

Mature adipocyte function and progression of metabolic disorders

Doctoral Thesis

Author(s):

Tomaszewska, Anna

Publication date:

2012

Permanent link:

<https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-007619496>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 20871

Mature adipocyte function and progression of metabolic disorders

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Anna Tomaszewska

M.Sc. Wrocław University of Technology

Born January 25th 1982

Citizen of Poland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Christian Wolfrum

Prof. Wilhelm Krek

Prof. Dr. med Arnold von Eckardstein

2012

Abstract

The prevalence of obesity and associated metabolic complications results in an increasing need for prevention and treatment therapies. The observed phenomenon is caused by genetic and environmental factors, that contribute to the malfunction of adipose tissue. Of importance is the regional distribution and size of adipocytes, that form the link between obesity and disturbances in glucose and lipid metabolism. Especially the excess of body fat in the upper part of the body increases the risk of diabetes, hyperlipidemia, hypertension and atherosclerosis, when compared with the peripheral fat depots.

In this work we wanted to identify new pathways affecting mature adipocyte function, to improve our understanding of mechanisms underlying obesity and development of insulin resistance and type II diabetes.

Gene expression levels measured by microarrays do not adequately reflect the deregulated molecular processes of a cell due to posttranscriptional events and other forms of regulation. Thus, especially changes in gene expression of transcription factors are difficult to analyze. A solution to this problem is the analysis of promoters of coexpressed genes, which can provide evidence on the involvement of certain transcription factors in the regulation of gene cascades. In the present study we used different mouse models of obesity of both genetic and environmental origin to elucidate altered transcription factor profiles using a microarray approach. We compared gene profiles of lean and obese mice, but also different fat depots (i.e. subcutaneous and visceral), since those depots are known to have varying contributions to the development of metabolic disorders. To analyze transcription factor profiles we used the Explain™ platform to identify key signaling molecules. We identified several novel keynodes that can be linked to deregulated adipose tissue function in different animal models of obesity, but that also show a specific link to the adipose tissue depot that was analyzed. We used a viral approach to knock down top 100 candidates and analyzed adipocyte function. For *in vivo* analysis 12 significantly regulated candidates were chosen and gene arrays were performed. Our data demonstrates that Explain™ is a useful tool to analyze microarray data in a complex of a regulatory network of the adipocyte cell, and that keynode analysis is a powerful tool to identify novel regulatory cascades that might be the underlying cause for the development of metabolic disorders.

In the second part of the thesis we analyzed Nck1 (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1) and its role in 3T3-L1 differentiation. Nck1 is an adaptor protein that mediates signal from receptor tyrosine kinases to the downstream effectors. Platelet-derived growth factor beta receptor (PDGFβR) is a tyrosine kinase

receptor involved in proliferation, survival, actin reorganization, and migration of cells and Nck was shown to transduce signal downstream from activated PDGF β R. Furthermore, the SH2 domain of Nck couples signals from ephrine (Eph) receptors to integrins and the JNK stress-activated MAP kinase. Nck was also shown to bind to tyrosine phosphorylated IRS-1 upon insulin stimulation. Recent findings showed that Nck adaptor proteins are also involved in the regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress.

We found that Nck is important for a differentiation process of 3T3-L1 with the highest expression level twelve hours after differentiation initiation. Lack of Nck1 causes reduction in adipogenesis of 3T3-L1, which is accompanied by reduction in cell proliferation. We could show that the observed phenotype is caused partially by induction and retention of the ER stress response. The conditions of prolonged stress caused malfunction of unfolded protein response (UPR), which was manifested by a reduction in the PeIF2 α and GRPs level. This could be due to the fact that in the process of 3T3-L1 differentiation a high demand of protein synthesis is required. Knockdown of Nck1 might cause an accumulation of unfolded proteins followed by retention of the ER stress condition and thus affect the adipogenic program of preadipocytes.

Resumé

La prévalence de l'obésité et des complications métaboliques nécessitent un besoin croissant de prévention et de traitements thérapeutiques. Ceux-ci sont causés par des facteurs génétiques et environnementaux qui contribuent au dysfonctionnement du tissu adipeux. La répartition corporelle ainsi que la taille des adipocytes sont d'importants critères définissant la relation entre l'obésité et les troubles métaboliques du glucose et des lipides. Par exemple, l'excès de graisse présent dans la partie supérieure du corps augmente le risque de diabète, d'hyperlipidémie, d'hypertension et d'athérosclérose, en opposition avec les dépôts de graisse périphériques.

