

**GUSTAVO JORGE DOS SANTOS**

**Memória Metabólica de células  $\beta$ -pancreática controla a  
secreção de insulina e é mediada pela CaMKII.**

**Metabolic memory of pancreatic  $\beta$ -cell controls insulin secretion and is mediated by CaMKII**

**Campinas, 2014**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**GUSTAVO JORGE DOS SANTOS**

**Memória Metabólica de células  $\beta$ -pancreática controla a  
secreção de insulina e é mediada pela CaMKII.**

**Metabolic memory of pancreatic  $\beta$ -cell controls insulin secretion and is mediated by CaMKII**

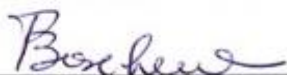
Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia.

Thesis presented to the Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in the area of Functional and Molecular Biology - Physiology.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschiero

Co-orientador: Dr. Luiz Fernando de Rezende

Este exemplar corresponde à Versão Final da Tese defendida pelo aluno Gustavo Jorge dos Santos e orientado pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Boschiero.

  
\_\_\_\_\_

Campinas, 2014

Ficha catalográfica  
 Universidade Estadual de Campinas  
 Biblioteca do Instituto de Biologia  
 Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Sa59m Santos, Gustavo Jorge, 1986-  
 Memória metabólica de células  $\beta$ -pancreática controla a secreção de insulina e é mediada pela CaMKII / Gustavo Jorge dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2014.

Orientador: Antonio Carlos Boschiero.  
 Coorientador: Luiz Fernando de Rezende.  
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

I. Memória. 2. Insulina - Secreção. 3. Cálcio. 4. Proteína quinase tipo 2 dependente de cálcio-calmodulina. 5. Sinalização do cálcio. I. Boschiero, Antonio Carlos, 1943-. II. Rezende, Luiz Fernando de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Metabolic memory of pancreatic  $\beta$ -cell controls insulin secretion and is mediated by CaMKII

**Palavras-chave em inglês:**

Memory

Insulin - secretion

Calcium

Calcium-calmodulin-dependent protein kinase type 2

Calcium signalling

**Área de concentração:** Fisiologia

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Antonio Carlos Boschiero [Orientador]

Rosane Aparecida Ribeiro

Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Leonardo dos Reis Silveira

Carmen Ferreira Veríssima Halder

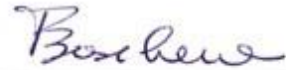
**Data de defesa:** 28-03-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 28 de março de 2014

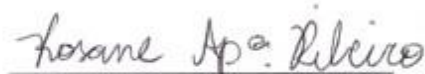
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Boschiero (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Rosane Aparecida Ribeiro



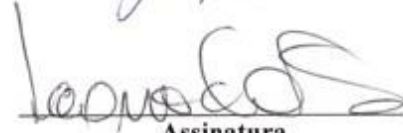
Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira



Assinatura

Profa. Dra. Carmen Ferreira Verissima Halder



Assinatura

Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Rebelato Lopes de Oliveira

Assinatura

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

Assinatura



## RESUMO

**Introdução:** A Cálcio-Calmodulina quinase II (CaMKII) atua tanto na regulação da secreção de insulina com de neurotransmissores pela mesma via de sinalização. Além disso, a CaMKII é conhecida por ser a “molécula da memória”, pois sua atividade é fundamental em sua formação. Portanto, hipotetizamos que células  $\beta$  pancreática tem a capacidade de adquirir e estocar informações contidas em pulsos de cálcio, formando uma memória metabólica. **Métodos:** Para comprovar nossa hipótese, desenvolvemos um novo paradigma de exposição de células  $\beta$  a pulsos de 30 mM de glicose, seguido de uma período de consolidação (24 hrs) para excluir qualquer efeito agudo do metabolismo da glicose. Após esse período analisamos a secreção de insulina (RIA), expressão proteica (Western blot), a resposta secretória frente a uma “rampa de glicose” e o  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático induzido por glicose. **Resultados:** Células  $\beta$  expostas a pulsos de glicose (30 mM) mostraram maior secreção de insulina estimulada por glicose, evidenciando a memória metabólica a qual foi totalmente dependente a CaMKII. Esse fenômeno foi refletido na expressão proteica de proteínas importantes na sinalização do cálcio e na secreção de insulina. Além disso, células expostas ao regime de pulsos de glicose apresentaram maior expressão do MAFA, um fator de transcrição chave para a função da célula  $\beta$ . **Conclusão:** Em suma, assim como neurônios, células  $\beta$  tumorais (MIN6), ilhotas de camundongos e de humanos são capazes de adquirir, estocar e evocar informações.





## ABSTRACT

**Background:**  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) functions both in regulation of insulin secretion and neurotransmitter release through common downstream mediators. Memory is the ability to acquire, to store and to evocate any kind of information. In CNS, the process behind this phenomenon in the Long-Term Potentiation (LTP) and is known that it requires  $\text{Ca}^{2+}$  to occur. In additional, CaMKII is necessary to store information during LTP. In pancreatic  $\beta$ -cells, CaMKII plays pivotal role during GSIS process. Therefore, we hypothesized that pancreatic  $\beta$ -cells acquire and store the information contained in  $\text{Ca}^{2+}$  pulses as a form of “metabolic memory”, just as neurons store cognitive information. **Methods:** To test this hypothesis, we developed a novel paradigm of pulsed exposure of mice and human  $\beta$ -cells to intervals of high glucose, followed by a 24-hour consolidation period to eliminate any acute metabolic effects. After this period, we analyzed insulin secretion (by RIA), protein expression (by Western blot), response to a glucose-ramp and the glucose-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx. **Results:** Strikingly,  $\beta$ -cells exposed to this high-glucose pulse paradigm exhibited significantly stronger insulin secretion. This metabolic memory was entirely dependent on CaMKII. We also observed, in pulse group, an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  influx induced by glucose. In additional, metabolic memory was reflected on the protein level by increased expression of proteins involved in GSIS and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent vesicle secretion, such as GCK, Cav1.2, SNAP25, pCaMKII and pSynapsin. Finally, we observed in human islet elevated levels of the key  $\beta$  cell transcription factor MAFA. **Discussion:** Based on our findings we conclude that pancreatic  $\beta$  cells, either from mice or humans, have the ability to acquire, store and retrieve information. This process is CaMKII-dependent and is due to modifications in the glucose-sensing machinery of the cell, since we observed an increase in GSIS and  $\text{Ca}^{2+}$  influx together with an increase in several proteins involved in this process. Our findings suggests that MAFA is the key effector in this memory, since (a) it is a potent activator of insulin gene, (b) is activated by CaMKII and (c) its expression is increased even 24 hours after the last pulse. **Conclusion:** In summary, like neurons, human and mouse  $\beta$ -cells are able to acquire and retrieve information.



**SUMÁRIO**

Agradecimentos.....	xv
Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Tabela.....	xix
Lista de abreviaturas.....	xxi
Introdução.....	26
A CaMKII. ....	27
Mecanismos de Ação da CaMKII.....	27
CaMKII e a formação de memória.....	28
A secreção de Insulina e a CaMKII.....	30
Justificativa/Objetivos.....	32
Metodologia.....	34
Artigo.....	43
Considerações Finais.....	69
Conclusão.....	73
Referências.....	75



**Dedico ao meu amor Raquel  
e aos meus pais e avós.**



*“Não se esqueça que todos nós nascemos com asa e, portanto, voar não é destino. É opção. Agora que você descobriu que tem asas, voe e, apesar das quedas, não tenha medo de ser feliz.”*

Prof. Dr. José A. Garcia Sanches





## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, não apenas pelo conhecimento produzido, mas também por todo significado que essa conquista exprime: a realização de um sonho. Assim, agradeço primeiramente a Deus, clichê ou não, pelas oportunidades que me foram dadas. Agradeço ao Professor Boschero, não só pela brilhante orientação durante todo esse período de pós-graduação, mas principalmente pela convivência e pela ajuda concedida. Agradeço à Raquel, companheira e confidente, por simplesmente me ajudar em tudo o que precisei. Sem ela, seria muito mais difícil. Agradeço aos meus pais, Sergio e Marcia, por estarem sempre ao meu lado, dando-me suporte. Agradeço a eles e aos meus avós pela educação que foi me dada, pelo caráter que me foi formado e pelo amor correspondido. Agradeço aos meus irmãos, Paula e Pedro, e aos familiares que sempre torceram pelo meu sucesso. Obrigado aos meus queridos Isidor, Marisa e Dona Ilda por tudo o que fizeram, pelo apoio dado no decorrer desse tempo. Acreditem, seria muito mais difícil realizar esse trabalho sem vocês. Jamais esquecerei. Agradeço aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, em especial ao Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro, e à minha amiga Marise Carnelossi Brunelli, por sempre estar pronta para me ajudar e ser um grande exemplo de pessoa. Ao Luiz F. Rezende, não posso deixar de agradecer o auxílio em meus primeiros passos no laboratório e durante a confecção do Projeto que originou esta Tese. Agradeço, e muito, aos amigos de Laboratório, José Maria, André, Junia, Mirian, Tarlliza, Flávia, Jane, Jean, Priscila, Helena Barbosa, Emeriele, Cláudio, Ricardo, Thiago B., Luciana e Roberta pela convivência, pela ajuda diária e pelos cafezinhos. Em especial, agradeço muito a duas grandes amigas Sandra M. Ferreira e Fernanda Ortis, que sempre estiveram por perto me dando assistência, técnica ou não, tornando as coisas mais fáceis. Aos membros da banca do exame de qualificação, obrigado pelas sugestões e críticas ao trabalho. Aos membros da banca examinadora, obrigado por nos honrarem com suas participações e pelas contribuições essenciais ao resultado final desta tese. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao CNPq agradeço pelo auxílio financeiro. Finalmente, agradeço ao Prof. Dr. Klaus H. Kaestner pela imensa contribuição para essa Tese, com sua ajuda, quase que diária, durante o estágio em seu Laboratório (Genética Funcional) na University of Pennsylvania, Philadelphia EUA.



## LISTA DE FIGURAS

Figura M1 – Desenho experimental realizado em células MIN6 e ilhotas pancreáticas de camundongos Swiss.....	35
Figura M2 – Desenho experimental realizado em ilhotas pancreáticas Humanas.....	36
Figura 1 – Insulin-secreting cells acquire, store and retrieve information.....	59
Figura 2 – Pancreatic islets of mice acquire, store, and retrieve information.....	60
Figura 3 – Human pancreatic $\beta$ -cells exhibits metabolic memory.....	61
Figura 4 – Metabolic memory is related in expression changes of key players in insulin secretion.....	62
Figura 5 – Graph of the LTP in pancreatic $\beta$ -cell induced by Pulses of Glucose.....	63
Figura S1 – Experimental design for MIN6 cells and mice pancreatic islets.....	64
Figura S2 – Experimental design for human islets.....	64
Figura S3 – MIN6 insulin secretion correlates with acute CaMKII phosphorylation.....	65
Figura 6 – Anexo 03: Teste da funcionalidade do inibidor KN93.....	83
Figura 7 – Anexo 04: Análise da expressão gênica de ilhotas de camundongos expostas ao paradigma de pulso de glicose.....	85



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 01 - Anexo 01: Descrição clínica dos cadáveres doadores das ilhotas humanas.....	79
Tabela 02 – Anexo 02: Lista das sequências dos <i>primers</i> utilizados para a análise da expressão gênica em ilhotas de camundongos.....	81



**LISTA DE ABREVIATURAS**

CaBPs – Calcium binding proteins  
CaM – Calmodulina  
CaMK – Kinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina  
CaMKI – Kinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina I  
CaMKII – Kinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina II  
CaMKIV – Kinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina IV  
pCaMKII - Kinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina fosforilada  
SNC – Sistema Nervoso Central  
LTP – Long Term Potentiation  
NMDA – n-metil-D-aspartato  
GLUT-2 – Transportador de Glicose 2  
GCK – Glicoquinase  
AC – Adenilato ciclase  
AMPC – Adenosina monofosfato cíclico  
PKA – Proteína kinase A  
PLC – Fosfolipase C  
IP<sub>3</sub> - Inositol 3-fosfato  
DAG – Diacilglicerol  
SNAREs - Soluble NSF Attachment Receptor  
NGFs – Fatores de Crescimento neuronal  
NT – Neurotransmissores  
AMPK – Kinase ativada por AMP  
FBS – Soro Fetal Bovino  
KRBB- Krebs-ring Bicarbonate Buffer  
RIA – Radioimuno ensaio  
CRML – Connaught Medical Research Laboratories  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
FOXA1 – Forkhead Box Protein A1  
FOXA2 – Forkhead Box Protein A2

GSIS – Secreção de Insulina Estimulada por Glicose

PDX1 – Pancreatic and duodenal homeobox 1

SNAP25 – Synaptosomal-associated protein 25

$[Ca^{2+}]_i$  – Concentrações intracelular de Cálcio



# INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

O íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) atua como mediador da sinalização celular em todas as células eucarióticas [1], regulando diversas funções como proliferação [2], expressão gênica [3, 4] e exocitose [5]. Normalmente, a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , é cerca de  $10^4$  vezes menor que a concentração extracelular [6]. A via de sinalização do cálcio deve estar extremamente afinada para que a célula responda de maneira eficiente às rápidas e transientes variações das concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . O papel central na transmissão e amplificação do sinal desse íon é desempenhado pelas proteínas da família *Ca<sup>2+</sup> Binding Proteins (CaBPs)*. Como resposta às variações de  $\text{Ca}^{2+}$ , essas proteínas sofrem mudanças conformacionais, alterando sua atividade e permitindo a transmissão do sinal. A calmodulina (CaM) é a principal proteína representante das CaBPs [7].

A calmodulina é uma proteína de baixo peso molecular (16Kd) altamente conservada nos eucariotos que amplifica o sinal do  $\text{Ca}^{2+}$  para toda célula [8]. Quando ligada ao  $\text{Ca}^{2+}$  tem sua estrutura modificada, formando o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , podendo assim desempenhar sua função de ativar/desativar proteínas alvos [8-10]. Para amplificar o sinal gerado pelo cálcio, o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  ativa/desativa vias de fosforilação, e seu principal alvo são proteínas quinase dependentes de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Calmodulina}$  (CaMK) [8].

Muitas das respostas celulares ao sinal do cálcio são induzidas ou moduladas pelas por proteínas da família das CaMK, sendo as principais a CaMKI, a CaMKII e a CaMKIV. Esses efetores transmitem e coordenam a dinâmica do segundo mensageiro  $\text{Ca}^{2+}$  e fosforilam proteínas *downstream*. Essa resposta, por sua vez, é conhecida por ser rápida, específica e reversível [11].

As proteínas da família CaMK apresentam, além de estruturas semelhantes, a capacidade de auto inibir sua atividade na ausência do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{calmodulina}$  [10, 12], fato que é extremamente importante para a compreensão do funcionamento dessas quinases. A CaMKII é ativada pela simples presença do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{Calmodulina}$ , enquanto a CaMKI e a CaMKIV precisam ser fosforiladas por uma CaMK quinase *upstream* [10, 11, 13].

A CaMKII é uma proteína quinase multifuncional que desempenha um papel essencial na transdução do sinal gerado pelo cálcio [14], e na coordenação de funções celulares essenciais, que vão desde ativação/desativação de canais iônicos à modulação de fatores de transcrição [15]. A CaMKII foi identificada inicialmente no Sistema Nervoso Central (SNC), onde representa 2% do total de proteína [6, 11]. Mais tarde foi descoberto que essa enzima está presente em diversos

tecidos, inclusive no pâncreas endócrino, onde desempenha importante papel na secreção de insulina.

### 1.1 – A CaMKII

A CaMKII é uma holoenzima formada por aproximadamente 10 subunidades [16-18]. Em eucariotos podemos encontrar quatro isoformas diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), sendo que a subunidade  $\alpha$  e a subunidade  $\beta$  são mais expressas, principalmente no SNC [11, 17]. Em células  $\beta$  pancreáticas, tanto a subunidade  $\beta$  quanto a  $\delta$  estão presentes [19].

Todas as subunidades da holoenzima possuem um domínio catalítico, um domínio regulatório e um domínio de associação com as outras subunidades [17].

O domínio catalítico possui sítio de ligação a ATP e ao substrato, sendo assim responsável pela função quinase da proteína. No domínio regulatório encontram-se os sítios de autofosforilação que inibem, ativam ou mantêm ativada a proteína. Além disso, o sítio de ligação com o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina também está localizado no domínio regulatório, enquanto o domínio de associação tem a função de manter as subunidades unidas em uma conformação espacial que propiciará uma atividade enzimática efetiva [11, 17, 18, 20, 21].

