

Université de Montréal

**Rôle de l'enzyme PAS kinase dans la régulation
du facteur de transcription PDX-1 dans la
cellule bêta pancréatique**

par

Meriem Semache

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)
en Biochimie

Décembre, 2013

© Meriem Semache, 2013
Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle de l'enzyme PAS kinase dans la régulation du facteur de transcription
PDX-1 dans la cellule bêta pancréatique.

présentée par :
Meriem Semache

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Vincent Poitout, directeur de recherche
Dre. Sylvie Mader, présidente-rapporteuse
Dre. Johanne Tremblay, membre du jury
Dre. Louise Larose, examinatrice externe
Dr. Janos Filep, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le diabète de type 2 (DT2) se caractérise par une production insuffisante d'insuline par le pancréas ainsi qu'une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline. Dans les cellules bêta pancréatiques, le glucose stimule la production de l'insuline en induisant la transcription de son gène et la traduction ainsi que la sécrétion de sa protéine. Paradoxalement, une exposition prolongée et simultanée de ces cellules à de hautes concentrations de glucose en présence d'acides gras conduit à la détérioration de la fonction bêta pancréatique et au développement du DT2. Toutefois, les mécanismes moléculaires responsables de ces effets du glucose ne sont que partiellement connus. L'objectif du travail décrit dans cette thèse est d'identifier les mécanismes responsables de la régulation de la transcription du gène de l'insuline.

PDX-1 (de l'anglais pour *pancreatic and duodenal homeobox 1*) est un facteur de transcription majeur et essentiel tant pour le développement du pancréas que pour le maintien de sa fonction à l'état adulte. En réponse au glucose, PDX-1 se lie au promoteur du gène de l'insuline et induit sa transcription. Ceci est inhibé par l'acide gras palmitate. Dans la première partie des travaux effectués dans le cadre de cette thèse, nous avons identifié deux mécanismes de régulation de la transcription du gène de l'insuline: le premier via ERK1/2 (de l'anglais pour *extracellular-signal-regulated protein kinases 1 and 2*) et le second par l'enzyme PASK (pour *per-arnt-sim kinase*). Nous avons également mis en évidence l'existence d'un troisième mécanisme impliquant l'inhibition de l'expression du facteur de transcription MafA par le palmitate. Nos travaux indiquent que la contribution de la signalisation via PASK est majeure. L'expression de PASK est augmentée par le glucose et inhibée par

le palmitate. Sa surexpression dans les cellules MIN6 et les îlots isolés de rats, mime les effets du glucose sur l'expression du gène de l'insuline ainsi que sur l'expression de PDX-1 et prévient les effets délétères du palmitate. Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons identifié un nouveau mécanisme par lequel PASK augmente la stabilité protéique de PDX-1, soit via la phosphorylation et l'inactivation de la protéine kinase GSK3 β (de l'anglais pour *glycogen synthase kinase 3 beta*).

Le glucose induit la translocation de PDX-1 du cytoplasme vers le noyau, ce qui est essentiel à sa liaison au promoteur de ses gènes cibles. L'exclusion nucléaire de PDX-1 a été observée dans plusieurs modèles *ex vivo* et *in vivo* de dysfonction de la cellule bêta pancréatique. Dans le dernier volet de cette thèse, nous avons démontré l'importance de l'utilisation de cellules primaires (îlots isolés et dispersés) pour étudier la translocation nucléaire de PDX-1 endogène étant donné que ce mode de régulation est absent dans les lignées insulino-sécrétrices MIN6 et HIT-T15.

Ces études nous ont permis d'identifier et de mieux comprendre les mécanismes régulant la transcription du gène de l'insuline via le facteur de transcription PDX-1. Les cibles moléculaires ainsi identifiées pourraient contribuer au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement du diabète de type 2.

Mots-clés : Diabète, îlots de Langerhans, cellule bêta pancréatique, gène de l'insuline, PDX-1, PASK, GSK3 β , ERK1/2, PKB, glucose, palmitate.

Abstract

Type 2 diabetes (T2D) is characterized by an impaired insulin secretion from the pancreas and a peripheral insulin resistance. In pancreatic β cells, glucose stimulates insulin production by inducing its gene transcription, translation and secretion. Chronic and simultaneous exposure of pancreatic β cells to elevated glucose concentrations in the presence of fatty acids lead to the deterioration of their function and the development T2D. However, the molecular mechanisms underlying this regulation are not completely known. The aim of this thesis is to identify the mechanisms involved in the regulation of insulin gene transcription.

PDX-1 is a major transcription factor that is essential for the development and function of the pancreas. In response to glucose, PDX-1 binds to the insulin gene promoter and triggers its transcription. This is inhibited by the fatty acid palmitate. In the first study, we identified two mechanisms of regulation of insulin gene transcription. An ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2*)- and a PASK (*Per-Arnt-Sim kinase*)-mediated pathways. We also show evidence of a third mechanism that involves inhibition of the expression of the transcription factor MafA by palmitate.

Our data indicate that PASK-mediated regulation of insulin gene transcription is a major pathway. PASK expression is induced by glucose and inhibited palmitate. Its overexpression in MIN6 cells and isolated rat islet mimics the effect of glucose on both insulin gene transcription and PDX-1 expression and it prevents the inhibitory effects of palmitate.

