studi condotti su modelli animali con DT2, mostrano che l'aumento di PKC $\epsilon$  precede l'aumento di peso e quindi l'obesità, essendo un marcatore precoce nella patogenesi del DT2 (10, 15). La deregolazione dell'espressione di IR e di PKC $\epsilon$  appare sistematicamente in tutti gli organi target dell'insulina e responsabili del controllo glicemico come il tessuto adiposo, muscolare scheletrico, pancreatico. I linfociti, che non sono primariamente coinvolti nella patogenesi dell'obesità o del DT2 sono però considerati un buon modello cellulare per lo studio della resistenza insulinica, essendo essi stessi sensibili all'insulina ed esprimendo PKC $\epsilon$  (17). Recentemente abbiamo dimostrato che PKC $\epsilon$  controlla la proliferazione dei linfociti T CD4+, inibisce il signalling della citochina antiinfiammatoria TGF-1 $\beta$ , potendo perciò avere un ruolo della patogenesi della malattie autoimmuni mediate dai T CD4+, come la tiroidite di Hashimoto (18). Date queste evidenze, abbiamo studiato i livelli di espressione di PKC $\epsilon$  e di IR nei linfociti del sangue periferico di bambini obesi e come il rapporto PKC $\epsilon$ /IR aumenti in modo significativo nell'adulto an-

che dopo piccole variazioni del BMI, in assenza di DT2.

## Materiali e metodi

### *Isolamento dei linfociti*

Le cellule mononucleate del sangue venoso periferico (15 ml di sangue raccolto in Na-citrato) sono state isolate per centrifugazione su un gradiente di Lympholyte-H (Euroclone) a 500 x g per 30 minuti a temperatura ambiente. Le cellule così ottenute (citato nel testo genericamente come linfociti) sono state lavate in soluzione fisiologica e centrifugate 10 minuti a 300 x g per eliminare il surnatante. I concentrati cellulari sono stati conservati a -80°C.

### *Estrazione proteica e analisi dell'espressione genica*

I concentrati cellulari sono stati lisi in 200  $\mu$ l di tampone di lisi (50mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.25% deossicolato di sodio; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1 mM NaF) contenente inibitori delle proteasi; le proteine così solubilizzate sono state quantificate tramite il test BCA<sup>TM</sup> (Pierce). Le proteine contenute in cinquanta  $\mu$ g di lisato cellulare sono state separate su gel denaturante di poliacrilamide (5%) ed SDS tramite elettroforesi, quindi trasfe-

**Tabella 1** - Descrizione e parametri clinici dei pazienti pediatrici

N.	Età anni	Sesso	Glicemia mg/dl	HbA1c %	BMI %
P1	14	F	115	6.8	>95
P2	11	F	130	7.0	>95
P3	10 (11.7)	M	122 (122.3*)	7.2 (7.0*)	85-95 (93.3*)
C1	14	F	84	5.8	50-75
C2	11	F	90	6.0	50
C3	9 (11.3)	M	78 (84.0)	5.6 (5.8)	50-75 (58.3)

P = bambino obeso; C = bambino sano (controllo); BMI = indice di massa corporea; HbA1c = emoglobina glicata; ( ) = valore medio; \* p<=0.002 vs gruppo bambini di controllo, analisi della varianza tramite Anova

rite su membrana da western blot. Il filtro è stato incubato con 1 mg/ml di siero policlonale di coniglio anti-PKCε (Upstate), l'anticorpo monoclonale (MoAb) di topo anti-catena-β di IR diluito 1:4000 (Calbiochem) e il MoAb anti-β-actina diluito 1:5000 (Sigma) (19-21).

