



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## The role of ATF2 in insulin action

Baan, B.

### Citation

Baan, B. (2009, June 23). *The role of ATF2 in insulin action*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13861>

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/1887/13861>

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

# 8

**Nederlandse Samenvatting**

## Chapter 8

### Nederlandse Samenvatting

Insulin induceert complexe responsen in perifere weefsel zoals de skeletspier, vet, hart, lever en het brein om glucose- en vet-homeostase te bewerkstelligen. Een verminderde insulinerwerking met betrekking tot de glucose-huishouding in deze organen wordt insuline resistentie genoemd en is een kenmerk van type 2 diabetes. Teneinde op een moleculair niveau de mechanismen te begrijpen welke ten grondslag liggen aan insuline resistentie en nieuwe strategieën te ontwikkelen om de insuline resistentie te verminderen is beter inzicht in het moleculaire mechanisme van de cellulaire insuline-respons vereist. Binding van insuline aan zijn receptor leidt tot activatie van twee intracellulaire signaal-transductie routes: een PI-3K-afhankelijke PKB/Akt route en een Src/Ras-afhankelijke MAPK route. Activatie van de PKB/Akt route is vooral belangrijk voor de acute regulatie van het vet- en glucose-metabolisme. Tevens reguleert deze route tevens gen-expressie en cel-overleving. De MAPK-route lijkt vooral belangrijk voor activatie van gen-expressie en cellulaire proliferatie. In tegenstelling tot de PKB/Akt-route, is er nog weinig bekend over de rol van de Ras/MAPK-route bij de fysiologische insuline werking.

In onze onderzoeksgroep is de transcriptie factor ATF2 geïdentificeerd als een van de componenten van de Ras/MAPK signaalroute en tevens als nieuw onderdeel van de insuline signaal-transductieketen. In dit proefschrift hebben we de rol van ATF2 in de insuline-geïnduceerde respons verder onderzocht. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift valt in de volgende drie deelvragen uiteen:

1. Wat is het mechanisme van insuline-geïnduceerde ATF2-fosforylering?
2. Welke insuline-gereguleerde genen zijn ATF2-afhankelijk?
3. Is de regulatie van ATF2-fosforylering en ATF2-afhankelijke genen veranderd in een situatie van insuline resistentie?

In de hoofdstukken 3 en 4 wordt het onderzoek naar het mechanisme van de insuline-geïnduceerde fosforylatie van ATF2 beschreven. De hierbij verkregen resultaten sluiten aan bij de eerder gepubliceerde bevindingen (zie Ouwens et al. EMBO J 2002). In tegenstelling tot stress-stimuli, die een min of meer gelijktijdige fosforylering van ATF2 op de Threonine (Thr)69 en Thr71 induceren - een reactie die vermoedelijk uitgevoerd wordt door één kinase - induceren insuline en verwante groeifactoren ATF2-fosforylering op Thr69 en Thr71 via een Ras-afhankelijk twee-staps mechanisme waarin twee MAPK-routes samenwerken. Op basis van de resultaten beschreven in hoofdstuk 3 en 4 lijkt het volgende mechanisme voor insuline-geïnduceerde ATF2-fosforylering waarschijnlijk: Insuline activeert het MAPK ERK1/2, via activatie van de Ras-Raf-route. Actief Erk1/2 beweegt naar de kern waar het ATF2 fosforyleert op aminozuur Thr71. Minuten later, na een Ras-Raf-afhankelijke activatie van de stress-kinases p38 en/of JNK, migreren deze kinases naar de kern waar ze Thr71-gefosforyleerd ATF2 opnieuw fosforyleren, nu op Thr69. Door gebruik te maken van cellen die specifiek JNK missen, hebben we tevens aangetoond dat het kinase p38 op zich al in staat is om deze fosforylering te bewerkstelligen. In JNK-bevattende cellen lijkt echter het grootste deel van de Thr69-fosforylering via JNK te verlopen. De verkregen resultaten suggereren dat samenwerking tussen deze routes noodzakelijk is en dat het verschil in de migratiesnelheid tussen actief ERK1/2 en respectievelijk JNK/p38 verantwoordelijk is voor de twee-staps fosforylering van ATF2 in respons op insuline.

## Chapter 8

In hoofdstuk 6 beschrijven we dat deze situatie van ATF2 fosforylering zich ook voordoet in levende dieren. In een muizen-model kon worden bevestigd dat infusie van insuline *in vivo* tot ATF2-fosforylering in lever, vet-weefsel en de pancreatische  $\beta$ -cel leidt. Of dit proces in de muis via precies dezelfde stappen verloopt als bij de gekweekte cellen, konden we vanwege technische redenen niet in detail vaststellen.