In the second part of this work, we identified a novel role of PASK in the pancreatic beta cell, by which it promotes PDX-1 protein stability, via phosphorylation and inactivation of GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 beta*).

Glucose induces PDX-1 nuclear translocation which is required for its binding to the promoter of its target genes. Nuclear exclusion of PDX-1 has been observed in both *ex vivo* and *in vivo* models of beta cell dysfunction. Here, we demonstrate the importance of using isolated islets to study endogenous PDX-1 nuclear translocation as this regulation is absent in the insulin secreting cell lines MIN6 and HIT-T15.

This work has led us to identify and better understand the mechanisms of regulation of insulin gene transcription via PDX-1. The molecular targets herein identified, may contribute to the development of new therapeutic approaches T2D treatment.

Keywords : Diabetes, islets of Langerhans, pancreatic β -cells, insulin gene, PDX-1, PASK, GSK3 β , ERK1/2, PKB, glucose, palmitate.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xxi
INTRODUCTION	1
Chapitre I : Le diabète.....	2
Historique.....	2
Statistiques	3
Diagnostic et classification	4
Le diabète de type 1	6
Le diabète de type 2	6
Pathogenèse du diabète de type 2 :	7
Étiologie du diabète de type 2 :.....	10
<i>Les facteurs génétiques</i>	10
<i>Les facteurs environnementaux</i>	12
Le diabète gestationnel.....	12
Les diabètes monogéniques	13
Autres formes de diabète.....	14

Chapitre II Le pancréas.....	15
Structure et morphologie.....	15
L'îlot de Langerhans	15
L'insuline	17
Structure du gène de l'insuline.....	17
Boîtes E.....	18
Élément C1.....	19
Boîtes A.....	19
Transcription du gène de l'insuline.....	20
PDX-1	20
BETA2/NeuroD1	20
MafA.....	21
Synthèse et sécrétion de l'insuline.....	22
Régulation de l'expression, de la synthèse et de la sécrétion de l'insuline .	26
Régulation épigénétique.....	26
Régulation positive	28
<i>Régulation par le glucose</i>	28
<i>Régulation hormonale</i>	28
Régulation négative.....	29
<i>Inhibition de la transcription du gène de l'insuline</i>	29
<i>Toxicité par le glucose</i>	29
<i>Toxicité par les acides gras</i>	30
<i>La glucolipotoxicité</i>	30
 Chapitre III PDX-1	 32
PDX-1 dans le développement et le maintien de la fonction du pancréas ...	32
PDX-1 dans la régulation du gène de l'insuline	34

PDX-1 dans la régulation de la sécrétion de l'insuline	35
Structure et régulation du gène de PDX-1	36
Structure et régulation de la protéine PDX-1	37
Régulation par le glucose	38
Phosphorylation de PDX-1	39
SUMOylation de PDX-1	42
Glycosylation de PDX-1	42
Ubiquitination et stabilité protéique.....	43
Translocation sub-cellulaire de PDX-1	44
Chapitre IV Principales voies de signalisation régulant l'expression	
du gène de l'insuline.....	47
Protéines kinases sensibles aux nutriments.....	47
L'AMP kinase	49
mTOR.....	50
PAS kinase	51
<i>Structure de la protéine PASK.....</i>	<i>51</i>
<i>Régulation et fonction de PASK.....</i>	<i>52</i>
Autres voies de signalisation majeures dans la cellule bêta pancréatique ...	55
ERK1/2.....	55
GSK3 β	57
PI3K/Akt	58
Chapitre VI Mise en contexte de la thèse	59

RÉSULTATS62

Article 1: Implication des protéines PASK, PI3K et ERK1/2 dans la
régulation du gène de l'insuline 63

Mise en contexte : 63

Article 2: Rôle de PAS kinase dans la régulation de la stabilité protéique
de PDX-1 106

Mise en contexte : 106

Article 3 Régulation de la localisation sub-cellulaire de PDX-1 par le
glucose 138

Mise en contexte : 138

DISCUSSION.....164

1. Implication des protéines PKB, ERK1/2 et PASK dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline..... 167

Rappel des principaux résultats..... 167

La transcription du gène de l'insuline..... 168

PKB/Akt..... 168

Régulation par le glucose 168

Régulation par les acides gras..... 169

ERK1/2..... 170

Régulation par le glucose 170

Régulation par le palmitate 171

Régulation de la transcription du gène de l'insuline..... 172

PAS kinase	177
<i>Régulation par le glucose</i>	177
<i>Régulation par le palmitate</i>	178
<i>Régulation de l'expression du gène de l'insuline</i>	179
2. Régulation de la stabilité de PDX-1 par PASK et GSK3β	182
Rappel des principaux résultats.....	182
Régulation de la phosphorylation de PDX-1	183
3. Régulation de la translocation nucléaire de PDX-1.	186
Rappel des principaux résultats.....	186
Les modèles expérimentaux.....	186
Régulation de la translocation nucléaire de PDX-1	187
PERSPECTIVES	190
1. La régulation par le palmitate et les céramides	191
La phosphorylation de PDX-1	193
La stabilité de PDX-1 et implication de Pcif1	193
2. MafA et C/EBPβ	194
3. PAS kinase et GSK3β : cibles thérapeutiques	195
ANNEXE	164
Article 4 La glucolipototoxicité dans la cellule bêta pancréatique.	xxii