Dans ce travail, nous avons voulu identifier de nouvelles voies qui affectent la fonction des adipocytes matures afin d'améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'obésité et au développement de la résistance à l'insuline et diabète de type II.

Les niveaux d'expression des gènes analysés par microarrays ne reflétant pas forcément la dérégulation des processus moléculaires survenant dans la cellule en raison des événements post-transcriptionnels ainsi que d'autres formes de régulation qui complètent la contrôle transcriptionnel. Afin de pallier à ce problème, l'analyse des promoteurs des gènes co-exprimées par la plate-forme ExplainTM pourrait fournir des réponses sur l'implication de certains facteurs de transcription dans la régulation des voies de signalisation. Au cours de cette étude, les Microarray et la plate -forme ExmplainTM ont été utilisés sur différents dépôt graisseux (sous-cutané et viscéral) de modèles murins d'obésité d'origine génétique ou environnementale afin d'élucider d'éventuelles altérations dans le profil d'expression des facteurs de transcription. Notre étude a mise a jour plusieurs nouvelles molécules potentiellement impliquées dans la dérégulation de la fonction du tissu adipeux dans différents modèles animaux d'obésité. De plus, nos résultats démontrent que le tissu visceral présente un profil moléculaire différent du tissu visceral illustrant la disparité et la spécificité métabolique des différents dépôts graisseux.

Nous avons utilisé une approche virale pour réprimer l'expression des 100 meilleurs candidats et analyser la fonction métabolique des adipocytes. Pour l'analyse in vivo, 12 candidats dont la régulation s'est montrée significativement différente des contrôles ont été choisis pour une analyse d'expression génique plus approfondue. Nos données ont montré qu' ExplainTM est un outil utile pour analyser les données générées par le « gene array » au milieu d'un réseau de régulation complexe qu'est la cellule adipocytaire. De ce fait, l'analyse de ces molécules clés constitue une

approche efficace permettant l'identification de nouvelles cascades de régulation qui pourraient être la cause sous-jacente du développement de troubles métaboliques.

Dans la seconde partie de ce rapport de thèse, nous avons analysé le rôle de Nck1 (région non catalytique de la protéine tyrosine kinase adaptateur 1) dans la différenciation des adipocytes 3T3-L1. Nck1 est une protéine adaptatrice qui assure la médiation de signal des récepteurs tyrosines kinases vers les effecteurs se trouvant en aval. Par exemple, il a été démontré que Nck1 joue un rôle important dans la transduction du signal par le Platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF β R), un récepteur Tyrosine kinase impliqué dans la prolifération, la survie, la réorganisation de l'actine et la migration des cellules. De même, le domaine SH2 de Nck1 peut se lier à certains résidus tyrosine phosphorylée sur IRS-1 suite à l'activation du récepteur de l'insuline et transduit également les signaux des récepteurs ephrine (Ep) vers les intégrines et les JNK stress-activated MAP kinase. De récentes découvertes ont également montré que des protéines adaptatrices Nck contrôle la régulation de la survie cellulaire au cours du stress du réticulum endoplasmique (RE).

Nous avons constaté que Nck est également un important régulateur de la différenciation des adipocytes 3T3-L1. L'expression génétique de Nck1 culmine douze heures après l'initiation de la différenciation des adipocytes. De plus, la diminution de l'expression de Nck1 freine l'adipogenèse des cellules 3T3-L1 et est accompagnée par une réduction de la prolifération cellulaire. Nous avons pu démontrer que le phénotype observé est causé en partie par l'induction et le maintien de la réponse au stress du RE. Les conditions de stress prolongé ont causé un dysfonctionnement de la réponse à la protéine dépliée (EPU) qui se manifeste par une réduction du niveau p-eIF2 α et de GRP. Nous envisageons que le processus de différenciation des cellules 3T3-L1 impose une forte demande de synthèse protéique. Ainsi, la diminution de l'expression de Nck1 pourrait provoquer une accumulation de protéines dépliées suivie par le maintien de l'état de stress du RE et ainsi affecter le programme adipogénique des préadipocytes.