### 1.2 – Mecanismos de ativação e inativação da CaMKII

Em concentrações basais de  $\text{Ca}^{2+}$  a atividade da CaMKII está inibida graças à habilidade de autoinibição da proteína na ausência do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, visto que quando esse complexo não está presente a conformação espacial faz com que o sítio de ativação da enzima fique inacessível. No momento em que os níveis intracelulares de cálcio são elevados ocorre a formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, e esse complexo, num sistema de dobradiça, expõe o sítio catalítico [6, 16, 22]. Além disso, esse mecanismo proporciona a exposição de um resíduo de treonina comum a todas as isoformas (na isoformas  $\alpha$  Thr286) que, quando exposto, é autofosforilado por uma subunidade adjacente localizado na mesma holoenzima. Essa autofosforilação mantém a conformação ativa da proteína, proporcionando uma atividade independente do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM e prolongando o

sinal gerado pelo  $\text{Ca}^{2+}$  [23, 24]. Esse processo é chamado de “*CaM trapping*”, e é a base para o mecanismo de aprendizado e memória [25-27].

Quando o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é elevado ou mantido por longos períodos a chance de duas subunidades vizinhas estarem em condições de autofosforilação é maior, e, conseqüentemente, a taxa de ativação (fosforilação) é maior que a taxa de inativação (desfosforilação). Esse processo é denominado Ativação Persistente por Potenciação de Longa Duração, e é responsável pela manutenção, em longo prazo, do sinal gerado pelo cálcio. [16, 18, 28]

Quando os níveis de cálcio começam a decair o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  se dissocia da quinase. Essa dissociação expõe outros sítios de autofosforilação (Thr 305/306), que quando ativados mantém a conformação ativa e impedem a ligação da enzima com outros complexos  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Nesse ponto, o sinal gerado pela CamKII é mantido (80% máx.), até que fosfatases, façam com que a enzima volte a sua conformação basal [29].

### **1.3 – CaMKII e a formação da memória**

Entende-se por memória a capacidade de um indivíduo em adquirir (aquisição) armazenar (consolidação) e recuperar (evocar) informações [30]. Um dos maiores desafios da Neurociência é descrever como o SNC consegue adquirir, consolidar e evocar informações. Por muito tempo os cientistas ficaram presos a aspectos anatômicos para explicar os mecanismos de aprendizado e memória, observando pacientes com lesões e traumas em regiões específicas do cérebro. Com o advento das novas técnicas moleculares e genéticas a Neurociência está mudando, se libertando das explicações estritamente anatômicas para a Memória Molecular [31].

Os mecanismos moleculares responsáveis pela formação da memória ainda não são totalmente conhecidos, porém muito se progrediu nessa área nos últimos 20 anos, graças à descoberta de um fenômeno fisiológico que ocorre no neurônio pós-sináptico denominado Potenciação de Longa Duração (Long-Term Potentiation ou LTP) [31, 32].

O LTP é definido como um aumento duradouro na eficácia da sinapse entre dois neurônios, decorrente de uma breve estimulação de alta frequência [33]. A LTP foi descrita primeiramente em 1966 por Tim Bliss e Terje Lomo em um estudo [34] sobre a capacidade do hipocampo em armazenar informações. Durante suas pesquisas, os cientistas descobriram que uma atividade elétrica de alta frequência aplicada artificialmente por um pequeno período em uma via hipocampal era capaz de aumentar a efetividade sináptica.

Muitas características fazem da LTP uma candidata a assumir a responsabilidade pelo processo de cognição e formação da memória, entre essas características destaca-se o fato do LTP ocorrer nas três principais vias de captação de informação no hipocampo, (a) a via perforante, (b) a via das fibras musgosas e (c) a via das colaterais de Schaffer; o LTP é induzido rapidamente e, depois de induzido, o LTP é estável e duradouro. Contudo, é necessário lembrar que mesmo o LTP tendo todas as características ideais de um processo de cognição não se consegue provar que este fenômeno é responsável pela formação da memória, apesar desse ainda ser o modelo mais aceito [31, 33].

Para que ocorra LTP, é necessário o influxo de cálcio no neurônio pós-sináptico e esse, por sua vez, requer que ocorram, de maneira sincronizada, dois processos: (1) a despolarização da membrana pós-sináptica e (2) a ligação do glutamato nos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) [35, 36].

Quando ocorre essa combinação de processos os receptores NMDA, que são receptores-canal iônico, se abrem e permitem a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula. O aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  em neurônios promove a ativação da CaMKII, conhecida por ser a “molécula da memória” [28, 37].

Como descrito previamente neste projeto, a propriedade da CaMKII em se autorregular faz dela um excelente sensor nas concentrações e oscilação intracelulares de cálcio, e é essa propriedade que faz com que essa proteína seja tão estudada na formação da memória [17, 31, 37].

A autofosforilação da CaMKII requer a ligação concomitante de complexos  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  em duas subunidades adjacentes. Com oscilações de pequena frequência esse complexo não fica disponível por muito tempo, diminuindo a probabilidade de autofosforilação [17], mas com o aumento da frequência das oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a probabilidade de ocorrer autofosforilação é aumentada, aumentando o número de subunidades ativas. Sucessivas oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  irão promover diferentes níveis de ativação da proteína CaMKII e esse fenômeno é o considerado o responsável pelo processo de formação da memória [31, 35, 37].

Corroboram com a hipótese de que a CaMKII é fundamental para a existência da LTP e, conseqüentemente da formação da memória, o fato de que animais *knock-out* para a enzima CaMKII tem déficit na aquisição de informação e prejuízo no aprendizado e na formação da memória [38].

#### 1.4 – Secreção de insulina e CamKII

A secreção de insulina pelas células  $\beta$  é controlada continuamente de acordo com as flutuações da concentração de nutrientes circulantes, em especial, a glicose [39, 40].

Os mecanismos responsáveis pela secreção de insulina estimulada pela glicose iniciam-se com o transporte deste açúcar pelas células  $\beta$  pancreáticas, através do transportador de glicose tipo 2 (GLUT 2); a glicose então é fosforilada à glicose-6-fosfato pela enzima glicoquinase (GCK) e metabolizada gerando ATP. O resultado é o aumento da relação ATP/ADP, que provoca o fechamento de um canal de  $K^+$  sensível ao ATP ( $K_{ATP}$ ), presente na membrana da célula  $\beta$ . A redução do efluxo de  $K^+$  das células leva à despolarização da membrana que, por sua vez, provoca a abertura de canais de  $Ca^{2+}$  sensíveis à voltagem, e influxo deste cátion [40, 41].

A metabolização da glicose nas células e a subsequente elevação da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) podem ativar enzimas que produzirão outros mensageiros intracelulares que contribuem para a amplificação do sinal iniciado pela glicose. Uma destas enzimas é a adenilatociclase (AC) que, ao clivar o ATP, produz adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA) [42, 43]. Além disso, a metabolização da glicose e o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  também estimulam a hidrólise de fosfoinosítídeos através da ativação da fosfolipase C (PLC) [44], resultando na formação do inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG), que induz a liberação de  $Ca^{2+}$  de estoques intracelulares e ativa a PKC, respectivamente. Portanto, aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  e ativação da PKA, PLC e PKC culminam com a potenciação dos mecanismos de excitação dos grânulos de insulina [45-47].

Desde 1979, com a descoberta da calmodulina como a principal CaBPS atuante na célula  $\beta$  pancreática, existem hipóteses de que a CaMKII é a principal responsável pela transdução do sinal modulado por  $Ca^{2+}$  na secreção de insulina [48]. Outras descobertas vieram a corroborar a hipótese de que a CaMKII é essencial para a secreção de insulina, como: (a) secretagogos da insulina aumentam a atividade da CaMKII, (b) a atividade de CaMKII espelha a secreção de insulina, (c) a ativação da CaMKII está relacionada temporalmente com a secreção de insulina em ilhotas de ratos perfundidos com glicose e (d) a ativação chega a níveis que tornam a enzima ativa independente de  $Ca^{2+}$  [48-50].

Além de regular processos metabólicos relacionados com a secreção de insulina, a CaMKII também atua na regulação da expressão gênica da insulina e de proteínas responsáveis pela sua secreção, como a glicoquinase e o GLUT-2 [48].

## **JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS**

Apesar de células endócrinas e neurônios apresentarem origem embrionária diferente (51), existem muitas características em comum entre esses dois tipos celulares. Dentre as várias células endócrinas que se assemelham a neurônios, podemos destacar as células  $\beta$  pancreáticas (52).

As células produtoras de insulina expressam diversas proteínas com função secretória presente nos neurônios, como as SNAREs, sinaptofisina, sinaptobrevina, SV2 e rab3A. Além disso, células  $\beta$  expressam receptores para diversos fatores de crescimento nervosos (NGFs) e apresentam resposta neurotípica a diversos fatores de diferenciação neuronais (48; 52).

A função da CaMKII na extrusão de grânulos, tanto de insulina quando de neurotransmissores (NT), já está bem estabelecida. Essa função pode ser exemplificada pelo fato da CaMKII fosforilar e ativar a proteína Sinapsina 1, responsável pela secreção de insulina e NT, sendo mais uma característica comum entre as células  $\beta$  e as células nervosas (48).

Como dito anteriormente, a CaMKII é fundamental para a secreção de insulina, desempenhando diversas funções, como formação dos grânulos de insulina, modulação do conteúdo de ATP via AMPK e ativação de proteínas SNAREs. Além disso, em neurônios pós-sinápticos, a CaMKII desempenha papel fundamental na gênese e manutenção da LTP, mecanismo básico para a cognição e formação da memória. Acredita-se que a principal característica que permite que a CaMKII tenha essa multifunção é o fato de que ela pode se autofosforilar, em diversos “estágios”, podendo até manter-se ativa com a queda dos níveis intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . É devido a capacidade de detectar variações nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e, dependendo da intensidade e duração desse sinal, manter-se ativa ao longo do tempo, que a CaMKII tem o poder de desempenhar diversas funções celulares, incluindo estocar informações.

Baseado no exposto, acreditamos que a CaMKII possa, em células  $\beta$ , desempenhar funções semelhantes àquelas da formação das LTP em neurônios. Em outras palavras, o objetivo deste trabalho foi investigar se células  $\beta$  pancreáticas (MIN6, murinas e humanas), a exemplo do que ocorre em neurônios, apresentam mecanismos moleculares de memória, decorrentes de exposição à alta glicose e, se esses processos eram dependentes de CaMKII.



## **METODOLOGIA**

## **CULTURA CELULAR**

Foram utilizadas células  $\beta$  produtoras de insulina da linhagem MIN6. Essas células foram mantidas em placas de cultura estéril (TPP, Trasadingen, Switzerland) contendo meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), acrescido de 11 mM de glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell, Campinas, Brasil), 100 U/ml de Penicilina (Sigma, St Louis, USA) e 100 ug/ml de Estreptomicina (Sigma, St. Louis, USA), em atmosfera umedecida contendo 5% CO<sub>2</sub>, à temperatura constante de 37°C.

## **ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS**

Os animais foram mortos por decapitação e, após incisão abdominal, o ducto pancreático foi exposto e obstruído para evitar a saída de solução de colagenase para o duodeno. Na porção distal do conduto biliar comum realizamos uma pequena incisão para introduzir uma agulha de insulina pela qual foi injetado no pâncreas 2 a 3 ml de solução de Hanks com colagenase tipo V (0,8 mg/ml; Sigma). Após o completo enchimento, o pâncreas foi retirado da cavidade abdominal por dissecação e transferido para um tubo de 15 ml o qual foi submergido em banho a 37°C durante 17 min. Ao final deste período realizamos uma pequena agitação de 30 segundos para facilitar a desagregação do tecido pancreático. A digestão do tecido foi interrompida mediante a adição de Hanks a 4°C. O material foi então centrifugado com solução de Hanks quatro vezes para a remoção da colagenase e enzimas digestivas liberadas durante a incubação. As ilhotas, completamente separadas do tecido acinar, foram coletadas uma a uma, sob lupa, por aspiração com o auxílio de pipeta Pasteur, previamente estirada e siliconizada.

## **GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Células MIN6 funcionais ou Ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos Swiss foram mantidas em placas de cultura estéril (TPP, Trasadingen, Switzerland) em meio RPMI suplementado com 5% de SFB e 5.6 mM de glicose por 18-24 horas. Após esse período foram separadas em três Grupos experimentais: (1) Controle (2) Pulso e (3) Pulso+KN93. O Grupo Controle foi incubado por 24 horas com meio RPMI suplementado com 5% de SFB e 3mM de Glicose. Já o Grupo Pulso recebeu 4 pulsos de 30mM de glicose (em meio RPMI contendo 5% de SFB) com duração de 1 hora e frequência de 7 horas, entre os Pulsos foi utilizado meio contendo 3mM de glicose. O Grupo Pulso+KN93 foi expostos aos 4 pulsos juntamente com 10 uM de KN93, um inibidor específico da atividade de CaMKII. Os protocolos experimentais estão esquematizados na Figura M1.

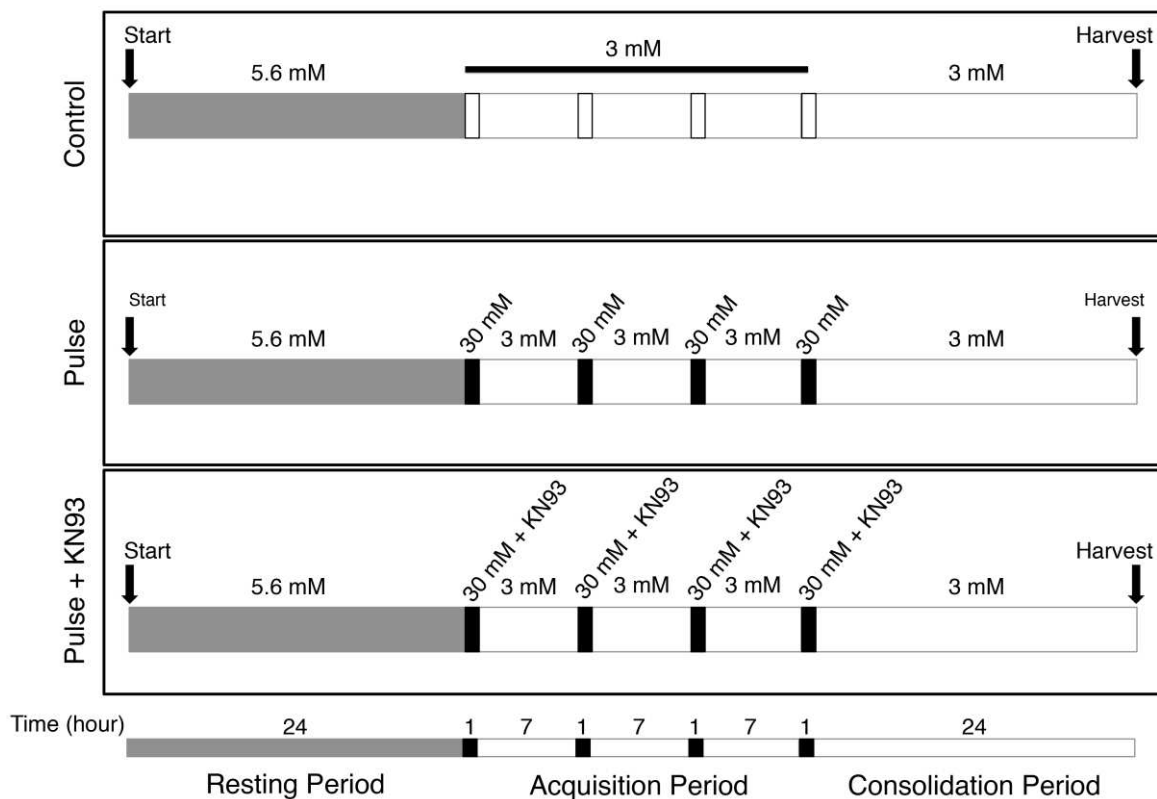


Figura M1 – Desenho experimental realizado em células MIN6 e ilhotas pancreáticas de Camundongos Swiss.

### SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA EM CÉLULAS MIN6

Células MIN6 tratadas com 3mM ou com pulsos de 30mM de glicose foram pré-incubadas com meio RMPI sem adição de SFB e glicose por 1 h. A seguir, o meio de pré-incubação foi descartado e as células foram incubadas por período complementar de 1 hora em tampão Krebs-bicarbonato (KRBB) com diferentes concentrações de glicose (2.8, 5.6, 8.4, 11.2 ou 16.7mM). Após incubação, uma parte do meio foi coletado e a insulina medida por RIA.

### SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS

Ilhotas pancreáticas Isoladas de camundongos Swiss com 50 a70 dias de vida dos diferentes Grupos foram incubadas por 1 hora em KRBB com diferentes concentrações de glicose (2.8, ou 16.7 mM). Após incubação, uma porção do meio foi coletado e a insulina medida por RIA.

