



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Insulin and cellular stress induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes**

Bazuine, M.

### **Citation**

Bazuine, M. (2005, March 10). *Insulin and cellular stress induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/2709>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/2709>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## Samenvatting

Het onderzoek aan 3T3-L1 adipocyten, beschreven in dit proefschrift, toont hoe twee verschillende typen van cellulaire-stress inducerende agentia, namelijk het vicinaal thiol-bindende arseniet en het conventionele PKC-bindende en activerende PMA, de opname van glucose in deze cellen stimuleren. Terwijl arseniet hoofdzakelijk gebruik maakt van de insuline-gevoelige GLUT4 transporter, verhoogt PMA de basale glucose-opname via de GLUT1 transporter.

Zoals beschreven in hoofdstuk 3, illustreert de arseniet-geïnduceerde glucose-opname enkele algemene regels voor GLUT4 gemedieerde glucose-opname. Deze zijn : een tyrosine-kinase activiteit, activering van p38 MAPK en PKC- $\lambda$  activiteit. Hoewel activering van PI-3' kinase een essentiële stap in insuline signaaltransductie vormt, is deze stap niet nodig bij arsenite-gestimuleerde glucose opname. Kennelijk ligt de noodzaak van tyrosine-kinase activiteit in arseniet gestimuleerde glucose opname in het vermogen om Cbl te kunnen fosforyleren op tyrosine-residuen (zie hoofdstuk 3 fig. 5). Een verdere illustratie van het belang van tyrosine fosforylatie op Cbl is te vinden in onze studies met rottlerin (hoofdstuk 4). De cellulaire ATP-depletie veroorzaakt door deze farmacologische stof lijkt niet verantwoordelijk voor de geobserveerde inhibitie van GLUT4 translocatie (zoals gesuggereerd door Kayali *et al.*[1]). Daarentegen, naast een effect als uncompetitieve remmer van GLUT4 zelf, hindert rottlerin de tyrosine fosforylering van Cbl, leidend tot een 75% afname in GLUT4 translocatie (zie hoofdstuk 4, fig. 3 en 4). Helaas is de identiteit van de arseniet gestimuleerde tyrosine-kinase activiteit vooralsnog onopgehelderd. Echter, het specifieke vermogen van arseniet om tyrosine-fosforylering op STAT5a te induceren in volwassen adipocyten, vormt een eenvoudig middel om dit tyrosine kinase te identificeren (J.L. González-Galindo, niet gepubliceerde observaties). Voorheen is aangetoond hoe de insuline-geïnduceerde p38 MAPK activiteit is betrokken bij de regulatie van de hoeveelheid door de cel opgenomen glucose, zonder een effect op GLUT4 translocatie [2]. Dit suggereert een intrinsiek effect op de GLUT4 transporter zelf. Onze observaties aan arseniet, welke een potente activator van p38 MAPK is, illustreert een vergelijkbaar fenomeen in GLUT4 gemedieerde stress-geïnduceerde glucose opname (zie hoofdstuk 3, fig.6). Vervolgonderzoek levert een gedetailleerde analyse van de betrokkenheid van p38 MAPK hierin. Deze data tonen dat p38 MAPK betrokken is bij het “fijnregelen” van glucose opname door het reguleren van de turnover capaciteit. Het manuscript dat deze resultaten beschrijft is recentelijk ingediend. Een additioneel punt over deze regulatie komt vanuit onze observaties met genisteïne, beschreven in hoofdstuk 5. Dit onderzoek toont aan dat de