Liste des tableaux

Tableau I : Critères de diagnostic du diabète selon le guide de l'Association Canadienne du Diabète	5
--	---

Liste des figures

Figure 1: Détérioration de la fonction bêta pancréatique.....	9
Figure 2: Anatomie du pancréas et îlot de Langerhans.....	16
Figure 3: Régulation de la transcription du gène de l'insuline.....	18
Figure 4: Biosynthèse de l'insuline	24
Figure 5: Sécrétion de l'insuline.....	25
Figure 6: Les niveaux de régulation de l'insuline par le glucose	27
Figure 7: Représentation schématique de la structure du facteur de transcription PDX-1	38
Figure 8: Structure et mode de régulation de PAS kinase	48
Figure 9: Les principales voies de signalisation dans la cellule bêta pancréatique	53
Figure 10: Le palmitate bloque la réduction de la phosphorylation de PDX-1 sur résidus sérine.....	192
Figure 11 : Résumé des principaux résultats de cette thèse.....	198

Liste des abréviations

α	Alpha
β	Bêta
δ	Delta
ε	Epsilon
γ	Gamma
4E-BP1	Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AGEs	Advanced glycation end-products
AGJ	Anomalie de la glycémie à jeun
AHR	Aryl hydrocarbon receptor
Akt/PKB	Protéine kinase B
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
AMPK	AMP-activated protein kinase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
bHLH	Basic helix-loop-helix
BTB	Tramtrack bric-à-brac
bZIP	Basic leucine zipper
C/EBP β	CCAAT-enhancer-binding protein beta
Ca ²⁺	Atomes de calcium
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
Canal Ca ²⁺	Canal calcique voltage dépendant

Canal K _{ATP}	Canal potassique dépendant de l'ATP
CAPN10	Calpain-10
CBP	cAMP-response-element-binding protein binding protein
CK2	Casein kinase II
CREB	cAMP-response-element-binding protein
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DT2	Diabète de type 2
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ERK1/2	Extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2
Fox	Forkead box
FoxO1	Forkead box O1
FoxO3a	Forkead box O3 alpha
FoxO4	Forkead box O4
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLP-1R	Glucagon-like peptide 1 receptor
GLUT2	Glucose transporter 2
GLUT4	Glucose transporter 4
GS	Glycogen Synthase
GSF	Glucose sensitive factor
GSK3 β	Glycogène synthase kinase beta
GWAS	Genome-wide association studies
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC1	Histone désacétyltransférase 1
HDAC2	Histone désacétyltransférase 2
HHEX	Hematopoietically-expressed homeobox
HIPK-2	Homeodomain interacting protein kinase 2
HIPK-2	Homeodomain-interacting protein kinase 2

HIT-T15	Hamster insulin secreting cell line T14
HLA	Human leukocyte antigen
HNF1- α	Hepatocyte nuclear factor 1 alpha
HNF1- β	Hepatocyte nuclear factor 1 beta
HNF-3 β	Hepatocyte nuclear factor 3 beta
HNF4- α	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha
hPASK	L'isoforme humain de PASK
IAPP	Islet amyloid peptide
IAPP	Islet amyloid polypeptide
IDX-1	Islet duodenum homeobox 1
IG	Intolérance au glucose
IGF-1	Insulin growth factor 1
INS-1	Insulin secreting cell line 1 (lignée de cellules bêta pancréatiques de rat)
IPF-1	Insulin promoter factor 1
IUF-1	Insulin upstream factor 1
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
kDa	Kilodalton
KD-hPASK	Kinase-dead human PASK
MafA	Mammalian homologue of avian MafA/L-Maf
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MIN6	Mouse insulinoma 6 (lignée de cellules bêta pancréatiques de souris)
MODY	Maturity-onset diabetes of the young
MRG1	Melanocyte-specific gene
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTOR	Mammalian target of rapamycin kinase

NAC	N-acetyl-L-Cysteine
NeuroD1	Neurogenic differentiation 1
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
OGT	O-linked GlcNac transferase
OGTT	Oral glucose tolerance test
p70S6K	p70 ribosomal S6 kinase
PA	Palmitate
PASK	Per (period)-ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)-Sim (single minded) kinase
PASK	Per-Arnt-Sim kinase
PBX1	Pre-beta-cell leukemia homeobox 1
PC1/3	Prohormone convertases 1 et 3
PC2	Prohormone convertase 2
Pcif1	PDX-1 C-terminal interacting factor 1
PCIF1	PDX-1 C-terminal interacting factor 1
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PDX-1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol 3,4,5-biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PP	Polypeptide pancréatique
PP2A	Protein phosphatase 2 A
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PS	Peptide signal
Psk 1 et 2	PAS kinase 1 et 2 (orthologues, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