## ILHOTAS PANCREÁTICA HUMANA

Experimentos com ilhota humana foram realizados nos Laboratório de Genética Funcional no Departamento de Diabetes, Obesidade e Metabolismo da University of Pennsylvania. As ilhotas humanas utilizadas nessa Tese foi fornecida pelos programas “*National Institutes of Health Integrated Islet Distribution Program*” e “*Islet transplantation Program of the University of Pennsylvania*”. Informações clínica dos doadores estão listadas no Anexo 01, Tabela 1. Após 70 a 100 minutos de *cold ischemia* as ilhotas humanas foram colocadas em cultura em meio CRML1066 por 6-48 horas. Após esse período, as ilhotas foram coletadas e divididas em 5 diferentes Grupos. O desenho experimental está esquematizado na Figura M2.

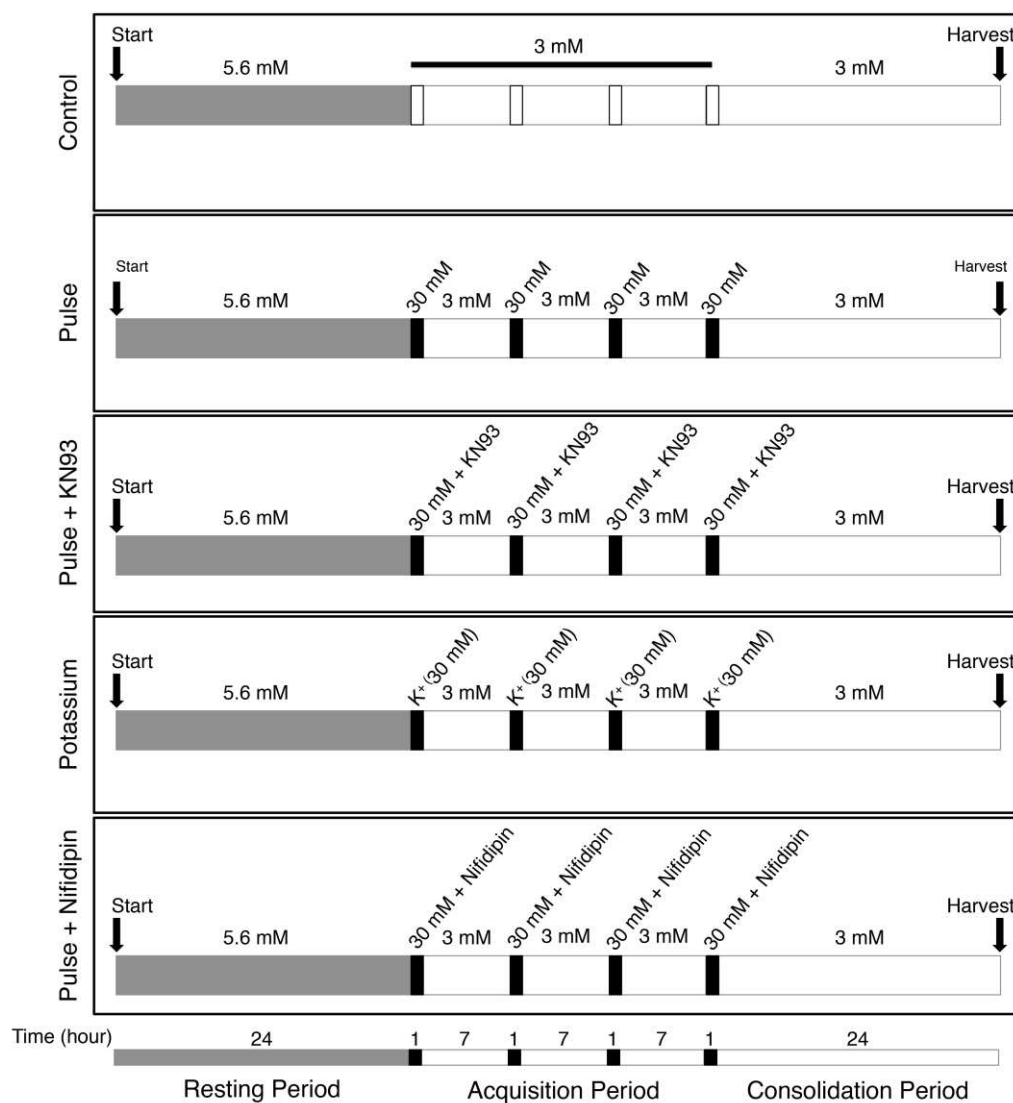


Figura M2 – Desenho experimental realizado em ilhotas pancreáticas Humanas.

### **PERFUSÃO DE ILHOTAS HUMANAS (GLUCOSE-RAMP)**

Um total de 150 ilhotas pancreáticas humanas dos diferentes Grupos foram coletadas e transferidas para uma câmara (Millipore, Billerica, MA, USA). Durante 80 minutos essas ilhotas foram expostas a um fluxo contínuo de KRBB com uma rampa de glucose de 0 até 30 mM com um aumento de 0.75 mM/min. Esse fluxo foi produzido por um Sistema de alta performance de HPLC, controlado por computador, (625 LC System, Waters Corporation, Huntingdon Valley, PA, USA) No final de cada experimento, a concentração de glicose no meio foi reduzida para 2.8 mM de glicose e, a seguir as ilhotas foram estimuladas com solução contendo 30mM de KCl. As amostras foram coletadas a uma taxa de 2 mL/min, e a insulina contida no meio medida por Radioimunoensaio (RIA) pelo núcleo TCL (Translational Core Laboratories) da University of Pennsylvania.

### **OSCILAÇÃO DE CÁLCIO CITOPLASMÁTICO INDUZIDO POR GLICOSE**

Ilhotas de camundongos dos diferentes Grupos foram incubados em tampão KRBB contendo 5.6 mM de glucose e 5 $\mu$ M de Fura-2/AM a 37 °C por uma hora. Após esse período, as ilhotas foram transferidas para uma câmara aberta, com temperatura controlada (37 °C), localizada sobre microscópio invertido (Nikon UK, Kingston, UK) e, perfundidas com KRBB na razão de 1.5 ml/min. As ilhotas foram perfundidas com KRBB contendo 2.8 (por 5 minutos) ou 16.8 mM (por 20 minutos) de glucose. As imagens foram capturadas a cada 3 segundos com câmera ORCA-100 CCD (Hamamatsu Photonics Iberica, Barcelona, Espanha), em conjunto com um Lambda-10-CS (Sutter Instrument Company, CA, USA), equipado com filtro de emissão em 340, 380 nm (Omega Optical, Stanmore, UK). Os resultados foram obtidos com o programa ImageMaster3 (Photon Technology International, NJ, USA).

### **ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA – REAL TIME RT-PCR**

O RNA total foi extraído de células MIN6 dos diferentes Grupos através da adição de 1 ml de Trizol® (GIBCO BRL - Life Technologies). As células foram homogeneizadas e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em cada amostra, 300  $\mu$ L de clorofórmio

foram adicionados e as amostras vigorosamente homogeneizadas durante 15 segundos. Após incubação de 3 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000g × 15 min a 4°C. O volume correspondente à fase aquosa foi transferido para outro tubo e o RNA precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol, seguido de incubação por 10 min à temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12.000 g × 15 min a 4°C foi realizada e os *pellets* obtidos foram lavados com 1 mL de etanol 75% e centrifugados a 7500g × 10 min a 4°C e, posteriormente, lavados com 1 mL de etanol 100%. O etanol foi descartado e o *pellet* parcialmente seco em estufa a 37°C. As amostras foram ressuspensas em 15 µL de água previamente tratada com DEPC. A integridade do RNA obtido foi verificada por eletroforese em gel de agarose denaturante, para visualização das unidades ribossomais 28S e 18S após coloração com brometo-de-etídeo, e a quantificação realizada através de leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm em aparelho *Genequant* (Pharmacia Biotech). A obtenção do cDNA foi realizado através de uma reação da transcriptase reversa realizada a 42° C durante 50 min, em 20 µL de uma mistura contendo 2 µg de RNA total + 10 mM de dNTP mix + 40 U/µl de inibidor de Rnase + 0,1 M de DTT + 5X first-strand buffer + 0,5 µg/ml de oligo dT + 200 U da enzima Super Script II RNase H Reverse Transcriptase (GIBCO BRL – Life Technologies). Para a análise da expressão do RNAm dos genes alvos realizamos uma reação de RT-PCR em tempo real, pelo método Syber Green Master Mix (Applied Biosystem), usando um fluoróforo que se liga somente a DNA dupla-fita. As reações foram realizadas usando o sistema de detecção DNA (StepOne – Real Time PCR Systems, Applied Biosystem). O volume total utilizado nas reações foi de 15 µl. Primeiramente, as amostras foram desnaturadas a 94°C por 2 min e em seguida passaram por 45 ciclos de PCR. Cada ciclo compreendeu as seguintes etapas em sequência: *Melting* a 94°C por 30 segundos, *annealing* 62-65°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. Cada amplificação por PCR foi feita em duplicata. Os parâmetros ideais para cada reação foram definidos empiricamente, e a pureza dos produtos de amplificação foi determinada pelas *melting curves*. Foi utilizado o gene β-actina como controle interno. Os *primers* utilizados na amplificação dos genes alvos estão descritos no Anexo 02, tabela 2.

## **DOSAGEM DE INSULINA**

A insulina contida nos meios de incubação (secreção estática) foi mensurada por RIA e, a curva padrão confeccionada com insulina de rato, de acordo com método já estabelecido em nosso laboratório.

## **ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA - WESTERN BLOT**

Para a expressão proteica células/ilhotas dos diferentes Grupos estudados foram homogeneizadas em solução-coquetel anti-protease, contendo: 100 mM de Tris pH 7,5; 10 mM de pirofosfato de sódio; 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA; 10 mM de Ortovanadato de sódio; 2 mM de PMSF; e 1% de Triton-X 100. Em seguida as amostras foram sonicadas, centrifugadas a 11000 rpm por 10 min. A quantificação protéica foi realizada por Bradford.

As amostras foram então incubadas à 100°C por 5 min em 30% do volume de Tampão de Laemmli 5x (Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%) contendo DTT. Para corrida eletroforética foi utilizado gel bifásico: gel de empilhamento (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 750 mM, pH 6.7) e gel de resolução (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 50 mM, pH 8.9). A corrida foi efetuada à 90V por aproximadamente 180min com Tampão de Corrida (Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18mM e SDS 0.4%), diluído 1:4. Após a corrida, as amostras foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (BioRad), processo realizado durante 120 min à 120V em gelo, banhada com Tampão de Transferência (Trisma base 25mM, glicina 192mM). Após transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de BSA em solução de TBS por 5h à 4°C. As proteínas Calmodulina, CaMKII total, pCaMKII e GAPDH foram detectadas na membrana de nitrocelulose por incubação por 5h, à temperatura ambiente, com anticorpo específico. Após a exposição ao anticorpo específico, a membrana foi incubada por 2h com o anticorpo policlonal anti-IgG (diluição 1:10000 em TBS com 2% de BSA). Passado este período, as membranas foram lavadas com TBS, incubadas por 2 min com reagentes de quimioluminescência (Pierce Biotechnology, USA), e revelada por quimioluminescência no equipamento ImageQuant LAS 4000 (General Electric, USA). A intensidade e quantificação das bandas foi avaliada por densitometria (Scion, Image,

Frederick, MD, USA), sendo os valores de densitometria das bandas normalizados pelos valores de densitometria da proteína GAPDH; em caso de análise de fosforilação proteica, os valores foram normalizados pela expressão total da respectiva proteína.

## **ENSAIO DE FOSFORILAÇÃO E IMUNOPRECIPITAÇÃO**

Células MIN6 do Grupo 3 mM ou do Grupo Pulso foram expostas por 1 hora ao meio RMPI sem a presença de SFB ou glicose. Após esse período, o meio foi trocado por outro similar, contendo diferentes concentrações de glicose (2.8, 5.6, 8.4, 11.2 16.8 mM). Esse meio de estímulo ficou em contato com as células por 5, 15, 30, 60 ou 90 minutos. As proteínas foram então extraídas com tampão de 8 M de ureia e com coquetel anti-protease contendo inibidores de fosfatases: Tris 100 mM, pH 7.5; Pirofosfato de sódio 10 mM; Fluoreto de sódio 100 mM; EDTA 10 mM; Ortovanadato de sódio 10 mM; PMSF 2 mM e Triton-X100 1%. As amostras foram *sonicadas* e centrifugadas a 11000 g por 15 min e a fosforilação das proteínas-alvo avaliada por Western blot.

Para avaliar associação entre a CaMKII fosforilada e a Calmodulina, as proteínas das células foram extraídas com tampão de extração para imunoprecipitados (EDTA 10 mM; Tris 100 mM pH 7.4; Pirofosfato de sódio 10 mM; Fluoreto de sódio 100 mM; Ortovanadato de sódio 10 mM; PMSF 2 mM; Aprotinina 0,1 mg/ml e Triton-X100 1%), *sonicadas* e centrifugadas a 11000 g por 15 min. Após a quantificação por Bradford, 500 µg de extrato protéico foi incubado com 1µg de anticorpo anti-phospho-CaMKII por 16-18 h (4°C) sob agitação. Os imuno-complexos foram recuperados pela incubação com solução de 50% proteína sefarose A por 2 h sob agitação (4°C), seguida de 3 lavagens em tampão contendo: Ortovanadato de sódio 2 mM; Tris 100 mM, pH 7.5; Triton-X100 0.5% para remoção das ligações inespecíficas. As associações foram analisadas por Western blot.

## **ANÁLISE DOS RESULTADOS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO**

Os dados estão expressos como média ± EPM, ou, quando adequado os resultados estão apresentados como % do controle. O programa Prism (GraphPad Inc., San Diego,



CA, USA) foi utilizado como software para auxílio dos cálculos estatísticos. Utilizamos os teste estatísticos t-Student ou ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni.

**ARTIGO**

METABOLIC MEMORY OF  $\beta$ -CELLS CONTROLS INSULIN SECRETION AND IS  
MEDIATED BY CAMKII

**Running title:** Metabolic Memory of  $\beta$ -cells.

**Authors:** Santos, Gustavo Jorge dos<sup>1-2</sup>; Ferreira, Sandra Mara<sup>1</sup>; Ortis, Fernanda<sup>1-3</sup>;  
Rezende, Luiz Fernando<sup>1</sup>; Chengyang, Li<sup>4</sup>; Ali, Naji<sup>4</sup>; Carneiro, Everardo Magalhães<sup>1</sup>;  
\*Kaestner, Klaus H<sup>2</sup>; \*Boschero, Antonio Carlos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, Campinas, SP, CEP 13083-865, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Genetics and Institute for Diabetes, Obesity and Metabolism, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA.

<sup>3</sup> Department of Cell and Developmental Biology, Biomedical and Biological Sciences Institute of the University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Surgery and Institute for Diabetes, Obesity and Metabolism, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA.

\*Kaestner, KH and Boschero AC contributed equally to the study.

Corresponding authors

Antonio Carlos Boschero. Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, Campinas, SP, CEP 13083-865, Brazil. E-mail: [boschero@unicamp.br](mailto:boschero@unicamp.br); Phone: +55-19-3521-6198

Klaus H. Kaestner. Department of Genetics and Institute for Diabetes, Obesity and Metabolism, University of Pennsylvania School of Medicine, 12-126 Translational Research Center, 3400 Civic Center Boulevard, Philadelphia, PA 19104, USA. E-mail: [kaestner@mail.med.upenn.edu](mailto:kaestner@mail.med.upenn.edu); Phone: +1-215-898-8712

**Keywords:** CaMKII, Human Islets, Insulin Secretion, Metabolic Memory.

## ABSTRACT

Calcium-Calmodulin kinase II (CaMKII) is an enzyme activated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex. CaMKII is known to transmit the Ca<sup>2+</sup> signal into the cell and to regulate important cellular process. In neurons, it is crucial for the generation of a process named Long-Term Potentiation (LTP), responsible for memory formation. This enzyme is also important for the process of neurotransmitters and hormones release. In this regard, it is already known that CaMKII play critical role in glucose-induced insulin secretion (GSIS). Moreover, CaMKII controls important transcriptional factors in pancreas, such as CREB and MAFA. Since CaMKII acts in both neuron and  $\beta$ -cell and these two cell types share many characteristic we investigated if insulin-secreting cells, are able to generate memory. For this propose we create a paradigm where memory where evident and we observed that human islet, as well as mice islet and MIN6 cells present memory, a process like LTP. In addition we observed that this process might occur through MAFA pathway.

## INTRODUCTION

Ionic Calcium (Ca<sup>2+</sup>) controls multiple cellular signaling processes in all eukaryotic cells, such as proliferation, gene expression, and exocytosis. Ca<sup>2+</sup>-binding proteins (CaBPs), such as calmodulin (CaM), play a pivotal role in Ca<sup>2+</sup> signal transmission and amplification. Increases in the concentration of intracellular Ca<sup>2+</sup> activate specific CaBPs targets among which the Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase II (CaMKII) is a critical signal mediator (1).