turnover capaciteit in GLUT4 ook gereguleerd kan worden door een intracellulair ATP-bindend Walker B motief, vergelijkbaar met hetgeen beschreven is voor GLUT1 [3]. Hoewel verder onderzoek nodig is om dit mechanisme volledig op te helderen vormt deze theoretische bevinding een belangrijke stap in het begrip van mechanismen in actie na GLUT4 translocatie. Of deze observaties mechanistisch gekoppeld zijn dient eveneens nog te worden uitgezocht. Naast onderzoek in de fundamentele aspecten van insuline-gestimuleerde glucose opname, leverde het onderzoek aan arseniet ook gegevens in een meer fysiologische richting. Wij namen waar dat de arseniet gestimuleerde glucose opname evenzeer gevoelig was voor behandeling met de insuline-resistente inducerende agens dexamethason. Onderzoek (beschreven in hoofdstuk 7) leerde ons dat hoewel PI-3' kinase signaaltransductie is aangedaan, de ondergeschikte componenten nog steeds volledig functioneel zijn. MKP-1 en -4 zijn daarentegen verhoogd in reactie op dexamethason. Dientengevolge is de activatie van p38 MAPK verloren gegaan, hetgeen leidt tot een verlaging van de opgenomen hoeveelheid glucose. Gegeven het feit dat MKP-4 eveneens verhoogd is in db/db- en ob/ob-muizen [4], en dat behandeling van de eerstgenoemden met een glucocorticoid-receptor antagonist de bloedsuiker spiegels verbeterd [5;6], zou de p38 MAPK signaaltransductie een belangrijk aspect in de behandeling van type II diabetes kunnen vormen. Om de studies beschreven in dit hoofdstuk mogelijk te maken diende een nieuw hulpmiddel ontwikkeld te worden. Lange tijd was de 3T3-L1 adipocyte ontoegankelijk voor de ectopische expressie van DNA. Door gebruik te maken van lentivirussen, zoals beschreven in hoofdstuk 6, kan een groot aantal cellen op eenvoudige en betrouwbare wijze getransduceerd worden. Dit nieuwe hulpmiddel maakt de 3T3-L1 adipocyte toegankelijk voor gangbare moleculair-biologische technieken en zal het onderzoeksveld tot voordeel strekken.

In tegenstelling tot arseniet, induceert PMA geen GLUT4 translocatie, maar werkt het enkel via GLUT1. Zoals geïllustreerd in hoofdstuk 8 van dit proefschrift, is PKC- $\beta$ II de vroegste en meest PMA-gevoelige PKC-isoform. Maar, in plaats van activatie is het de daarop volgende afbraak van deze isoform die GLUT1 translocatie induceert. Vervolgonderzoek (beschreven in hoofdstuk 9) helderde de betrokken processen op : Ten eerste is er de transcriptie van GLUT1, welke werkt via de klassieke PKC-ERK-GLUT1 route. Ten tweede is daar translocatie van GLUT1. Deze translocatie wordt gemedieerd door PKC- $\lambda$ , die in de basale situatie met PKC- $\beta$ II associeert. Dientengevolge, na afbraak van de  $\beta$ II -isoform (of door verstoring van dit complex met gemyristoylerde substraat-peptiden tegen  $\beta$ II) komt PKC- $\lambda$  vrij en kan fungeren als een positionele stimulans voor de translocatie van de GLUT1 bevattende blaasjes.

## References

- [1] Kayali,A.G., Austin,D.A., & Webster,N.J. (2002) Rottlerin inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes by uncoupling mitochondrial oxidative phosphorylation. *Endocrinology*, **143**, 3884-3896.
- [2] Sweeney,G., Somwar,R., Ramlal,T., Volchuk,A., Ueyama,A., & Klip,A. (1999) An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J. Biol. Chem.*, **274**, 10071-10078.
- [3] Levine,K.B., Cloherty,E.K., Fidyk,N.J., & Carruthers,A. (1998) Structural and physiologic determinants of human erythrocyte sugar transport regulation by adenosine triphosphate. *Biochemistry* , **37**, 12221-12232.
- [4] Xu,H., Dembski,M., Yang,Q., Yang,D., Moriarty,A., Tayber,O., Chen,H., Kapeller,R., & Tartaglia,L.A. (2003) Dual specificity mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-4 plays a potential role in insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, **278**, 30187-30192.
- [5] Picard,F., Wanatabe,M., Schoonjans,K., Lydon,J., O'Malley,B.W., & Auwerx,J. (2002) Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta - cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 15644-15648.
- [6] Friedman,J.E., Sun,Y., Ishizuka,T., Farrell,C.J., McCormack,S.E., Herron,L.M., Hakimi,P., Lechner,P., & Yun,J.S. (1997) Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription and hyperglycemia are regulated by glucocorticoids in genetically obese db/db transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31475-31481.