Ran	Ras-related nuclear protein
ROS	Reactive oxygen species
SAPK	Stress activated protein kinase
SEN	Séquence (ou signal) d'exclusion nucléaire
Ser ⁿ	Résidus sérine à la position n
SHP	Small heterodimer partner
SLN	Séquence (ou signal) de localisation nucléaire
SNP	Single nucleotide polymorphism
SP1/3	Specificity protein 1
SPOP	Speckle-type POZ protein
STF-1	Somatostatin transcription factor 1
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
SV40	Simian virus 40
T2D	Type 2 Diabetes
TCF7L2	Transcription factor 7-like 2
TGFβ	Transforming growth factor beta
Thr ⁿ	Résidus thréonines à la position n
Tyr ⁿ	Résidu tyrosine à la position n
UDP	Uridine diphosphate
UDP	Uridinediphosphate
UDP-GlcNAc	Uridin diphosphate N-acetylglucosamine
Ugp1	UDP-glucose phosphorylase
Ugp1	UDP-glucosephosphorylase 1
USF-1	Upstream stimulating factor 1
USF-2	Upstream stimulating factor 2
UTP	Uridine triphosphate
UTP	Uridine triphosphate

WT-hPASK Wild-type human PASK
ZDF Zucker diabetic fatty

À ma fille,

Remerciements

Je dédie cette thèse à mes très chers parents envers qui j'exprime ma profonde gratitude. Merci à mon mari pour son soutien inconditionnel et sans qui je n'aurais certainement pas pu me rendre jusque-là. Merci à mon frère et mes sœurs pour leurs encouragements constants.

Mes sincères remerciements à mon directeur de recherche Dr. Vincent Poitout, pour son encadrement et son souci du détail qui m'ont poussée à toujours donner le meilleur de moi-même.

Merci à toute personne qui a contribué de proche ou de loin à la réalisation de ces travaux. Un merci particulier à tous les membres du laboratoire pour leur soutien technique et leurs précieux conseils. Je salue sincèrement tous mes collègues 'Angus' présents et anciens.

INTRODUCTION

Chapitre I : Le diabète

Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline et lorsque les tissus périphériques ne répondent plus adéquatement à l'action de l'insuline. Il en résulte une augmentation des concentrations de glucose dans le sang (hyperglycémie). Les symptômes de polyurie (besoin fréquent d'uriner), de polydipsie (soif intense) et de polyphagie (faim excessive) apparaissent alors. L'hyperglycémie chronique du diabète est associée à de sérieuses complications affectant les yeux, les reins, le système nerveux, le cœur et les vaisseaux sanguins.

Historique

Le diabète est l'une des maladies les plus anciennement connues. À l'époque de l'antiquité égyptienne, le Papyrus de Thèbes datant de l'an 1500 av. J-C décrit des symptômes identiques à ceux du diabète, soit une abondance anormale des urines et une soif intense entraînant un dépérissement du corps et la mort (1,2). En Inde, 400-500 ans av. J-C, les médecins ont constaté que l'urine des personnes diabétiques attirait les mouches et les fourmis et ont nommé cette maladie *madhumeha* qui veut dire « urine de miel » qu'ils diagnostiquaient en goûtant l'urine ou en comptant le nombre de fourmis qui y étaient attirées (3). 131-201 après J.C., Arétée de Cappadoce assigne pour la première fois à cette maladie le terme *diabetes* qui en grec veut dire « couler à travers », faisant référence au flux abondant d'urine (4). Ce n'est finalement qu'au 17^{ième} siècle que John Rollo rajoute pour la première fois le terme *mellitus* au mot diabète, qui provient du latin et du grec signifiant « miel » (5).

En 1776, le médecin anglais Matthew Dobson isole le sucre des urines et démontre que le sérum en contient aussi. Au 19^{ième} siècle, l'étudiant allemand Paul Langerhans découvre que le pancréas contient différents types de cellules qui sont regroupés en îlots. Ces groupes de cellules porteront son nom : les îlots de Langerhans. Le rôle du pancréas dans le maintien de la glycémie a finalement été mis en évidence par les allemands Oskar Minkowski et Josef Von Mering qui ont constaté que l'ablation de cet organe chez le chien entraîne le diabète et la mort qui s'ensuit très rapidement. Le diabète était ainsi jusque-là une maladie fatale et l'espérance de vie des personnes atteintes ne dépassait pas les quelques semaines, voire quelques mois. Les médecins prescrivaient alors une diète extrêmement faible en glucides, ce qui leur permettait de vivre encore quelques années tout au plus. Enfin en 1921, le chirurgien canadien Frederick Grant Banting, avec l'aide de son étudiant Herbert Best et du biochimiste James Collip ainsi qu'avec le soutien de John MacLeod, obtiennent des extraits pancréatiques aux propriétés hypoglycémiantes. L'un des premiers enfants soignés dès 1922 avec l'insuline isolée, un garçon de 14 ans, Ted Ryder, est décédé en 1993 à l'âge de 77 ans (6). En récompense à leur grande découverte, Banting et MacLeod reçoivent en 1923 le prix Nobel de Médecine et le partagent avec Best et Collip (7). L'insuline ne soigne pas le diabète, mais sauve de nombreuses vies et permet aux personnes atteintes d'avoir une espérance de vie et une qualité de vie presque normales.