CaMKII is a holoenzyme composed by 10-12 subunits and present in four different isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (2). Catalytic and regulatory domains are critical to CaMKII function (3). Catalytic domain contains the ATP binding-site, essential for the kinase activity. The regulatory domain possesses an autophosphorylation site that can inhibit, active or maintain kinase activity. In addition, the Ca<sup>2+</sup>/CaM-complex binding site is located in the catalytic domain, directly controlling kinase activity.

In response to an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations, a Thr-286 of CaMKII becomes exposed and phosphorylated in a intraholoenzyme reaction (3). The coupling of

the  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin complex to one CaMKII subunit allows for the autophosphorylation of an adjacent subunit at Thr<sup>286</sup>. This process, known as "CaM trapping", confers a  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-independent kinase activity to the complex and thus prolongs the  $\text{Ca}^{2+}$  signal. This CaM trapping therefore represents a molecular mechanism of memory (4; 5), which is defined as the capacity to acquire, store (consolidate), and retrieve (evocate) information (6).

Detailed mechanism behind cognitive is unclear; however, a process termed Long-Term Potentiation (LTP) that occurs in postsynaptic neurons contributes to memory formation (5; 7). The "CaM trapping" process allows CaMKII to remain activated long after the initial  $\text{Ca}^{2+}$  signaling has been dissipated, suggesting that CaMKII is a memory molecule crucial for the LTP process (5; 6). Consistent with this notion CaMKII knockout mice present impaired cognition and memory formation (3). In postsynaptic neurons, CaMKII plays an essential role in the genesis and maintenance of the LTP process. Following presynaptic stimulation, CaMKII is activated in the postsynaptic neuron which creates a physiological imprint of the initial  $\text{Ca}^{2+}$  signal, and increases the translocation of the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) to the plasma membrane (2). Because of its capacity to remain activated long after the initial pulse of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, CaMKII perpetuates the  $\text{Ca}^{2+}$  effects and modulates the gene expression and the epigenetic profile of the postsynaptic neuron (8).

Insulin-producing cells and neurons express many genes in common that encodes proteins controlling granule formation and secretion, such as SNARE, synaptophysin, and synaptobrevin, and even many transcriptional regulators are expressed in common in this two cell-types. In fact, CaMKII functions both in regulation of insulin secretion and neurotransmitter release presents several common downstream mediator points, such as the activation of Synapsin I (9).

CaMKII also participates in glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) (10). The role of CaMKII in this process is substantiated by the ability of multiple insulin secretagogues to increase CaMKII activity. In the perfused rat pancreas, the dynamics of the CaMKII activity reflect the GSIS, and the CaMKII activation is temporally associated with insulin secretion (10). CaMKII is essential for appropriate GSIS and is involved in several steps of this process, including the synthesis of insulin granules, the modulation of cytoplasmic

content of ATP, and the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), Soluble NSF Attachments Receptor (SNAREs), Synapsin and Ryonodine Receptor 2 (10). Importantly, CaMKII also regulates transcription factors central for  $\beta$ -cell function: cAMP Responsive Element-Binding protein (CREB) – important genetic profile in both pancreatic  $\beta$ -cells and neurons (11) – and v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A (mafA) – important for the insulin gene transcription and maturation of  $\beta$ -cell (12; 13).

The present study investigated whether pancreatic  $\beta$ -cells, like neurons, acquire and store the information contained in calcium pulses in a form of “metabolic memory”. Indeed, we discovered that  $\beta$ -cells retain memory of prior activation, and investigate the molecular mechanism through which this occurs.

## METHODS

*Reagents.* RPMI-1640 medium and the specific CaMKII-inhibitor KN93 were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). CRML 1066 medium was purchased from Fisher Scientific. Primary antibodies anti-phospho CaMKII<sup>Thr286</sup> (#3361), anti-CaMKII (#4430), and anti-SNAP25 (#5308) were purchased from Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA), anti-GLK (ab88056) was purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA), anti-Ca<sup>2+</sup><sub>v</sub>2.1 from Milipore (Billerica, MA, USA), and anti-GAPDH from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TE, USA). Secondary anti-rabbit and anti-mouse IgG-antibodies were acquired from Cell Signaling Technology.

*Cell Culture.* MIN6 insulin-producing cells were cultured (14) plated and distributed in to three groups: Control, Pulse, and Pulse+KN93. Initially, all groups were maintained in the same medium with 5.6 mM of glucose for 24 h. After this acclimation period, the control group was exposed to 3 mM glucose for 24 h, while the Pulse and Pulse+KN93 groups were exposed to 30 mM of glucose for four one-hour periods intercalated with seven-hour periods of 3 mM glucose. KN93 was only present during the 30 mM glucose pulses. All groups were then maintained at 3 mM glucose for a 24-h consolidation period. Then, insulin secretion was determined and cells harvested for Western blots analysis (Fig. S1).

*Mouse islet isolation:* Mice were obtained from the central animal handling facility at the State University of Campinas, Brazil, and kept in individual cages with *ad libitum* access to food and water in a 12/12-h light/dark cycle. When the mice were 55-65 days old, they were euthanized in a CO<sub>2</sub>-saturated atmosphere, and pancreatic islets isolated by collagenase method and maintained in culture for 24 hours in a RPMI medium with 10% FBS, penicillin, and streptomycin under humidified atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The experimental design for pancreatic islet was performed as described for MIN6 cells above (Fig. S1).

*Human Islet:* the National Institutes of Health Integrated Islet Distribution Program and the Islet transplantation Program of the University of Pennsylvania provided human islets from normal donors. Clinical information regarding these samples is listed in the electronic supplementary material (ESM) Table 1. Islets were collected after 100 to 700 minutes of cold ischemia and cultured in CRML1066 medium for 6 to 48 hours prior to overnight shipment. Then, the islets were divided into 5 different groups, as described in Fig. S2.

*Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations.* Cultured mouse pancreatic islets were incubated in Krebs buffer plus 5.6 mmol/l of glucose and 5 µmol/l Fura-2/AM at 37 °C for one hour. After, islets were then transferred to a thermostatically regulated open chamber (37 °C), placed on the stage of an inverted microscope (Nikon UK, Kingston, UK), and perfused with KRBB at a flow rate of 1.5 ml/min. Islets were then perfused with Krebs buffer containing 2.8 mM or 16.7 mM of glucose. A ratio image was acquired at approximately every 3 seconds with an ORCA-100 CCD camera (Hamamatsu Photonics Iberica, Barcelona, Spain), in conjunction with a Lambda-10-CS dual-filter wheel (Sutter Instrument Company, CA, USA), equipped with 340, 380 nm bandpass filters and a range of neutral-density filters (Omega Opticals, Stanmore, UK). Data were obtained using the ImageMaster3 software (Photon Technology International, NJ, USA).

*Insulin secretion assays.* Insulin secretion of MIN6 cells (15) and mice pancreatic islet (16) experiments were conducted following standard procedures, and insulin was measured by RIA. A bunch of 10-15 human islets each were handpicked under a light microscope and pre-incubated for 1 hour in Krebs-ring bicarbonate buffer solution (KRBB) containing 0.3

g/l BSA and 2.8 mM glucose. The media was discarded and the islets were incubated for an additional hour in 500 ul KRBB containing 2.8 or 16.8 mM glucose. The supernatant was subsequently collected to evaluate insulin secretion. Translational Core Laboratories (TCL), a core of Perlman Medicine School of University of Pennsylvania, measured secreted insulin by RIA.

*Human Islet perfusion.* A total of 150 treated human islets were handpicked under a light microscope and placed into a perfusion chamber (Millipore, Billerica, MA, USA). A computer-controlled fast-performance HPLC system (625 LC System, Waters Corporation, Huntingdon Valley, PA, USA) allowed programmable rates of flow and concentrations of the appropriate solutions held in a 37°C water bath. Islets were perfused for 80 minutes with Krebs bicarbonate buffer (2.2 mmol/l Ca<sup>2+</sup>, 0.25%, wt/vol., BSA, 10 mmol/l HEPES and 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> equilibration [pH 7.35]) in the absence of glucose followed by the Krebs buffer with increasing concentration of glucose ramp from 0 to 30 mM at 0.75 mM/min. At the end of each experiment, islets were tested for the maximum insulin secretion by adding 30 mM KCl in the perfusate (17; 18). Samples were collected at 2ml/min. Insulin content was determined using RIA by Translational Core Laboratories (TCL), a core of Perlman Medicine School of University of Pennsylvania.

*Immunoprecipitation.* The immunoprecipitation assay was performed following standard procedures (19).

*Western Blot.* Protein concentration was determined by the Bradford method using bovine serum albumin (BSA) as standard. For MIN6 cells and mouse islets the Western blots were conducted following standard procedures (14). For Human Islets, 50-70 µg of the lysate was boiled in LDS Sample Buffer (NuPAGE®, Life Technologies), applied to NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel, and transferred to nitrocellulose membranes using the iBLOT® system. Membranes were blocked in TBS 0.1% Tween-20, containing 50% (vol./vol.) of BSA 10% for one hour at room temperature. Membranes were then incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. Detection was performed using the Amersham-ECL Prime Western Blotting detection reagent (GE Healthcare) after incubation with a horseradish



peroxidase-linked secondary antibody (GE Healthcare). Band intensities were quantified by optical densitometry (Image J) of the developed autoradiogram.

Pathway graphs, the panels in the Figure 5 were designed using the on line Pathway Builder in <http://www.proteinlounge.com>.

*Statistics:* Data expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed using Student's t-test or a two-way ANOVA with a Bonferroni's posttest, as required. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### *1. Insulin-secreting cells acquire, store and retrieve information*

In order to be able to address the issue of metabolic memory of insulin-producing  $\beta$ -cell, we first had to develop a robust paradigm in which such memory was evident. We found that exposure of cultured  $\beta$ -cell to four one hour pulses of high glucose, interspersed with 7-hour intervals of low glucose and thus mimicking postprandial glucose spikes *in vivo*, were able to elicit metabolic memory. The detailed experimental paradigm is outlined in Fig. S1.

As shown in figure 1A,  $\beta$ -cells exposed to the glucose pulse regime, showed higher insulin secretion both when exposed to low (2.8 mM) or higher (16.8 mM) glucose than  $\beta$ -cells which had been cultured continuously at low glucose. This increase in insulin secretion was accompanied by a significant rise in the levels of phosphorylated CaMKII, consistent with the notion that CaMKII might be a molecular mediator of this metabolic memory (Fig. 1B/C). Importantly, both the increase in basal and stimulated insulin secretion in the glucose pulse group were abolished by KN93 (Fig. 1A), a specific inhibitor of CaMKII activity. Next, we evaluated the kinetics of the MIN6  $\beta$ -cell response to acute glucose exposure, and observed that the pulse group secreted more insulin at basal (time zero) and stimulatory concentrations of glucose (16.7 mM) between 5 and 60 min. This effect even persisted after glucose concentrations were returned to 2.8 mM at 90 min (Fig. 1D). In parallel (0, 60 and 90 min), the phosphorylation of CaMKII was higher in the glucose

pulse group at both glucose concentrations, and remained elevated even after glucose concentrations was reduced to 2.8 mM (Fig. 1E).

### *2. Pancreatic islets of mice acquire, store, and retrieve information*

Next, we evaluated if metabolic memory was confirmed to MIN6 insulinoma cells, or if it is also a property of primary mouse  $\beta$ -cells. In Isolated pancreatic islets from Swiss mice, glucose pulse treatment also increased insulin secretion (Fig. 2A) and CaMKII phosphorylation (Fig. 2B) in basal and stimulatory glucose concentrations, and these effects were again abolished by the CaMKII inhibitor KN93 (Fig. 2A/B). Moreover, the glucose-induced increase in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  was significantly higher and achieved more rapidly in islets of the glucose pulse group, compared to controls (Fig. 2C-E). This increased  $\text{Ca}^{2+}$  response was partially reduced by the presence of KN93 (Fig. 2C-E).

### *3. Human pancreatic $\beta$ -cells exhibits metabolic memory*

Next, we extended our findings to primary human  $\beta$ -cells. Human islets from healthy donors were cultured and exposed to pulses of 30 mM of glucose, in the same paradigm as described above. Pulse treatment increased insulin secretion at basal (2.8 mM) and stimulatory (16.8 mM) glucose concentrations (Fig. 3A). As in mouse islet, the pulse group showed increased CaMKII phosphorylation at both basal and stimulatory glucose concentrations (Fig. 3B). Next, we determined the human islet response to a glucose challenge in the perfused islet assay. Islets from the glucose pulse group showed both increased first and second phase insulin secretion comparing with islets from the group control (Fig. 3C-E). As before, these effects were abolished by KN93 the CaMKII inhibitor. (Fig. 3A-E)

### *4. Metabolic memory is related in expression changes of key players in insulin secretion.*

To evaluate the molecular mechanism by which glucose pulse paradigm induces memory in insulin-secreting cells, we evaluated the expression of essential mediators of the insulin secretory response. The glucose pulse paradigm induced expression of Glicokinase (GCK), the glucose sensor of  $\beta$ -cell (Fig. 4A), voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel ( $\text{Ca}_v1.2$ ) (Fig. 4B), SNAP25, an essential component of exocytose machinery (Fig. 4C) and mafA, a key

transcription factor of the insulin gene and mature  $\beta$ -cell phenotype in general (Fig. 4D). All these effects on protein levels were abolished by treatment with KN93.

Next, we addressed the question to what extent the metabolic memory of  $\beta$ -cells exposed to the glucose pulse paradigm was dependent on glucose metabolism itself, or if this memory could be produced by membrane depolarization alone. To this end we treated human islet with pulses of 30 mM of KCl, which causes membrane depolarization, opening of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, and insulin secretion without a prior increase in intracellular ATP levels. As shown in Figure 4E and F, potassium chloride produced similar, if somewhat lower, increase in pCaMKII and pSynapsin levels. Moreover, we evaluated if the memory is due to the glucose pulse or due to the depolarization induced by glucose. Since the increase in the expression of the proteins analyzed on Figure 4E was higher in glucose pulse than in potassium group we suggest that in addition to depolarization, the glucose metabolism is crucial for the memory generation.

##### *5. Graph of the LTP in pancreatic $\beta$ -cell induced by Pulse of glucose*

Graphical representation of the proposed mechanism of CaMKII-dependent memory formation in pancreatic islets and MIN6-cells.

## DISCUSSION

Glucose-stimulated insulin secretion is a complex process that translates glycolytic flux and elevated ATP production to increased cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  levels and finally fusion of insulin granules with the plasma membrane. This process is accompanied by increased phosphorylation of CaMKII (Fig. S3), a process now showed to be part of the establishment of metabolic memory in  $\beta$ -cells.

Cerasi and colleagues have already shown that exposing perfused rat pancreas to a high concentration of glucose gives rise to a biphasic pattern of insulin release. They demonstrated that this insulin response is influenced by a “memory for glucose” that first pulse of glucose enhances the insulin response to a second one (20; 21). Differently, here

we assessed the memory of  $\beta$ -cells 24 hours after the last glucose pulse and we drive our attention to the molecular mechanism that could be involved in the memory generation.

It is well established that CaMKII is fundamental for memory and learning in neurons. Memory is defined as the capacity to acquire, store (consolidate) and retrieve (evocate) information (22). In the nervous system, this process occurs after a marked influx of  $\text{Ca}^{2+}$  in the postsynaptic neuron, which converts CaMKII to its constitutively active form and allows the information to be maintained (3). The information is stored by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent modifications of several cellular processes that ultimately imprint the information (23). Pancreatic  $\beta$ -cells and neurons, despite their divergent embryonic origins, share many characteristic, from stimulus-secretion coupling to epigenetic marks (24). In fact, even in mature  $\beta$ -cells simple removal of two transcriptional factors, FOXA1 and FOXA2, is sufficient to reactivate a whole set of neuronal genes (25). Here, we demonstrate that human pancreatic  $\beta$ -cell are able to acquire, consolidate and retrieve information, induced by glucose, and determined that this ability is dependent on CaMKII and MAFA.

Neuronal memory is dependent of Long-Term Potentiation (LTP), a process caused by the brief increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  that induces an autonomous active state of CaMKII (6). To test if pancreatic  $\beta$ -cells store metabolic memory in analogous fashion to the way neurons stores information, we exposed  $\beta$ -cells to pulses of high glucose, which induce rapid increases in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ . To determine whether the information from the glucose pulses was maintained, and whether the cells could retrieve the information after a new glucose challenge, experiments were performed after a 24 hours consolidation period during which  $\beta$ -cells were exposed only to low glucose.

$\beta$ -cells exposed to pulse treatment consistently presented with a striking increase in insulin secretion, both in basal and in stimulatory glucose conditions. This increased secretory response indicates that, like neurons,  $\beta$ -cells can generate and retrieve memory of priory activation. This process was dependent on CaMKII activity, since the inhibitor KN93 abolished it. In addition, the pulse treatment increased CaMKII Thr<sup>-286</sup> phosphorylation and correlated with higher insulin secretion compared to the control cells. The effect of the pulse was caused by this increase in constitutive CaMKII activity rather than by an increase in calmodulin/P-CaMKII interactions, since calmodulin/P-CaMKII complex formation did

not differ between the control and pulse group (data not showed). Furthermore, when the cells were exposed to 16.7 mM glucose, there was a significant increase in this interaction in the control cells, while there was only a marginal further increase in the pulse Groups (data not showed), indicating that in pulse group the CaMKII was already maximally activated.