*Analisi statistica*

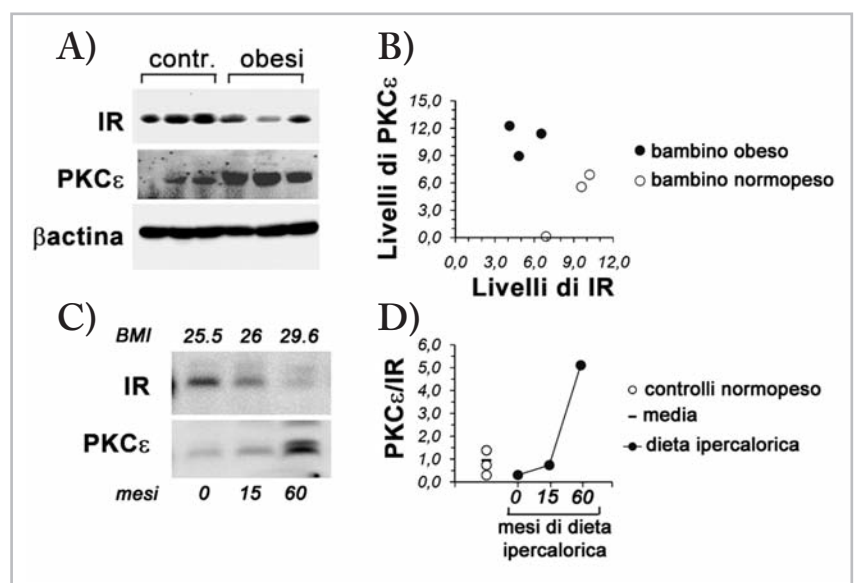
L'analisi statistica dei dati è stata effettuata tramite il software Primers of Biostatistics 4.02.

**Risultati**

Abbiamo analizzato i livelli di espressione di PKCε nei linfociti del sangue periferico di bambini e di adulti normopeso ed obesi.

La tabella 1 riporta la descrizione (età, BMI, diagnosi) dei sei soggetti studiati. La figura 1A mostra il risultato dell'analisi tramite Western Blot. I linfociti di soggetti obesi (con età compresa tra i 10 e i 14 anni) presentano un livello di PKCε significativamente superiore a quello osservabile in 3 soggetti della stessa età ma con BMI compreso tra 50° ed il 70° percentile. Contemporaneamente, l'analisi dei livelli di espressione di IR, mostra che esiste una correlazione inversa tra quantità di PKCε e livelli di IR. Il grafico della figura 1B, mostra i dati ottenuti dopo analisi densitometrica delle bande riportate

**Figura 1** - Analisi dei livelli di espressione di PKCε e IR tramite western blot. Pannelli A e B: i linfociti di tre bambini normopeso (contr.) e tre bambini obesi sono stati analizzati per PKCε, IR ed β-actina. L'analisi densitometrica delle bande osservate nel pannello A è riportata nel grafico (panello B). I cerchi neri rappresentano i valori ottenuti dai bambini obesi mentre i cerchi bianchi dai bambini di controllo. Pannelli C e D: analisi dei livelli di IR e PKCε in un soggetto adulto sano normopeso sottoposto a dieta ipercalorica. A giorni 0, 15 e 60 dall'inizio della dieta sono stati analizzati i livelli proteici di PKCε e IR (panello C). I valori densitometrici delle bande sono riportati nel grafico D come rapporto PKCε/IR (cerchi neri). Il grafico riporta anche i valori di PKCε/IR ottenuti da altri 4 adulti normopeso (cerchi bianchi). La media dei valori di PKCε/IR degli adulti normopeso è riportata nel grafico (linea).