Statistiques

Aujourd'hui, le diabète a atteint des proportions épidémiques. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime à 347 millions les personnes atteintes de diabète dans le monde. En l'an 2000, plus de 2 millions de canadiens étaient

atteints de diabète. Ils seraient plus de 3,5 millions en 2030 (8). À l'échelle nationale, 760 000 québécois sont diabétiques et près du quart de ces personnes l'ignorent (9).

Diagnostic et classification

Le diabète est une maladie du métabolisme des glucides. Son diagnostic a été pendant des décennies basé sur la quantité de glucose présente dans le sang, soit par sa mesure directe à l'état à jeun ou suite à une ingestion d'une dose de 75 g de glucose. La glycémie normale varie de 3.5 à 6.1 mmol/l de glucose. L'Association Canadienne du Diabète a récemment publié des recommandations dans lesquelles elle définit une intolérance au glucose par une glycémie à jeun égale ou supérieure à 7.0 mmol/L et égale ou supérieure à 11.1 mmol/L, 2 heures suivant l'ingestion de 75 g de glucose selon le test d'hyperglycémie provoquée, OGTT (de l'anglais pour *oral glucose tolerance test*) (Tableau 1) (10).

Un état de pré-diabète réfère à une situation d'intolérance au glucose et/ou à une anomalie de la glycémie à jeun. Ces conditions mettent le patient à risque de développer le diabète et ses complications, mais sont souvent réversibles suite à l'adoption d'une alimentation saine en plus de l'exercice physique (10).

Tableau I : Critères de diagnostic du diabète selon le guide de l'Association Canadienne du Diabète.

Anomalie de la glycémie à jeun (AGJ)

À jeun	6.1-6.9 mmol/l (110-125 mg/dl)
et	
2 h post-ingestion de 75 g de glucose	< 7.8 mmol/l (140 mg/dl)

Intolérance au glucose (IG)

À jeun	< 7.0 mmol/l (126 mg/dl)
et	
2 h post-ingestion de 75 g de glucose	≥ 7.8 et < 11.1 mmol/l (140-200 mg/dl)

Diabète

À jeun	≥ 7.0 mmol/l (126 mg/dl)
ou	
2 h post-ingestion de 75 g de glucose	≥ 11.1 mmol/l (200 mg/dl)

Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction des cellules bêta pancréatiques et la déficience totale en insuline. Cette forme de diabète touche 5 à 10 % de la population diabétique et nécessite des injections quotidiennes d'insuline tout au long de la vie du patient (8,11,12). En plus de la polyurie, de la polydipsie et la polyphagie, les symptômes incluent également la perte de poids soudaine, la fatigue et une vision embrouillée. Le diabète de type 1 se manifeste plus souvent chez les jeunes enfants où son apparition est plutôt rapide, mais peut également survenir chez l'adulte. La composante génétique joue un rôle majeur dans ce type de diabète. Par exemple, les variantes du gène HLA comptent pour environ 50 % des causes de prédisposition (13). Ce sont des polymorphismes qui affectent le complexe majeur d'histocompatibilité et qui entraînent donc des défauts dans le mécanisme auto-immun. Le diabète de type 1 peut également se développer suite à des infections virales (14,15).

Le diabète de type 2

Cette forme de diabète se caractérise par un défaut de sécrétion d'insuline par le pancréas ainsi que par une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline. Anciennement connue pour affecter des individus âgés de 40 ans et plus, cette maladie touche malheureusement aujourd'hui les enfants de plus en plus jeunes (8). Ceci est dû à une augmentation du taux d'obésité chez les enfants, conséquence de l'abondance de nourriture et le manque d'activité physique. Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle. En plus de l'âge et du surpoids, les individus susceptibles de la développer ont souvent un historique familial de diabète, ont une pression artérielle et un taux de

cholestérol élevés et manifestent une intolérance au glucose ou une anomalie de la glycémie à jeun (Tableau 1) (10). Les femmes ayant développé un diabète gestationnel (voir section diabète gestationnel) au cours de leur grossesse ou qui ont donné naissance à des bébés de plus de 4 kg sont également à plus grand risque de développer le diabète de type 2 (16).

i. Pathogenèse du diabète de type 2 :

L'organisme contrôle l'homéostasie du glucose en maintenant sa concentration physiologique normale dans le sang (Tableau I). Ainsi, en réponse à une augmentation du glucose, la cellule bêta pancréatique assure une sécrétion adéquate d'insuline qui, suite à sa liaison à son récepteur à la surface des cellules des tissus périphériques, permet le transport du glucose et ainsi son utilisation. Lorsqu'il y a une diminution de l'action de l'insuline sur les tissus périphériques, on parle alors de résistance à l'insuline. À ce stade, la cellule bêta pancréatique compense pour ce défaut en augmentant entre autre sa production d'insuline afin de répondre adéquatement aux besoins de l'organisme (figure 1). Lorsque ce mécanisme de compensation ne suffit plus à normaliser le taux de glucose sanguin, il y a alors un déclin de la fonction bêta pancréatique et apparition du diabète de type 2 (17,18).