During memory generation in neurons, there is a period during which the postsynaptic neurons become more sensitive and responsive to a new stimulus (3; 6). Similarly, we observed that pulse treatments of  $\beta$ -cells increased GSIS for a prolonged period (5-60 min), and even when the stimulus was removed  $\beta$ -cells continued to secrete more insulin than control cells (Fig. 1D). In addition, pCaMKII was elevated in  $\beta$ -cells of the treatment group in both basal conditions and after 60 min of glucose exposure, remaining higher even after glucose was removed (Fig. 1E).

We confirmed the capacity of memory formation and the role of CaMKII in this phenomenon in both mouse and human islets. In addition, we showed that human islets from the pulse group exhibited increased insulin release in the glucose perfusion assay (Fig. 3C-E), confirming that human pancreatic  $\beta$ -cells from the glucose pulse group secretes more insulin, even with the removal of the stimulus (Fig. 3C).

One of the characteristics observed during neuronal LTP is an increase in the expression of NMDA receptors and  $\text{Ca}^{2+}$  channels (22), which augment calcium influx into the postsynaptic neuron (16). Likewise, pancreatic islets of the pulse group presented with earlier and higher influx of  $\text{Ca}^{2+}$  when stimulated with high glucose concentration (16.8 mM), and again this effect was dependent of CaMKII activity (Figs. 2 C-E). These results are consistent with the observed increase in GSIS (Figs. 1C/2B) and elevated insulin secretion after the removal of the stimulus (Fig. 1D)

Pulse treatment increased expression of several proteins important in  $\beta$ -cell function and glucose metabolism, such as GCK, Cav1.2, SNAP25, GLUT2, insulin and PDX-1 (Fig. 4), and this effect was dependent on CaMKII activation. What is the molecular mechanism by which CaMKII mediates metabolic memory induced by glucose pulses? We found increased expression of MAFA (Fig. 4E), a critical effector of mature  $\beta$ -cells phenotype

and the phosphorylation of CREB (Fig. 4D) induced by pulsed glucose and dependent on CaMKII activation. CREB activity is controlled by CaMKII phosphorylation in neurons and acts in neuronal memory formation (22; 26). MAFA is a major activator of insulin transcription and multiple proteins involved in  $\beta$ -cell function, such as the glucose transporter GLUT2, glucokinase and others (12; 27; 28).

Our finds suggest that CREB and MAFA are involved in memory generation, but MAFA is more important in metabolic memory of  $\beta$ -cells than CREB. This is because CREB does not bind directly to regulatory elements in GCK and voltage-dependent Calcium channels (data not shown), In contrast, MAFA was shown to increase expression of GCK and GLUT2 (28), which together with calcium channel, are crucial in GSIS.

To investigate the contribution of glucose metabolism itself as opposed to membrane depolarization for memory formation, we exposed human islet to a pulses of 30 mM of potassium chloride, which depolarizes  $\beta$ -cells while bypassing glucose metabolism completely, or to a pulses of glucose in the presence of nifedipin, which blocks calcium channels and prevents glucose-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entrance.

In this scenario, we observed that pulses of glucose were more efficient in activating expression of pivotal mediator of  $\beta$ -cell function such as GCK,  $\text{Ca}_v1.2$  and MAFA (Fig. 4E) and in increase the phosphorylation of CaMKII and Synapsin (Fig. 4F). These results indicates that, together with  $\text{Ca}^{2+}$  influx, glucose metabolism is necessary for the memory generation, since the activation of GCK and MAFA expression as well as the increase in CaMKII and Synapsin phosphorylation were higher in glucose pulse than in the potassium or glucose pulse + nifedipin groups. Therefore, sustained activation of MAFA expression by glucose pulses that persist at least 24 hours after the last glucose pulse is a molecular mediator of the metabolic memory of  $\beta$ -cell.

In conclusion, we have shown here that, like neurons, human and mice  $\beta$ -cells are able to acquire, store and retrieve information in a process similar to neuronal LTP. This process, presented schematically in figure 5, is dependent on the activation of CaMKII, just as is the case of neuronal memory.

These finds provide further evidence that the similarity of neurons and  $\beta$ -cells on the transcriptome epigenome levels is not accidental, but an important aspect of the biology of these embryologically so distinct cell types.

Evidently, the discovery of a metabolic memory in  $\beta$ -cells might have greater implication, and raises questions concerning the impact of this memory for physiological and pathological control of insulin secretion and glucose homeostasis. Given the pivotal role of insulin secretion changes in most metabolic disorders, it is conceivable to suppose that pancreatic  $\beta$ -cells memory might play a relevant role in many of those pathophysiological conditions such as: obesity, malnutrition and disorders involving intrauterine alterations.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank CNPq, FAPESP (FAPESP 2011/09012-6) and NIH (NIDDK R01-DK-055342 and R01-DK-088383 to KHK) for financial support, and we thank Marise MC Brunelli (Biologist, IB/Unicamp), Priscila de Oliveira Marques (IB/Unicamp), Wei Qin (IDOM/Upenn) and Heather Collins (TCL/Upenn) for technical assistance. Researcher Santos GJ belongs to the Obesity and Comorbidities Research Center/Sao Paulo Research Foundation.

There are no conflicts of interest related to this research.

*Santos GJ* was involved in data collection, manuscript writing, discussion of the findings, and study design. *Ferreira SM* was involved in the data collection, and manuscript review. *Ortis F* was involved in the data collection, discussion of the findings and wrote, reviewed and edited the manuscript. *Rezende LF* analyzed the data, contributed to the discussion and was involved in study design. *Kaestner KH* was involved in discussion of the findings and reviewed and edited the manuscript, and was evolved in the design of human islet experiments. *Boschero AC* contributed to the discussion, reviewed and edited the manuscript, involved in study design and is the guarantor of the work.

## LEGENDS

**Figure 1: MIN6 cells acquire, store, and recall metabolic information.** MIN6 cells were exposed to four pulses of high (30 mM) glucose, interspersed with three intervals of low (3 mM) glucose, followed by a 24 hours consolidation period before analysis of insulin secretion. Parallel dishes were cultured in low glucose continuously, or exposed to the glucose pulses in the presence of the CaMKII inhibitor KN93. 24 hours after the last pulse of glucose **(A)** Insulin secretion of MIN6 cells exposed to KRBB with 2.8 or 16.8 mM glucose for 1 hour was measured. Letters indicates significant differences at  $p < 0.05$  between groups. Data represent 6 independent experiments. **(B/C)** MIN6 cell of control (white triangle) and pulse group (black circle) were exposed to 16.7mM of glucose. Phosphorylation of CaMKII (pCaMKII/GAPDH) was assessed at 0, 5, 15, 30, 45 and 60 minutes of exposure. Values presented as fold increase of time zero and  $*p < 0.05$  Vs control group. **(D)** Insulin secretion during stimulus of 16.7 mM glucose over time (0, 5, 15, 30 and 60 minutes), and after the removal of the stimulus (65, 75 and 90 minutes).  $*p < 0.05$  Vs control group **(E)** CaMKII phosphorylation in basal condition, after 60 minutes of glucose stimulus and 30 minutes after the removal of the glucose stimulus – 90 minutes. Different letters means significant differences,  $p < 0.05$ . Data are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.

**Figure 2: Mouse pancreatic islets acquire, store and evoke information.** Following the glucose paradigm and the consolidation period, pancreatic islet from Swiss mice were exposed to KRBB with 5.6 mM of glucose for 1 hour, and then exposed to KRBB with 2.8 or 16.8 mM of glucose for additional 1 hour. After this period, we determined the **(A)** the insulin secretion and **(B)** phosphorylation of CaMKII (pCaMKII/GAPDH). **(C)** Representative curves of changes in intracellular  $Ca^{2+}$  concentrations in response to 16.7 mM of glucose for mouse islets pretreated with the various glucose exposure paradigms. Values are the ratios of F340/F380 of FURA2-AM fluorescence are presented as fold increase over the initial ratio. **(D)** The total rise in intracellular calcium was determined as ‘area under the curve’ (AUC) was during the stimulatory period. **(E)** The time delay from glucose exposure to initial rise in intracellular  $Ca^{2+}$  depends on prior glucose. Values are



represented in minutes. Different letters means significant differences at  $p < 0.05$ . Data are means  $\pm$  SEM of 3–4 independent experiments.

**Figure 3: Human pancreatic Islets display metabolic memory of prior glucose exposure.** 24 hours after the last pulse of glucose we determined, (A) insulin secretion and (B) phosphorylation of CaMKII in human islets from non-diabetic deceased organ exposed to KRBB with 2.8 or 16.8 mM glucose for 1 hour. (C) Representative lines of insulin secretion from perfusate islets. After the consolidation period 150 human islet per group were handpicked under a light microscope and placed into a perfusion chamber and exposed to KRBB without glucose for 30 minutes followed by the KRBB with increasing concentration of glucose from 0 to 30 Mm at 0.75 mM/min. Samples were collected at 2ml/min and insulin levels determined by RIA. The area under the curve (AUC) was calculated (D) during glucose exposure. Different letters means significant differences. In panel C: #  $p < 0.05$  Vs Control, @  $p < 0.001$  Vs Control, \*\* $p < 0.05$  Vs Pulse+KN93, \$ $p < 0.01$  Vs Control. In panel A, B, D and E: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Data are means  $\pm$  SEM of 3–5 independent experiments.

**Figure 4:** Metabolic memory is related in expression changes of key players in insulin secretion. 24 hours after the last pulse of glucose human islets were harvested and the protein were extracted to quantify expression of the following proteins: (A) Glucokinase (GCK normalized to expression of GAPDH), (B) Voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel ( $\text{Ca}_v1.2/\text{GAPDH}$ ), (C) Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25/GAPDH) and (D) the transcriptional factor MAFA (mafA/GAPDH). Data are means  $\pm$  SEM of 3–5 independent experiments. \* $p < 0.05$  (F) Expression of GCK,  $\text{Ca}_v1.2$ , SNAP25, mafA, pCREB, MAP2 and GAPDH of human islet from the groups Control, Pulse, Pulse+KN93, Potassium and Pulse+Nifedipin. (G) Expression of pCaMKII, pSynapsin and GAPDH of human islet from the groups Control, Pulse, Pulse+KN93, Potassium and Pulse+Nifedipin exposed for 1 hour to KRBB with 2.8 or 16.8 mM of glucose.

**Figure 5:** Graphical representation of the proposed mechanism of CaMKII-dependent memory formation in pancreatic islets and  $\beta$ -cells. In low glucose concentration (2.8 mM)

Control islets have basal insulin secretion, since Glucokinase (GCK) is the master glucose sensor in  $\beta$ -cell and presents low affinity for glucose it is expected that when exposed to 2.8 mM of glucose normal islets will not have a flux in glucose metabolism and will not show insulin secretion. Islets from pulse group presents, after 24 hours of the last glucose pulse, an increase in glucose-induced insulin secretion compared with the control group after 1 hour of basal glucose exposure. This is due to the fact that pulse group presents increase in GLUT2 mRNA expression (in MIN6 cells – data not showed), as well as, an increase in the expression of GCK, calcium channel and phosphorylation of CaMKII. Increase in GCK itself could explain the increase in the basal insulin secretion, however, increase in CaMKII phosphorylation provides to the  $\beta$ -cell more efficiency in transduce the calcium signal, resulting in more secretion of insulin. When exposed to high glucose concentration, islets from group control, as expected, presented an increase in GSIS process, since the glucose metabolism was activated by glucose through GCK activation. Our paradigm that generated the memory imprinted in islet of the pulse group a new way to respond to the glucose. These islets have more GLUT2, GCK, calcium channel, Calcium influx, CaMKII phosphorylation and Insulin secretion. As mentioned, increase in GCK promotes increase in glucose metabolism and ATP production. This fact, together with increase in the calcium influx to the cell accompanied with elevated levels of CaMKII phosphorylated provides explanation to the higher insulin secreted by islets that was submitted to the pulse regime.

**Figure S1: Experimental Design for MIN6 cells and mice pancreatic islets.** This figure is related with the meth design.

**Figure S2: Experimental Design for human islets.** This figure is related with the meth design.

**Figure S3: Primers utilized in the Real-time RT-PCR.** This figure is related with the Real-Time RT-PCR methods and with the Figure 5.

**Figure S4: MIN6 insulin secretion correlates with acute CaMKII phosphorylation. This figure is related to Figures 1.** MIN6 cells were maintained in RPMI medium without glucose for 1 hour, and then exposed to Krebs-buffer with increasing glucose concentrations for 1 hour. At the end of the 1 hour exposure, we assessed insulin secretion, P-CaMKII and Calmodulin/P-CaMKII interaction was assessed. (A) Glucose-induced

Insulin Secretion (GSIS). (B) CaMKII phosphorylation (P-CaMKII/GAPDH) following acute glucose stimulation. (C) Calmodulin associated with pCaMKII. Protein extract were immunoprecipitated with a pCaMKII antibody followed by immunoblot for Calmodulin. (D) Insulin and P-CaMKII correlation following acute glucose exposure. (E) Insulin and Calmodulin/P-CaMKII association correlation following acute glucose exposure. Values expressed as fold increase. Data are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.