nel pannello A: come si può osservare i tre soggetti diabetici (cerchio nero) hanno un rapporto PKC $\epsilon$ /IR di  $4.38 \pm 1.36$  che è significativamente maggiore di quello osservato in soggetti coetanei normopeso ( $0.85 \pm 0.71$ ,  $p=0.018$  t-test). Ci siamo chiesti se l'intervallo di tempo e se la variazione del BMI necessari per indurre questa evidente modificazione dell'espressione genica di PKC $\epsilon$  e di IR fossero particolarmente elevati. Abbiamo reclutato un adulto sano, che si è sottoposto volontariamente a una dieta ipercalorica per un periodo di tempo di 2 mesi. Prima e dopo la dieta sono stati valutati i livelli ematici a digiuno di glucosio e di emoglobina glicata. Nessuna variazione della glicemia e dei livelli emoglobina glicata è stata osservata, mentre il BMI è variato da 25.5 a 26 in 15 giorni ed è salito fino a 26.9 al 60° giorno. Abbiamo analizzato i livelli di PKC $\epsilon$  e di IR prima, durante (15° giorno) e alla fine della dieta (60° giorno): come si evince dalla figura 1C (cerchi neri), in questo ridotto intervallo di tempo il rapporto PKC $\epsilon$ /IR è significativamente aumentato da 0.3 a 5.2, tanto che l'analisi statistica rivela che il valore di  $5.15 \pm 2.05$  osservato quando il BMI era salito a 26.9 risulta significativamente diverso dalla media di valori di PKC $\epsilon$ /IR osservabile in altri 4 adulti sani normopeso ( $5.15 \pm 2.05$  vs  $0.95 \pm 0.53$ ,  $p=0.037$  t-test).

## Discussione

L'obesità è una malattia metabolica multifattoriale e recentemente è stato dimostrato che l'aumento della massa grassa è imputabile ad un processo flogistico/inflammatorio (3, 4, 22).

La resistenza insulinica è un importante meccanismo molecolare che induce l'obesità e predispone alla patogenesi del DT2 e delle numerose complicanze cardiovascolari osservabili nel soggetto obeso (23-26). La PKC $\epsilon$  è un enzima chiave nell'insorgenza della resistenza insulinica. Infatti è stato dimostrato che interferisce con la segnaletica molecolare dell'IR e con i livelli di espressione di IR stesso (11, 12, 14, 15). Inoltre recentemente abbiamo dimostrato che PKC $\epsilon$  sostiene la proliferazione linfocitaria e riduce la risposta del linfocita T CD4+ al TGF-1 $\beta$ , il che le conferirebbe un ruolo nella patogenesi di malattie autoimmuni (18). Dato che i linfociti rispondono all'insulina e sono considerati un modello per lo studio della segnaletica dell'insulina (17), i livelli elevati di PKC $\epsilon$  osservabili nei linfociti di soggetti in sovrappeso e/o obesi potrebbero rispecchiare l'alterazione dell'espressione genica che avviene sistemicamente in vari organi quali il fegato, il tessuto adiposo ed il tessuto muscolare, dove l'insorgenza della resistenza insulinica produce i mag-

giori effetti metabolici. Inoltre, tenuto conto delle ultime evidenze sperimentali, l'aumento di PKC $\epsilon$  nei linfociti potrebbe essere alla base di un'alterata risposta linfocitaria nel tessuto adiposo, che innescerebbe quei meccanismi infiammatori che indurrebbero l'adipogenesi, il sovrappeso e l'obesità. L'inibizione dell'attività enzimatica della PKC $\epsilon$  è già stata proposta come approccio terapeutico per il DT2 (15). Infatti, il controllo dell'attività di PKC $\epsilon$  in modelli animali ha dato numerosi risultati positivi (riduzione della steatosi epatica non alcolica, aumento della secrezione pancreatica di insulina e riduzione della clearance renale di insulina), anche se il modello animale scelto, il tipo di alimentazione, e la durata del trattamento hanno condizionato l'efficacia della terapia con gli inibitori della PKC $\epsilon$  (15).