Une première hypothèse suggère que la résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline précède l'apparition de l'hyperglycémie (19). Toutefois, il est aujourd'hui admis que chez les individus résistants à l'insuline, le diabète de type 2 ne se développe que lorsqu'en présence d'un défaut de la fonction bêta pancréatique (20-23). D'ailleurs, des études suggèrent qu'il y aurait détérioration de la fonction bêta pancréatique jusqu'à dix ans avant le

diagnostic du diabète de type 2 (24) au moment où la glycémie est encore normale (25). La détérioration de la fonction bêta pancréatique est aussi caractérisée par une perte de la masse bêta pancréatique résultant de l'apoptose des cellules (22,26). D'autre part, l'hyperglycémie elle-même, peut affecter la fonction bêta pancréatique ce qui engendre un cercle vicieux aggravant alors la progression de la maladie.

Les mécanismes régulant la compensation des cellules bêta pancréatiques en réponse à une résistance à l'insuline impliquent principalement une augmentation de la sécrétion de l'insuline ainsi qu'une augmentation de la masse bêta pancréatique (27-29). Le glucose ainsi que l'hormone incrétine GLP-1 (de l'anglais pour *glucagon-like peptide 1*) jouent un rôle primordial dans cette régulation (27). Ce sont des stimuli majeurs impliqués à plusieurs niveaux dans ces mécanismes de compensation, allant de la régulation de la transcription du gène de l'insuline à sa synthèse et sécrétion. Ceci inclut la régulation de l'expression et de l'activité des facteurs de transcription, tel PDX-1 (de l'anglais pour *pancreatic and duodenal homeobox 1*) (30-32) ainsi que la régulation de la maturation post-traductionnelle de l'insuline (33).

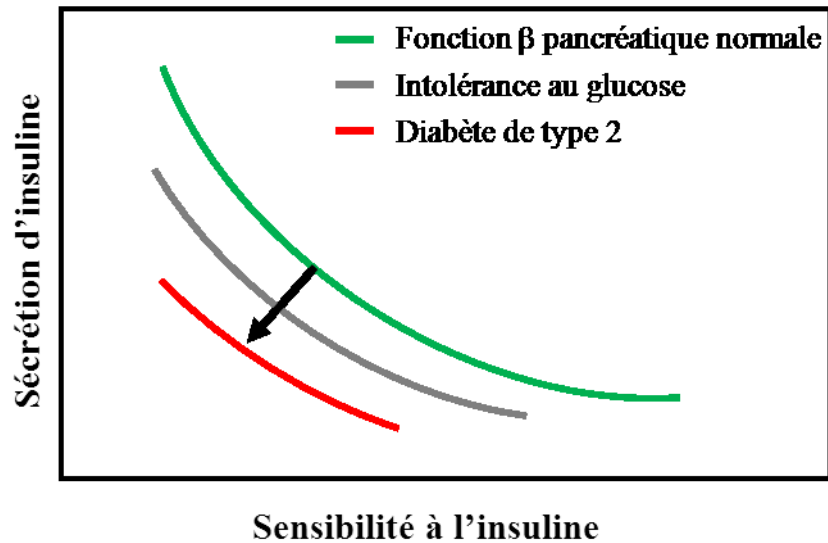


Figure 1: Détérioration de la fonction bêta pancréatique. Chez un individu sain (courbe verte), la cellule bêta pancréatique répond à une diminution de la sensibilité à l'insuline en augmentant sa sécrétion (compensation). Ces personnes deviennent intolérantes au glucose lorsque la cellule bêta pancréatique ne répond plus adéquatement à la résistance à l'insuline (courbe grise). Le diabète de type 2 peut alors résulter de ce déclin (courbe rouge). Adaptée de (18).

ii. Étiologie du diabète de type 2 :

Le diabète de type 2 est une maladie complexe et multifactorielle. Ainsi il est très difficile de déterminer la cause exacte de son apparition chez les individus. Chez plusieurs personnes, la composante génétique est très déterminante et suffisante alors que chez d'autres personnes, l'apparition et la progression de cette maladie dépendent des facteurs environnementaux.

Les facteurs génétiques

Le risque de développement du diabète de type 2 est étroitement lié à l'hérédité. Un risque de 2 à 4 fois plus élevé est associé à une historique familiale de diabète de type 2 (34). 38 % des personnes ayant un parent atteint de diabète de type 2 développent la maladie à l'âge de 80 ans et 60 % des personnes dont les deux parents en sont atteints la développent à l'âge de 60 ans (34,35). Quoique l'apparition de cette maladie peut être simplement le résultat de l'exposition des membres de la famille aux mêmes facteurs environnementaux tels l'alimentation, la sédentarité, etc., les études effectuées sur les jumeaux identiques ont permis de mettre en évidence l'importance de cette composante génétique (36). Par exemple, ces études ont montré qu'environ 90 % des jumeaux non atteints finissent par développer le diabète de type 2 lorsque l'autre jumeau l'est (37). D'autres études ont permis de mettre en évidence le rôle des gènes dans le développement du diabète de type 2. Par exemple, la variation de la prévalence de cette maladie entre les différents groupes ethniques est attribuée une prédisposition génétique plutôt qu'à des facteurs environnementaux (38).