## FIGURES

Figure 1

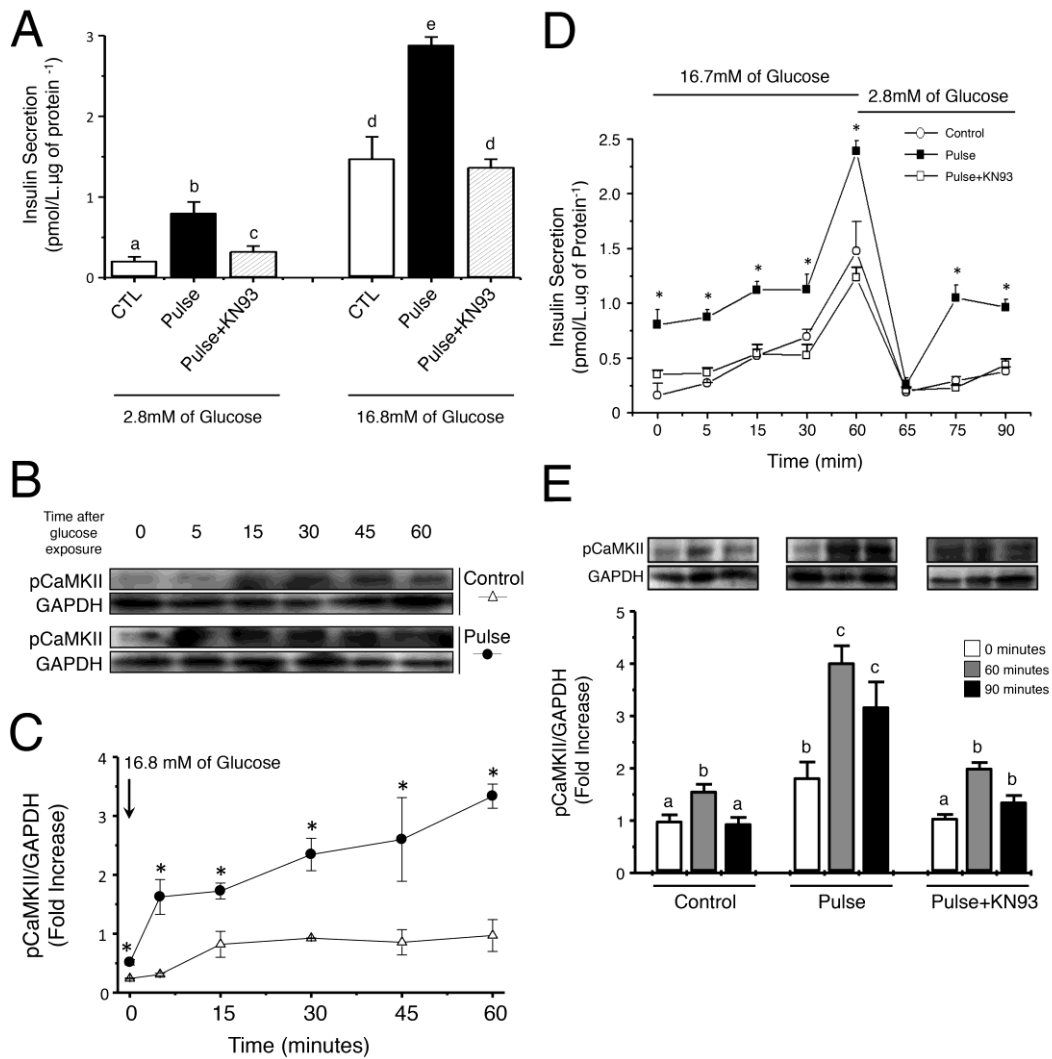


Figure 2

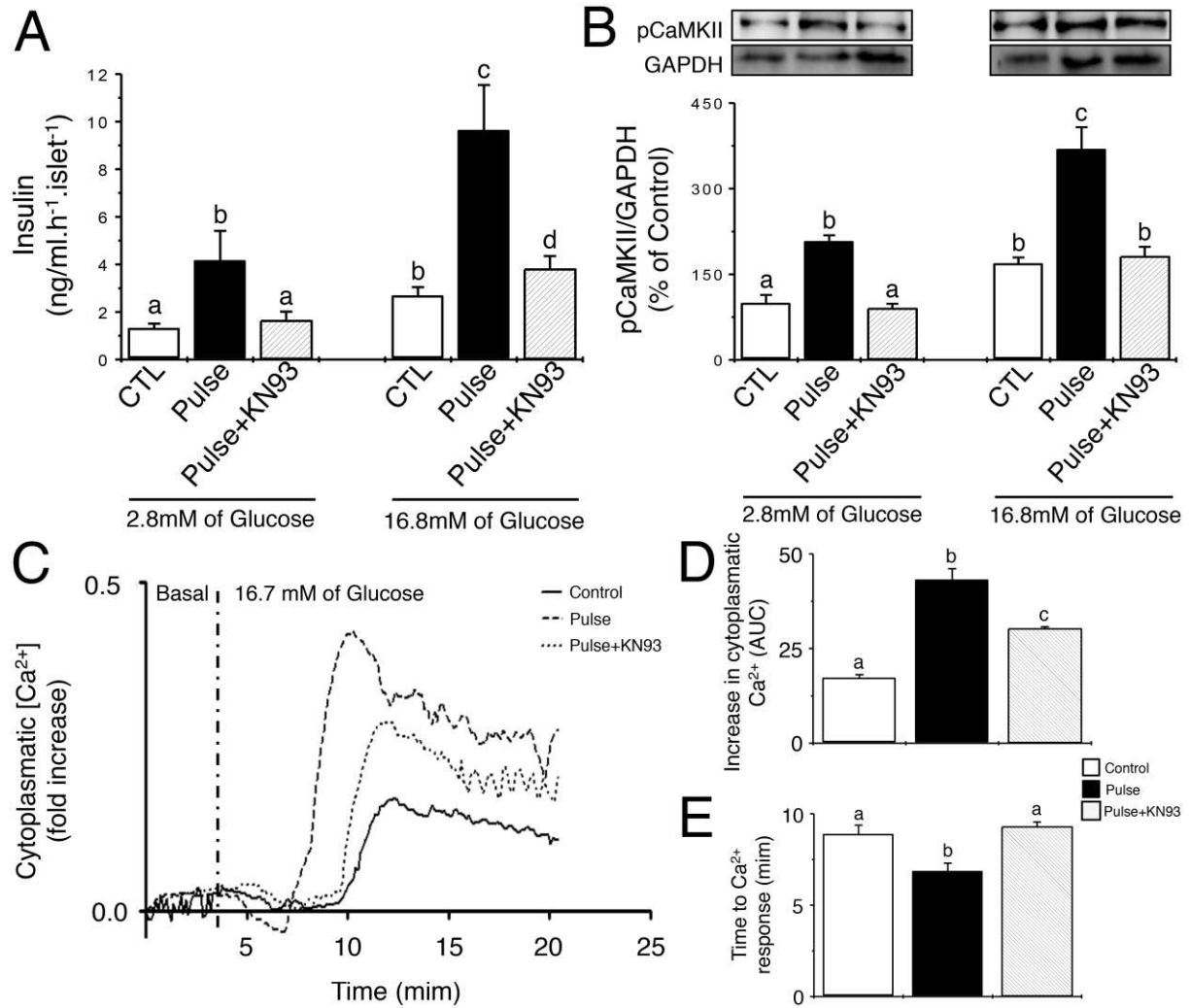


Figure 3

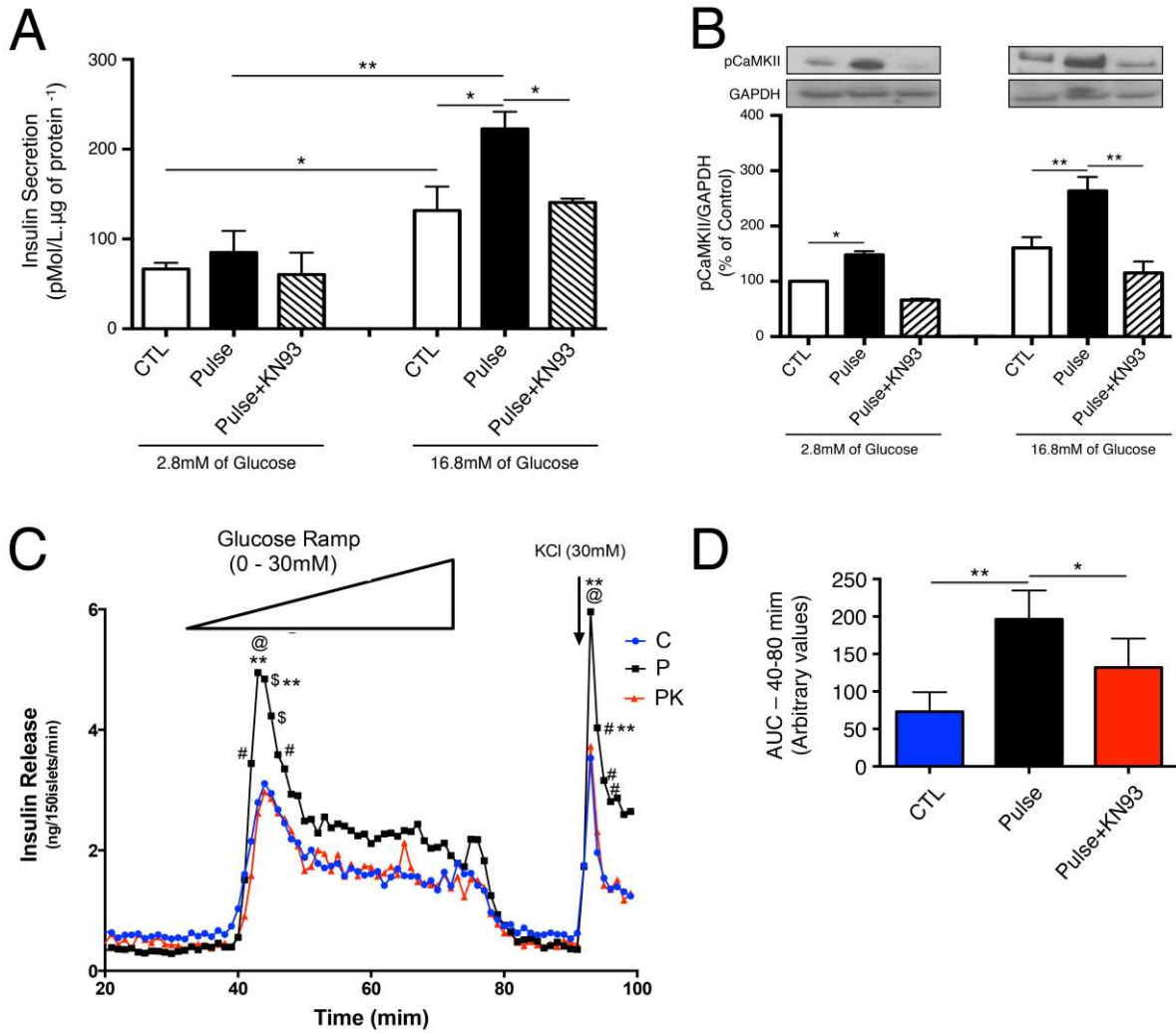


Figure 4

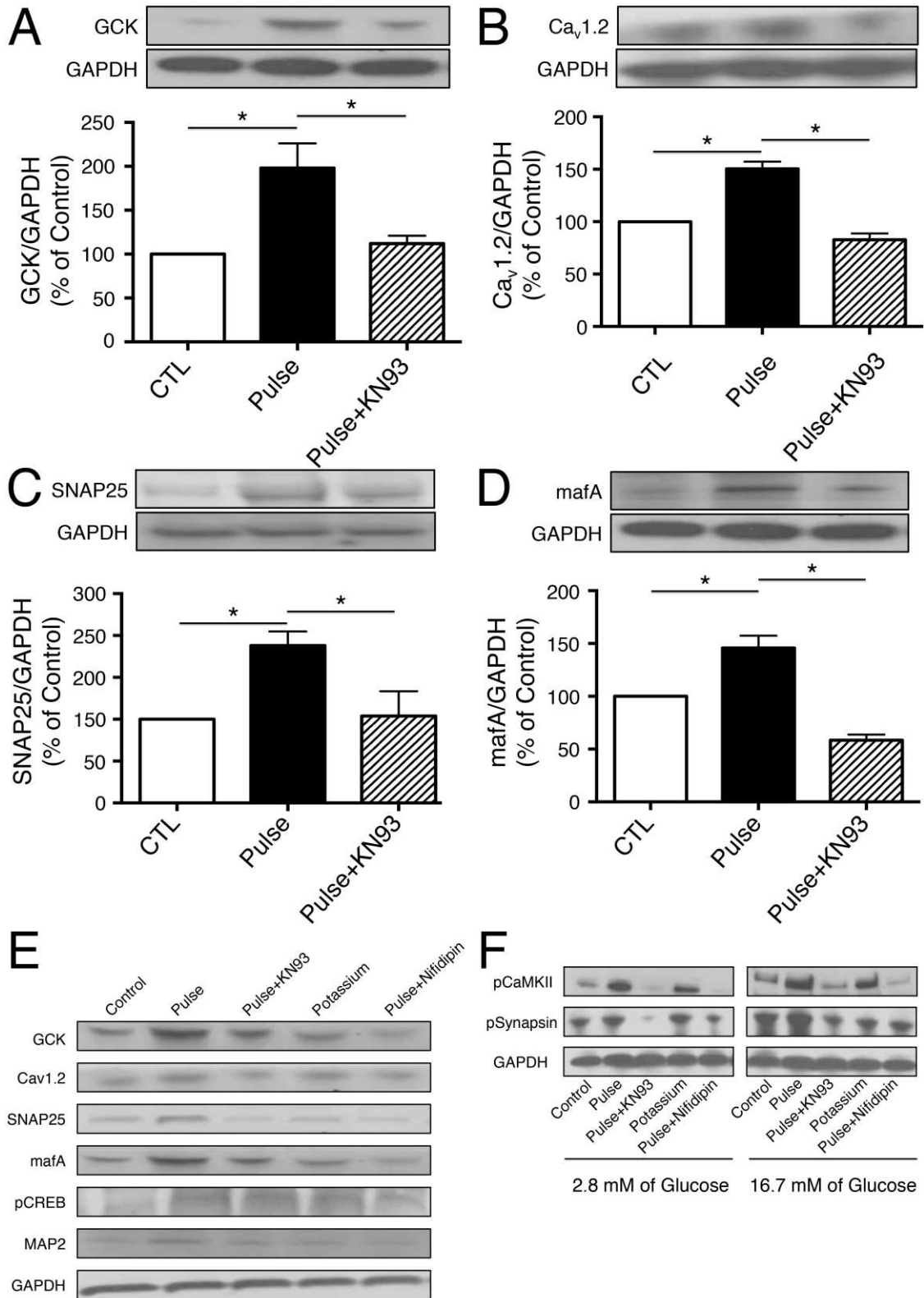


Figure 5

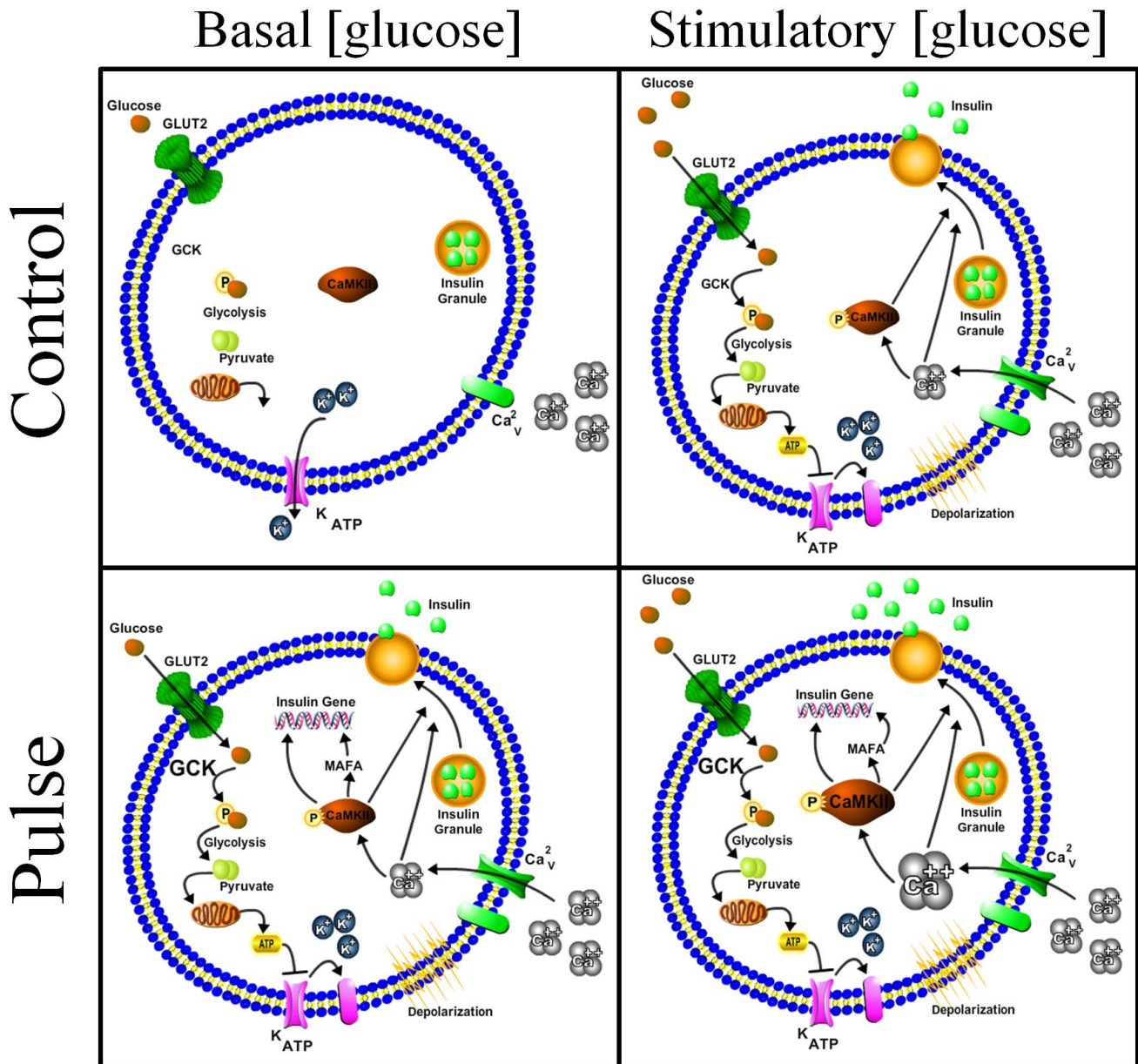


Figure S1

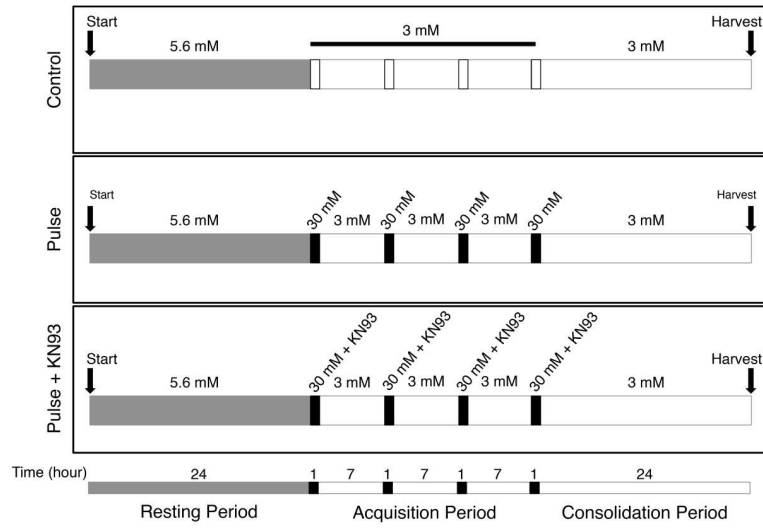


Figure S2

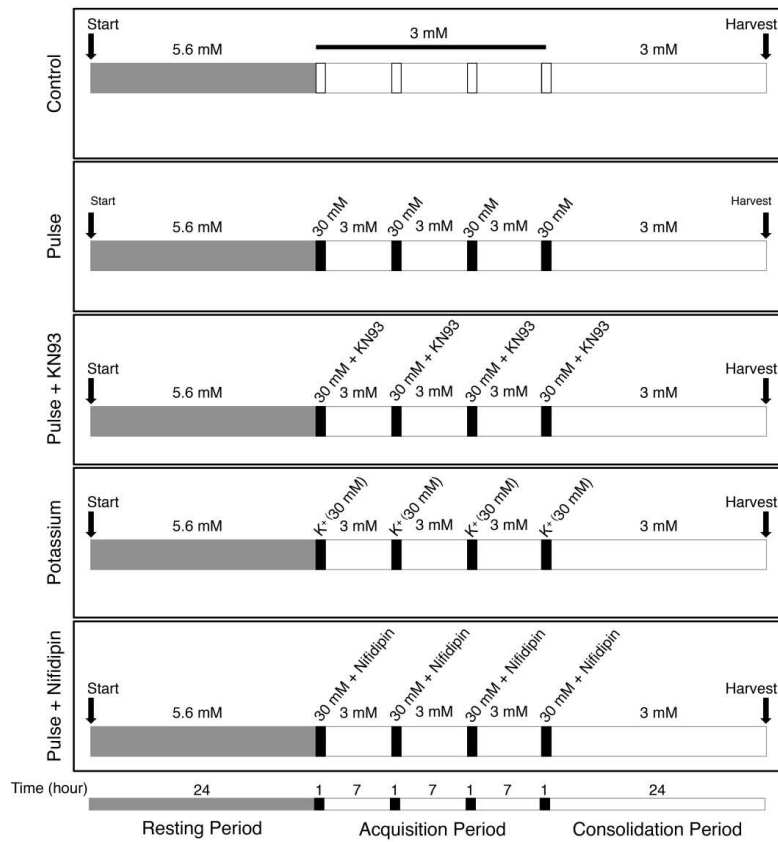
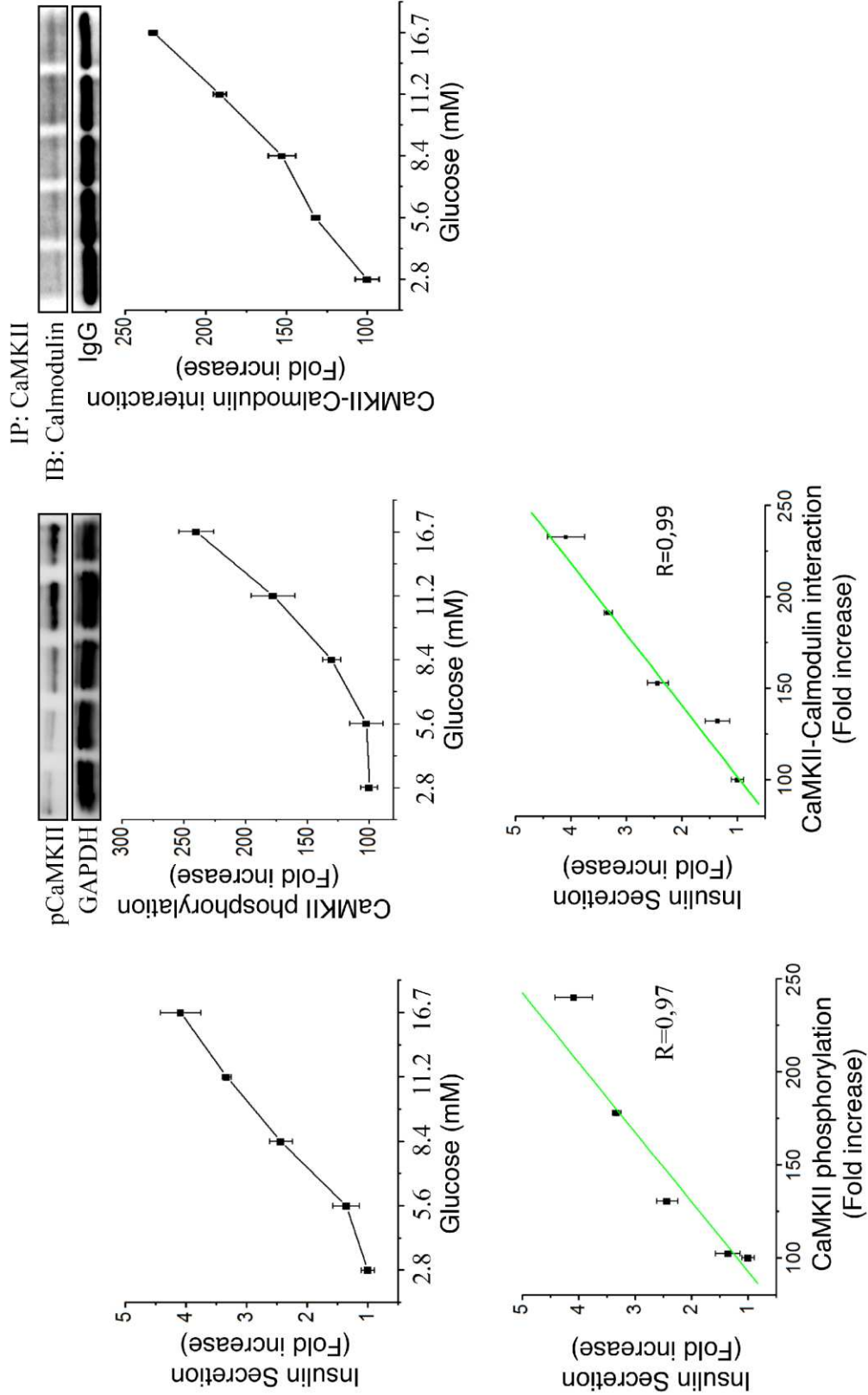




Figure S3



## REFERENCES

1. Clapham D: Calcium signaling. *Cell* 2007;131:1047-1058
2. Hudmon A, Schulman H: Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem* 2002;71:473-510
3. Yamauchi T: Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol Pharm Bull* 2005;28:1342-1354
4. Waxham M, Tsai A, Putkey J: A mechanism for calmodulin (CaM) trapping by CaM-kinase II defined by a family of CaM-binding peptides. *J Biol Chem* 1998;273:17579-17584
5. Rongo C: A fresh look at the role of CaMKII in hippocampal synaptic plasticity and memory. *Bioessays* 2002;24:223-233
6. Fukunaga K, Miyamoto E: A working model of CaM kinase II activity in hippocampal long-term potentiation and memory. *Neurosci Res* 2000;38:3-17
7. Malenka R, Nicoll R: Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 1999;285:1870-1874
8. Lipsky RH: Epigenetic mechanisms regulating learning and long-term memory. *Int J Dev Neurosci* 2012;
9. Krueger K, Ings E, Brun A, Landt M, Easom R: Site-specific phosphorylation of synapsin I by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in pancreatic  $\beta$ TC3 cells: synapsin I is not associated with insulin secretory granules. *Diabetes* 1999;48:499-506
10. Easom R: CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis. *Diabetes* 1999;48:675-684
11. Suefujii M, Furukawa N, Matsumoto K, Oiso H, Shimoda S, Yoshinaga T, Matsuyama R, Miyagawa K, Kondo T, Kawashima J, Tsuruzoe K, Araki E: The impact of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II on insulin gene expression in MIN6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;421:801-807
12. Hang Y, Stein R: MafA and MafB activity in pancreatic  $\beta$  cells. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:364-373
13. Wang H, Brun T, Kataoka K, Sharma AJ, Wollheim CB: MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia* 2007;50:348-358
14. Santos GJ, Oliveira CA, Boschero AC, Rezende LF: CNTF protects MIN6 cells against apoptosis induced by Alloxan and IL-1 $\beta$  through downregulation of the AMPK pathway. *Cell Signal* 2011;23:1669-1676
15. Watson ML, Macrae K, Marley AE, Hundal HS: Chronic effects of palmitate overload on nutrient-induced insulin secretion and autocrine signalling in pancreatic MIN6  $\beta$  cells. *PLoS One* 2011;6:e25975
16. Rezende LF, Santos GJ, Santos-Silva JC, Carneiro EM, Boschero AC: Ciliary neurotrophic factor (CNTF) protects non-obese Swiss mice against type 2 diabetes by increasing  $\beta$  cell mass and reducing insulin clearance. *Diabetologia* 2012;55:1495-1504
17. Doliba NM, Qin W, Vatamaniuk MZ, Li C, Zelent D, Najafi H, Buettger CW, Collins HW, Carr RD, Magnuson MA, Matschinsky FM: Restitution of defective glucose-stimulated insulin release of sulfonylurea type 1 receptor knockout mice by acetylcholine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E834-843
18. Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A, Velidedeoglu E, Desai NM, Koeberlein B, Wolf B, Barker CF, Naji A, Matschinsky FM, Markmann JF: Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2004;53:624-632

19. Bigarella CL, Borges L, Costa FF, Saad ST: ARHGAP21 modulates FAK activity and impairs glioblastoma cell migration. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:806-816
20. Efendić S, Cerasi E, Luft R, Gladnikoff G: Potentiation of glucose-induced insulin release by glucose in the isolated pancreas of fed and fasted rats. *Diabetes* 1976;25:949-954
21. Grill V, Adamson U, Cerasi E: Immediate and time-dependent effects of glucose on insulin release from rat pancreatic tissue. Evidence for different mechanisms of action. *J Clin Invest* 1978;61:1034-1043
22. Wang H, Hu Y, Tsien J: Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* 2006;79:123-135
23. Lisman J, Schulman H, Cline H: The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:175-190
24. Atouf F, Czernichow P, Scharfmann R: Expression of neuronal traits in pancreatic  $\beta$  cells. Implication of neuron-restrictive silencing factor/repressor element silencing transcription factor, a neuron-restrictive silencer. *J Biol Chem* 1997;272:1929-1934
25. Gao N, Le Lay J, Qin W, Doliba N, Schug J, Fox AJ, Smirnova O, Matschinsky FM, Kaestner KH: Foxa1 and Foxa2 maintain the metabolic and secretory features of the mature  $\beta$ -cell. *Mol Endocrinol* 2010;24:1594-1604
26. Souza MA, Magni DV, Guerra GP, Oliveira MS, Furian AF, Pereira L, Marquez SV, Ferreira J, Figuera MR, Royes LF: Involvement of hippocampal CAMKII/CREB signaling in the spatial memory retention induced by creatine. *Amino Acids* 2012;43:2491-2503
27. Kataoka K, Han SI, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Handa H: MafA is a glucose-regulated and pancreatic  $\beta$ -cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem* 2002;277:49903-49910
28. Artner I, Hang Y, Mazur M, Yamamoto T, Guo M, Lindner J, Magnuson MA, Stein R: MafA and MafB regulate genes critical to  $\beta$ -cells in a unique temporal manner. *Diabetes* 2010;59:2530-2539

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A insulina é fundamental no controle da homeostasia energética, atuando no metabolismo da glicose, dos ácidos graxos e das proteínas. Sua secreção é controlada de maneira multifatorial, envolvendo disponibilidade de nutrientes, fatores neuronais e hormonais, sendo a glicose seu maior estimulador. O processo de secreção de insulina é extremamente complexo e converte o sinal gerado pela glicose (fluxo glicolítico) no aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático e, finalmente, na fusão dos grânulos de insulina com a membrana plasmática. Esse processo é acompanhado por um aumento na fosforilação de CaMKII (Figura S3), importante para a formação de memória pelas células  $\beta$ -pancreáticas.