Le nostre ultime evidenze sperimentali ci inducono a pensare che PKC $\epsilon$  potrebbe rappresentare un nuovo bersaglio molecolare nel trattamento farmacologico dell'obesità ed un marcatore molecolare per stratificare meglio i soggetti obesi refrattari o poco responsivi agli interventi farmacologici tradizionali. Allo stato attuale sono stati sviluppati sia inibitori che attivatori selettivi della PKC $\epsilon$ . Purtroppo queste molecole, che sono in *trial* clinico su pazienti affetti da uveiti, psoriasi o nel controllo

del rigetto del trapianto (rene), del dolore neuropatico, post-erpetico o post-operatorio, non sono ancora in *trial* clinico in pazienti obesi o con diabete mellito (analisi tramite Integrity software, Thomson Reuters).

Crediamo che il monitoraggio del rapporto PKC $\epsilon$ /IR ed in generale dei livelli di PKC $\epsilon$  nei linfociti del sangue periferico possa rappresentare una indagine scarsamente invasiva dell'assetto molecolare in soggetti obesi e con DT2, potendo riflettere le alterazioni del quadro trascrizionale esistenti nel tessuto adiposo, fegato, pancreas e nel tessuto muscolare scheletrico.

## Bibliografia

- Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2004; 23: 447-56.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116: 1793-801.
- Kintscher U, Hartge M, Hess K, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1304-10.
- Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 2009; 15: 930-9.
- Pedersen O. Genetics of insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107: 113-8.
- Sesti G, Federici M, Lauro D, et al. Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17: 363-73.
- Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 2006; 55: S9-S15.
- Andreassi MG. Metabolic syndrome, diabetes and atherosclerosis: influence of gene-environment interaction. *Mutat Res* 2009; 667: 35-43.
- Considine RV, Nyce MR, Allen LE et al. Protein kinase C is increased in the liver of humans and rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus: an alteration not due to hyperglycemia. *J Clin Invest* 1995; 95: 2938-44.
- Shafir E, Ziv E, Mosthaf L. Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 892: 223-46.
- Ikeda Y, Olsen GS, Ziv E, et al. Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in *Psammomys obesus*: overexpression of protein kinase Cepsilon in skeletal muscle precedes the onset of hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Diabetes* 2001; 50: 584-92.
- Schmitz-Peiffer C, Laybutt DR, Burchfield JG, et al. Inhibition of PKCepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance. *Cell Metab* 2007; 6: 320-8.
- Samuel VT, Liu ZX, Wang A, et al. Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 739-45.
- Basu A, Sivaprasad U. Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision. *Cell Signal* 2007; 19: 1633-42.
- Schmitz-Peiffer C, Biden TJ. Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 1774-83.
- Dey D, Bhattacharya A, Roy S, Bhattacharya S. Fatty acid represses insulin receptor gene expression by impairing HMGA1 through protein kinase Cepsilon. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 474-9.
- Stentz FB, Kitabchi AE. Hyperglycemia-induced activation of human T-lymphocytes with de novo emergence of insulin receptors and generation of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 491-5.
- Mirandola P, Gobbi G, Maselli E, et al. Protein kinase Cepsilon regulates proliferation and cell sensitivity to TGF-1beta of CD4+ T-lymphocytes: implications for Hashimoto thyroiditis. *J Immunol* 2011; 187: 4721-32.
- Gobbi G, Mirandola P, Sponzilli I, et al. Timing and expression level of protein kinase C epsilon regulate the megakaryocytic differentiation of human CD34 cells. *Stem Cells* 2007; 25: 2322-9.
- Gobbi G, Ricci F, Malinverno C, et al. Hydrogen sulfide impairs keratinocyte cell growth and adhesion inhibiting mitogen-activated protein kinase signaling. *Lab Invest* 2009; 89: 994-1006.
- Gobbi G, Mirandola P, Carubbi C, et al. Phorbol ester-induced PKCepsilon down-modulation sensitizes AML cells to TRAIL-induced apoptosis and cell differentiation. *Blood* 2009; 113: 3080-7.
- Winer S, Chan Y, Paltser G, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 2009; 15: 921-9.
- Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339: 229-34.
- Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-52.
- Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005; 96: 939-49.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115: 1111-9.