Seuls quelques rares cas de diabète de type 2 sont associés à des mutations d'un seul gène. Autrement, le développement de cette maladie résulte de mutations de plusieurs gènes à la fois, dits de susceptibilité. Ces mutations, ou polymorphismes d'un nucléotide (SNP, de l'anglais pour *single nucleotide polymorphism*) ont un impact sur la fonction de la cellule bêta pancréatique, l'action de l'insuline ou sur le métabolisme énergétique en général (39). Un des premiers gènes de susceptibilité identifié est TCF7L2 (de l'anglais pour *transcription factor 7-like 2*) (40). Il s'agit d'un facteur de transcription qui joue un rôle important dans la signalisation Wnt, régulant entre autres la différenciation et la prolifération cellulaire (41). Les mutations SNP du gène TCF7L2 sont associées à une augmentation des risque de développement du diabète de type 2 de 1,5 fois chez les personnes hétérozygotes et de 2,4 fois lorsque les mutations sont homozygotes (40). Ceci engendre entre autres un défaut dans le développement des îlots pancréatiques, la survie des cellules bêta et la sécrétion d'insuline (42,43). Les études de type GWAS (de l'anglais pour *genome-wide association studies*) ont permis d'identifier plusieurs autres gènes de susceptibilité tels PPAR γ (de l'anglais pour *peroxysome proliferator-activated receptor gamma*) (44), CAPN10 (pour *calpain-10*) (45) et HHEX (pour *Hematopoietically-expressed homeobox*) (46). Toutefois, les éléments prédicteurs les plus sûrs restent toujours l'historique familial, l'augmentation de l'indice de masse corporelle, de la pression artérielle, des niveaux sanguins de triglycérides, d'apolipoprotéine A1 et d'enzymes hépatiques (47).

Les facteurs environnementaux

Le développement du diabète de type 2 chez un individu génétiquement susceptible dépend tout de même de facteurs environnementaux tels l'âge, le sexe, l'alimentation et la cigarette. Il existe clairement une corrélation positive entre le diabète de type 2 et le manque d'exercice physique ainsi que l'obésité et l'alimentation riche en calories (48). Ces mauvaises habitudes de vies aggravent la résistance à l'insuline et entraîne le dysfonctionnement de la cellule bêta pancréatique. Le rôle des facteurs environnementaux dans le développement du diabète de type 2 a été mis en évidence grâce aux études effectuées chez les populations nomades, et chez qui la prévalence du diabète était connue pour être minimale. C'est par exemple le cas de la population d'Indiens Pima chez qui l'exposition à un nouveau style de vie, moderne et urbain, entraîne une augmentation drastique du taux d'obésité et de diabète de type 2. Ces niveaux reviennent à la normale lorsque ces personnes retournent à leurs anciennes habitudes de vie (49). Des facteurs prénataux peuvent également influencer le développement du diabète de type 2. Par exemple, un retard dans le développement utérin, un faible ou un excès de poids à la naissance ainsi que la sous ou la suralimentation de la mère peuvent affecter l'expression des gènes du nouveau-né par modifications épigénétiques. Ce sont des altérations qui affectent l'expression des gènes sans impliquer un changement dans leur séquence ADN et qui conduisent à une défaillance dans l'homéostasie du glucose (50-52).

Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel se caractérise par une hyperglycémie diagnostiquée au cours d'une grossesse, mais qui habituellement disparaît suivant

l'accouchement. Cette forme de diabète touche de 3 à 20 % des grossesses, dépendamment des facteurs de risques auxquels la femme enceinte est exposée (53). Les femmes ayant été atteintes de diabète gestationnel ont un risque plus élevé de développer le diabète de type 2 dans les 5 à 10 années suivant l'accouchement (54,55). Le (s) nouveau-né(s) ont alors également un risque plus élevé de développer le diabète de type 2 dans leur vie en plus des risques de malformations congénitales et de mortalité périnatale (56-60). Les mécanismes responsables du développement de cette forme du diabète ne sont pas tout à fait clairs. Durant la grossesse, il est normal de développer de manière progressive une résistance à l'insuline. En effet, vers la fin du dernier trimestre, la sensibilité à l'insuline est réduite de moitié dû entre autres à l'augmentation de la masse adipeuse de la femme ainsi qu'aux hormones du placenta qui interfèrent avec l'action de l'insuline (61-63). Ainsi, l'addition des autres facteurs de risque énumérés précédemment peuvent entraîner le développement du diabète gestationnel.

Les diabètes monogéniques

Les diabètes monogéniques ou diabète MODY (de l'anglais pour *maturity-onset diabetes of the young*) sont des formes très rares de diabète (environ 1 à 2 % des cas de diabète). Elles sont plus fréquentes chez les enfants et les adolescents et résultent de mutations dominantes autosomiques qui affectent la fonction bêta pancréatique, plus particulièrement la production et la sécrétion d'insuline (64-66). Bien que certaines conditions affectant la sensibilité à l'insuline telle la grossesse peuvent aggraver l'hyperglycémie chez les patients qui en sont atteints, les diabètes de type MODY ne dépendent habituellement que de facteurs génétiques. Plusieurs de ces mutations

affectent des facteurs de transcription. C'est le cas du type MODY1 affectant le gène du facteur HNF4- α (de l'anglais pour *hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) (67), MODY3 pour HNF1- α (68), MODY4 pour PDX-1 (69) et MODY5 pour HNF1- β (70). Le type MODY2 résulte d'une mutation dans le gène de l'enzyme glucokinase (71).