Memória é a capacidade de adquirir, estocar e evocar qualquer tipo de informação. Sabe-se que, em neurônios, a CaMKII é fundamental para a formação da memória que ocorre após um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  no neurônio pós-sináptico, convertendo a CaMKII para uma forma constitutivamente ativa, permitindo que a informação seja estocada ao longo do tempo, através de modificações em diversos processos celulares.

Como dito anteriormente, apesar de possuírem origens embrionárias diferentes, neurônios e células  $\beta$  pancreáticas apresentam diversas características em comum, desde mecanismos de acoplamento de estímulo-secreção até marcadores epigenéticos. É fato que, mesmo em células  $\beta$  pancreáticas maduras, a simples deleção dos fatores de transcrição FOXA1 e FOXA2 é suficiente para reativar todos os genes característicos de um neurônio. Neste trabalho, demonstramos que células  $\beta$  pancreáticas tem a capacidade de adquirir, estocar e evocar informações, em um processo dependente de CaMKII e MAFA.

Sobre memória e células  $\beta$  pancreáticas Erol Cerasi e seus colaboradores mostraram em diversos trabalhos publicados nos anos 70 que ilhotas possuem “memória à glicose”, pois ilhotas de ratos pré-expostas a altas concentrações de glicose apresentam maior secreção de insulina em relação àquelas ilhotas não expostas previamente à glicose. Diferentemente dos trabalhos de Cerasi, aqui nós avaliamos a memória metabólica de células  $\beta$  pancreática formada após 24 horas da última exposição a 30 mM de glicose, além disso, avaliamos os possíveis mecanismos moleculares envolvidos nesse processo.

Primeiramente, para poder investigar a memória metabólica em células  $\beta$  pancreáticas, desenvolvemos um paradigma no qual tal memória se mostrasse evidente. Então, estabelecemos que a exposição de células  $\beta$  pancreáticas a pulsos de 30 mM de glicose com duração de 1 hora, intercalado por 7 horas de exposição a baixas concentrações

de glicose era um paradigma que evidenciava a formação de memória metabólica. Os detalhes do paradigma experimental realizado em células MIN6 e ilhotas de camundongos e humanos estão representados nas Figuras 1 e 2.

Mostramos aqui que, após um período de 24 horas de consolidação da informação adquirida, células  $\beta$  MIN6 expostas ao paradigma de pulsos de glicose apresentaram aumento na secreção de insulina tanto em concentrações basais (2.8 mM) como estimulatória (16.8 mM) de glicose. Esse aumento na GSIS indica que, assim como neurônio, células  $\beta$  pancreáticas podem adquirir, estocar e evocar informação, neste caso, proveniente dos pulso de altas concentrações de glicose. Mostramos também que esse processo de geração de memória foi dependente de CaMKII, uma vez que o aumento observado na GSIS foi bloqueado pelo KN93, um inibidor eficiente e específico da atividade da CaMKII (Anexo 3).

No processo de formação de memória, neurônios pós-sinápticos se tornam mais sensíveis e responsivos a um novo estímulo. Da mesma forma nós observamos que células MIN6, submetidas ao paradigma, mostraram maior secreção de insulina ao longo do tempo, e mesmo com a remoção do estímulo essas células continuaram a secretar mais insulina que as do Grupo controle.

Após a confirmação de nossa hipótese que células produtoras de insulina tinham a capacidade de memorizar informações, nós estendemos essa pergunta a ilhotas pancreáticas de camundongos e de humanos. Com o mesmo paradigma de pulso de glicose, confirmamos que tanto células  $\beta$  pancreáticas de camundongos quanto de humanos possuem a habilidade em adquirir memória, em um processo dependente de CaMKII.

Uma característica marcante observada durante a formação do LTP neuronal é o aumento da expressão de receptores NMDA e de canais de cálcio que, juntos, aumentam o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o neurônio pós-sináptico. Por isso, voltamos nossas atenções para a dinâmica da concentração do íon  $\text{Ca}^{2+}$  frente a um novo estímulo de glicose e, observamos que ilhotas de camundongos do Grupo pulso apresentaram maior influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Essas ilhotas responderam mais rapidamente quando estimulado com 16.8 mM de glicose e, mais uma vez esse efeito foi abolido pelo KN93. Esses resultados estão de acordo e sustentam o aumento de secreção de insulina induzida pelo paradigma do pulso.

Para entender os mecanismos envolvidos na formação de memória, avaliamos em ilhotas de camundongos a expressão de genes envolvidos na função secretora das células  $\beta$  pancreáticas (Anexo 4) e, observamos que ilhotas de camundongos expostas a pulsos de glicose mostraram aumento na expressão gênica de GLUT2,  $Ca_v1.2$ , CaMKII, SNAP25, Insulina e PDX-1. Ainda, observamos que o KN93 reverteu o aumento da expressão de CaMKII e SNAP25, induzido pelos pulsos de glicose. Em ilhotas de humanos observamos que o pulso de glicose aumentou a expressão de GCK,  $Ca_v1.2$ , SNAP25 e MAFA, efeito esse dependente de CaMKII.

Por fim, investigamos se a memória metabólica observada foi, de fato, induzida pela glicose ou decorrente da despolarização gerada pelo seu metabolismo. Para isso, ilhotas humanas foram expostas a (a) 30 mM de potássio, a fim de despolarizar a membrana independentemente do metabolismo da glicose, ou (b) a 30 mM de glicose na presença de nifedipina, que bloqueia canais de cálcio. Assim como anteriormente, a exposição ao potássio ou à glicose mais nifedipina foi executada em regime de pulsos, conforme está descrito de maneira detalhada na Figura 2.