In hoofdstuk 2 wordt op basis van literatuuronderzoek bediscussieerd welke rol ATF2 en ATF2-gereguleerde genen potentieel zouden kunnen spelen bij metabole regulatie en de insuline respons in het bijzonder. Om een begin te maken de fysiologische rol van ATF2 in insuline actie te begrijpen, is van een aantal van deze insuline-gereguleerde genen de ATF2-afhankelijkheid onderzocht in insuline-gevoelige cellijnen (hoofdstuk 5). Vervolgens hebben we in een *in vivo* situatie onderzocht in hoeverre de expressie van deze genen in de lever, *in vivo*, onder controle van insuline staat (hoofdstuk 6). Met behulp van farmacologische remming van ATF2-activatie en via ATF2-knockdown experimenten werd in A14 fibroblasten en 3T3L1-adipocyten aangetoond dat voor efficiënte insuline-geïnduceerde expressie van een aantal genen (ATF3, *c-jun*, Egr1, MKP1 en SREBP1c) ATF2-activatie, dan wel expressie van ATF2 cruciaal is (hoofdstuk 5). Hoewel de meeste van deze ATF2-afhankelijke genen (ATF3, *c-jun*, Egr1 en SREBP1c) ook *in vivo* door insuline in muizen-levers werden geïnduceerd (hoofdstuk 6), hebben we hierbij de betrokkenheid van ATF2 niet kunnen onderbouwen.

Een aantal van de (potentieel) ATF2-afhankelijke genen beschreven in hoofdstuk 2 en 5 is betrokken bij de pathogenese van insuline resistentie/type 2 diabetes. Bovendien draagt hyperactivatie van de het ATF2-kinase JNK ook sterk bij aan dit proces. Op basis van bovenstaande gegevens lijkt er in de ontwikkeling van insuline resistentie/type 2 diabetes een rol voor ATF2 te zijn weggelegd. Om die reden hebben we in hoofdstuk 6 ook gekeken naar de staat van ATF2-fosforylering en (insuline-geïnduceerde) expressie van ATF2-gereguleerde genen in een *in vivo* insuline resistente situatie. Daarvoor zijn muizen resistent voor insuline gemaakt door ze een aantal weken een 'hoog-vet' dieet (HVD) te voeren. Ten opzichte van de controle dieren werd er in de lever en het vetweefsel van insuline resistente muizen een significante verhoging van ATF2-fosforylering gevonden. In de levers van de HVD-muizen ging de basaal verhoogde ATF2-fosforylering gepaard met een verhoogde expressie van de in hoofdstuk 5 beschreven ATF2-afhankelijke genen. In tegenstelling tot de controle dieren had insuline-infusie geen additioneel inducerend effect meer op de hepatische expressie van deze ATF2-target genen. Bovendien was de expressie van eerder beschreven ATF2-target genen betrokken bij de immuun respons (IL1 $\beta$  en TNF $\alpha$ ) ook verhoogd in de HVD-situatie.

Samenvattend kan gesteld worden dat het hier beschreven onderzoek ATF2 heeft geïdentificeerd als component van de insuline signaal-transductie route, zowel *in vitro* als *in vivo*. In cellijnen werd de insuline-geïnduceerde ATF2-fosforylering gemedieerd door samenwerking van twee Ras-afhankelijke MAPK-routes: ERK en p38/JNK. Het lijkt waarschijnlijk dat een soortgelijk mechanisme *in vivo* plaatsvindt.

Door analyse van beschreven ATF2-target genen in cellijnen hebben we laten zien dat de insuline-geïnduceerde expressie van Egr1, ATF3, *c-jun* en SREBP1c afhankelijk is van ATF2. Het bleek dat het *in vivo* expressie niveau van deze genen correleerde met een verhoogde ATF2-fosforylering in respons op insuline enerzijds, maar anderzijds ook in response op HVD-geïnduceerde insuline resistentie. Opmerkelijk is dat een hoog vet dieet insuline resistentie induceert en een verdere fosforylering van ATF2 door insuline verhindert. Ondanks het feit dat het ophelderen van de precieze rol van ATF2 fosforylering

## **Nederlandse Samenvatting**

in deze situaties nader onderzoek vereist, suggereren de hier beschreven data dat ATF2 mogelijk een duale rol speelt: enerzijds als een mediator van normale insuline werking, anderzijds als potentiële regulator bij het ontstaan van insuline resistentie.

## Chapter 8