Diante deste cenário, observamos que o metabolismo de glicose e o influxo de cálcio são necessários para o processo de formação de memória em células  $\beta$  pancreáticas, uma vez que o regime de pulsos de glicose foi mais eficiente no aumento da expressão de GCK,  $Ca_v1.2$  e MAFA e da fosforilação de CaMKII e Synapsina, comparado aos Grupo potássio e glicose+nifedipina.

Devido: (a) sua importância na manutenção do fenótipo de células  $\beta$  pancreáticas maduras, (b) ser um ativador potente do gene da insulina e de proteínas importantes para a GSIS, (c) ser ativado pela CaMKII e, (d) por ter expressão aumentada 24 horas após o último pulso, acreditamos que o MAFA seja o mediador molecular da formação da memória metabólica, induzida pela glicose.

É provável que a existência de uma memória metabólica em células  $\beta$  pancreáticas tenha implicações fisiológicas importantes e ainda desconhecidas. Devido ao papel fundamental da insulina em diversas desordens metabólicas, acreditamos que essa memória tenha alguma função em doenças como obesidade, desnutrição e, principalmente, em patologia associada à vida adulta de pessoas expostas a um ambiente intrauterino com alterações nutricionais.

## **CONCLUSÕES**



Diante do exposto, concluímos que, da mesma forma que neurônio, células  $\beta$  pancreáticas de camundongos e de humanos tem a capacidade de adquirir, estocar e evocar informação, em um processo similar ao LTP. Esse processo, esquematizado na Figura 5, se mostrou dependente de CaMKII, bem como do metabolismo da glicose e do influxo de cálcio.

## **REFERÊNCIAS**

- [1] Matovcik L, Nairn A, Gorelick F (1998) Cellular localization of calmodulin-dependent protein kinases I and II to A-cells and D-cells of the endocrine pancreas. *J Histochem Cytochem* 46: 519-526
- [2] Monaco S, Illario M, Rusciano M, et al. (2009) Insulin stimulates fibroblast proliferation through calcium-calmodulin-dependent kinase II. *Cell Cycle* 8: 2024-2030
- [3] Chin E (2004) The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. *Proc Nutr Soc* 63: 279-286
- [4] Melloul D, Marshak S, Cerasi E (2002) Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45: 309-326
- [5] Lee S, Kim H, Choi S, et al. (2009) Involvement of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II (CaMK II) in genistein-induced potentiation of leucine/glutamine-stimulated insulin secretion. *Mol Cells*
- [6] Yamauchi T (2005) Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol Pharm Bull* 28: 1342-1354
- [7] Watterson M, Van Eldik L (1998) Calmodulin and Signal Transduction
- [8] Clapham D (2007) Calcium signaling. *Cell* 131: 1047-1058
- [9] Demuro A, Parker I, Stutzmann G (2010) Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 285: 12463-12468
- [10] Soderling T (1999) The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci* 24: 232-236
- [11] Hudmon A, Schulman H (2002) Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 364: 593-611
- [12] Dolmetsch R, Lewis R, Goodnow C, Healy J (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386: 855-858
- [13] Marambaud P, Dreses-Werringloer U, Vingtdeux V (2009) Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 4: 20
- [14] Yamagata Y, Czernik A, Greengard P (1991) Active catalytic fragment of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. Purification, characterization, and structural analysis. *J Biol Chem* 266: 15391-15397
- [15] Soderling T, Chang B, Brickey D (2001) Cellular signaling through multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 276: 3719-3722
- [16] Griffith L (2004) Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions. *J Neurosci* 24: 8394-8398
- [17] Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3: 175-190
- [18] Hudmon A, Schulman H (2002) Neuronal CA<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem* 71: 473-510
- [19] Osterhoff M, Möhlig M, Schwanstecher M, et al. (2003) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II delta2 regulates gene expression of insulin in INS-1 rat insulinoma cells. *Cell Calcium* 33: 175-184
- [20] Yang E, Schulman H (1999) Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 274: 26199-26208
- [21] Pepke S, Kinzer-Ursem T, Mihalas S, Kennedy M (2010) A dynamic model of interactions of Ca<sup>2+</sup>, calmodulin, and catalytic subunits of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *PLoS Comput Biol* 6: e1000675
- [22] Griffith L, Lu C, Sun X (2003) CaMKII, an enzyme on the move: regulation of temporospatial localization. *Mol Interv* 3: 386-403

- [23] Colbran R, Smith M, Schworer C, Fong Y, Soderling T (1989) Regulatory domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Mechanism of inhibition and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* 264: 4800-4804
- [24] Lou L, Lloyd S, Schulman H (1986) Activation of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 9497-9501
- [25] Putkey J, Waxham M (1996) A peptide model for calmodulin trapping by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 271: 29619-29623
- [26] Waxham M, Tsai A, Putkey J (1998) A mechanism for calmodulin (CaM) trapping by CaM-kinase II defined by a family of CaM-binding peptides. *J Biol Chem* 273: 17579-17584
- [27] Meyer T, Hanson P, Stryer L, Schulman H (1992) Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* 256: 1199-1202
- [28] Griffith L (2004) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: an unforgettable kinase. *J Neurosci* 24: 8391-8393
- [29] Colbran R (1993) Inactivation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by basal autophosphorylation. *J Biol Chem* 268: 7163-7170
- [30] Wang H, Hu Y, Tsien J (2006) Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* 79: 123-135
- [31] Rongo C (2002) A fresh look at the role of CaMKII in hippocampal synaptic plasticity and memory. *Bioessays* 24: 223-233
- [32] Malenka R, Nicoll R (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285: 1870-1874
- [33] Bliss T, Collingridge G (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39
- [34] Bliss T, Gardner-Medwin A (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232: 357-374
- [35] Soderling T (2000) CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10: 375-380
- [36] Lisman J (1994) The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci* 17: 406-412
- [37] Fukunaga K, Miyamoto E (2000) A working model of CaM kinase II activity in hippocampal long-term potentiation and memory. *Neurosci Res* 38: 3-17
- [38] Elgersma Y, Sweatt J, Giese K (2004) Mouse genetic approaches to investigating calcium/calmodulin-dependent protein kinase II function in plasticity and cognition. *J Neurosci* 24: 8410-8415
- [39] Straub SG, Sharp GW (2002) Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 451-463
- [40] Hiriart M, Aguilar-Bryan L (2008) Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1298-1306
- [41] Yang SN, Berggren PO (2006) The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic  $\beta$ -cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27: 621-676
- [42] Delmeire D, Flamez D, Hinke SA, Cali JJ, Pipeleers D, Schuit F (2003) Type VIII adenylyl cyclase in rat  $\beta$  cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1. *Diabetologia* 46: 1383-1393
- [43] Dyachok O, Idevall-Hagren O, Sagetorp J, et al. (2008) Glucose-induced cyclic AMP oscillations regulate pulsatile insulin secretion. *Cell Metab* 8: 26-37

- [44] Thore S, Wuttke A, Tengholm A (2007) Rapid turnover of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in insulin-secreting cells mediated by Ca<sup>2+</sup> and the ATP-to-ADP ratio. *Diabetes* 56: 818-826
- [45] Seino S, Shibasaki T (2005) PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* 85: 1303-1342
- [46] Neshler R, Anteby E, Yedovizky M, Warwar N, Kaiser N, Cerasi E (2002) B-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. *Diabetes* 51 Suppl 1: S68-73
- [47] Tengholm A, Gylfe E (2009) Oscillatory control of insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 297: 58-72
- [48] Easom R (1999) CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis. *Diabetes* 48: 675-684
- [49] Norling L, Colca J, Kelly P, McDaniel M, Landt M (1994) Activation of calcium and calmodulin dependent protein kinase II during stimulation of insulin secretion. *Cell Calcium* 16: 137-150
- [50] Jones P, Persaud S (1998) Ca<sup>2+</sup>-induced loss of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity in pancreatic  $\beta$ -cells. *Am J Physiol* 274: E708-715
- [51] Teitelman G (1990) Insulin cells of pancreas extend neurites but do not arise from the neuroectoderm. *Dev Biol* 142: 368-379
- [52] Krueger K, Ings E, Brun A, Landt M, Easom R (1999) Site-specific phosphorylation of synapsin I by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in pancreatic  $\beta$ TC3 cells: synapsin I is not associated with insulin secretory granules. *Diabetes* 48: 499-506

**ANEXO 01**

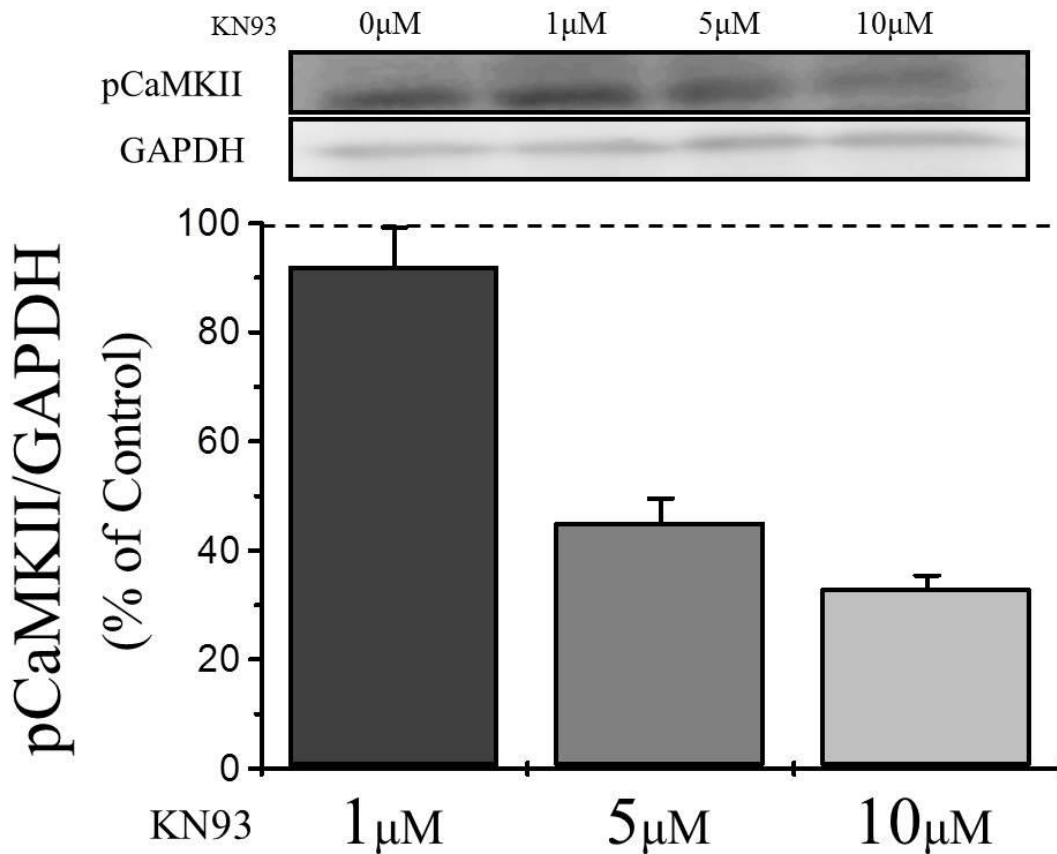
<b>Isolation ID#</b>	<b>Gender</b>	<b>Age</b>	<b>Height (m)</b>	<b>Weight (Kg)</b>	<b>BMI</b>	<b>Diabetes</b>
HP2105A	M	27	1,77	64	20,2	Não
Hu885	M	44	1,7	75	25,8	Não
HP-13131-01	F	36	1,62	92	34.8	Não
ICRH50	M	46	????	????	28.8	Não
AAGW388	M	43	1,95	117	30,6	Não

**ANEXO 02**



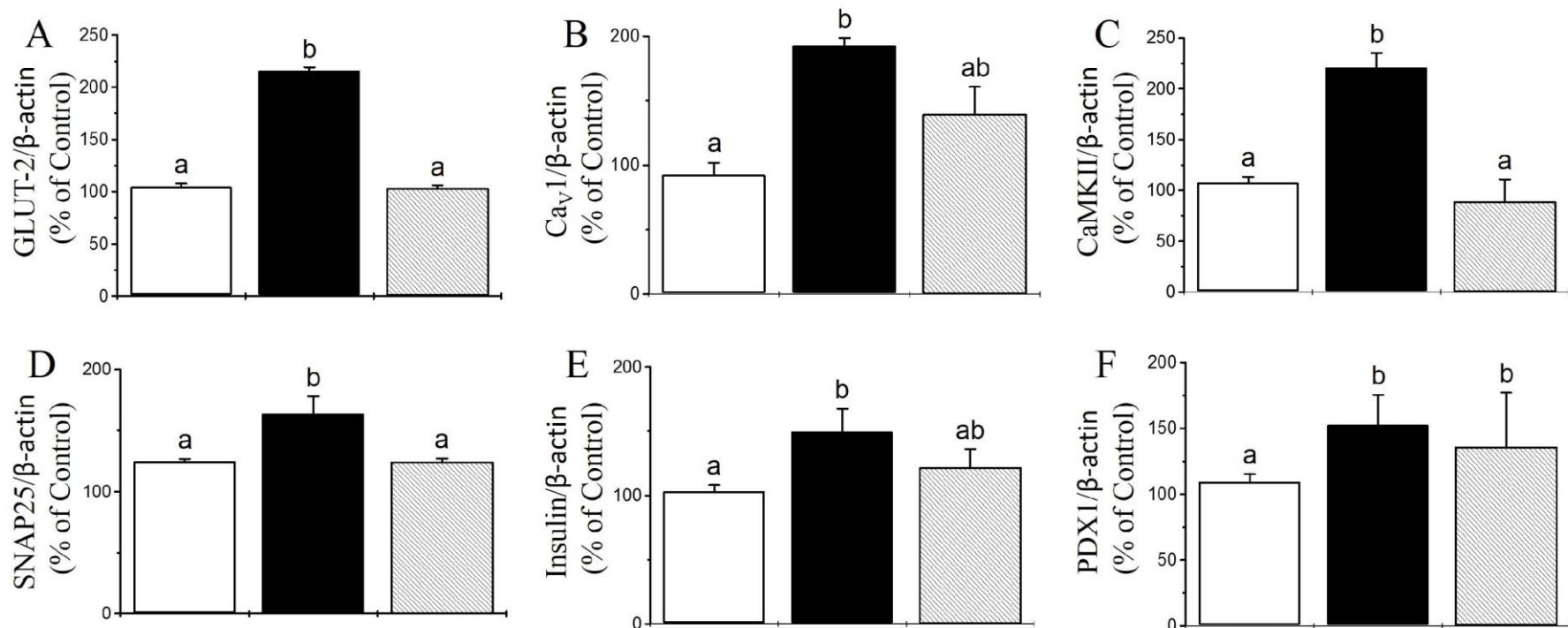
<b>Gene</b>	<b>Sense</b>	<b>Anti-sense</b>
<b>GLUT-2</b>	5' -cattgctggaagaagcgtatcag-3'	5' -gagaccttctgctcagtcgacg-3'
<b>Cav1.2</b>	5' -cctttgttcagccatccacaccc-3'	5' -ttgccagcactgcccag-3'
<b>CaMKII</b>	5' -aagatgtgacgacctggaatg-3'	5' -ctggcctggctcctcaatgg-3'
<b>Insulin</b>	5' -ttgcagtagttctccagtt-3'	5' -attgtccaacatggccctgt-3'
<b>SNAP25</b>	5' -gaattcaatggccgaggacgcaga-3'	5' -gtcgacttaaccacttcccagcatctttgt-3'
<b>PDX1</b>	5' -aaccggaggagaataagagg-3'	5' -gttgtcccgtactactgtt-3'
<b>B-Actin</b>	5' -agagggaaatcgtgcgtgaca-3'	5' -cgatagtgatgacctgaccgtca-3'

**ANEXO 03**



**Figura 6 – Teste da Eficiência do Inibidor KN93.** Células MIN6 foram expostas por 24h a diferentes concentrações do Inibidor farmacológico específico para a CaMKII. Após esse período a fosforilação da CaMKII (pCaMKII/GAPDH) foi avaliada por Western Blot. Valores mostrados em % do Controle. \*P < 0,05 Vs Controle. # P < 0,05 Vs 1μm. % P < 0,05 Vs 5μm. N=3

**ANEXO 04**



**Figura 7. Análise da expressão gênica em ilhotas de camundongos.** After the Consolidation Period mRNA of MIN6 cells were extract and the gene expression of (D) Glucose transporter 2 (GLUT-2/ $\beta$ -Actin) (E) Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel (Ca<sub>v</sub>1.2/ $\beta$ -Actin) (F) Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII/ $\beta$ -Actin) (G) Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25/ $\beta$ -Actin) (H) Insulin (Insulin/ $\beta$ -Actin) and (I) Pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1/ $\beta$ -Actin) were analyzed by Real-time RT-PCR. Different letters means significant differences,  $p < 0.05$ . Data are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.