Autres formes de diabète

Il existe d'autres formes de diabète et qui sont des conséquences d'autres conditions médicales telles la fibrose kystique (72), la pancréatite chronique (73), le syndrome de Cushing (74) ainsi que le cancer du pancréas (75) qui affectent la production de l'insuline et par conséquent l'homéostasie du glucose. Dans le cas du diabète associé à des endocrinopathies, les hormones produites en quantité anormale interfèrent avec l'action de l'insuline. C'est par exemple le cas de l'hormone de croissance dans le cas de l'acromégalie (76).

Chapitre II Le pancréas

Structure et morphologie

Le pancréas est une glande d'environ 15 cm de long, située derrière l'estomac, faisant partie du système digestif et ayant une fonction à la fois exocrine et endocrine. Cet organe est majoritairement composé de cellules exocrines, responsables de la production d'enzymes digestives envoyées vers le duodénum telles la trypsine, la chymotrypsine, l'amylase ainsi que les lipases. Environ 2 à 3 % des cellules qui composent le pancréas sont des cellules endocrines, présentes sous forme d'agrégats appelés îlots de Langerhans. Ces îlots sont richement vascularisés pour donner aux hormones sécrétées un accès rapide à la circulation. En effet, les îlots reçoivent à eux seuls, 10 à 15 % de la circulation sanguine du pancréas. Les îlots sont également innervés par les systèmes sympathique et parasympathique ce qui permet de moduler la sécrétion de l'insuline et du glucagon (77,78).

L'îlot de Langerhans

Un pancréas d'un individu en santé contient en moyenne 1 million d'îlots richement vascularisés. Ces îlots sont constitués de plusieurs types de cellules : Les cellules bêta, alpha, delta, gamma (ou cellules PP) et epsilon (figure 2). Un îlot contient environ 2000 cellules.

Les cellules bêta (β) constituent 60 à 80 % des cellules qui composent l'îlot de Langerhans et sont responsables de la production de l'hormone hypoglycémiant, l'insuline. Les cellules alpha (α) composent 15 à 20 % des

cellules de l'îlot de Langerhans et produisent le glucagon, l'hormone hyperglycémisante (79). Les cellules delta (δ), 3 à 10 % des cellules de l'îlot, produisent la somatostatine qui régule la fonction endocrine du pancréas en inhibant la sécrétion de l'insuline et du glucagon (80). Les cellules gamma (γ) ou cellules PP comptent pour 3 à 5 % de l'îlot et sécrètent le polypeptide pancréatique qui stimule la satiété et réduit l'apport en nutriment (81). Enfin, moins de 1 % des cellules de l'îlot sont des cellules epsilon (ϵ) qui produisent la ghréline. La ghréline stimule l'appétit et inhibe l'action de l'insuline (82).

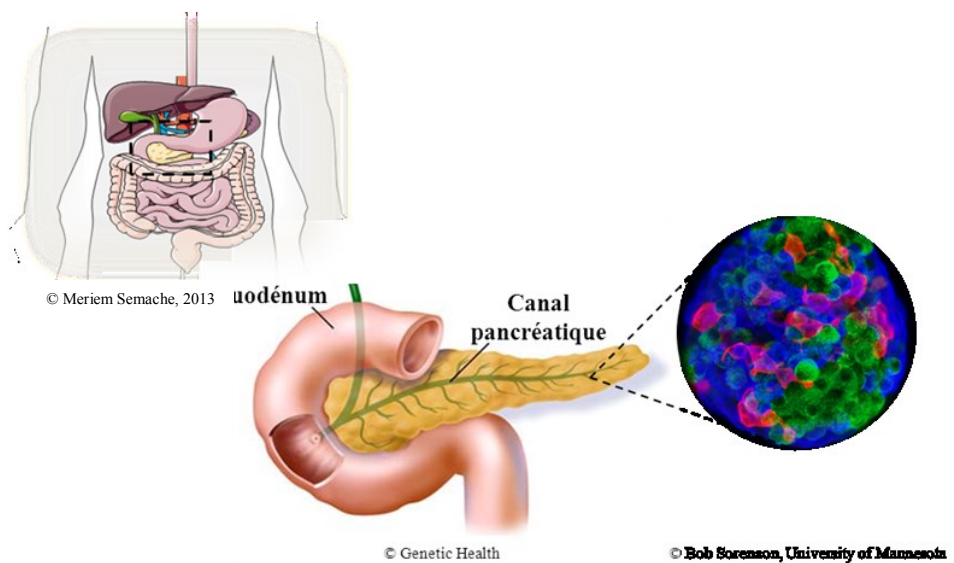


Figure 2: Anatomie du pancréas et îlot de Langerhans. Vue du pancréas et d'un segment du duodénum. Environ 2 à 3 % des cellules du pancréas sont des cellules endocrines composées entre autres de cellules bêta (β , en vert), sécrétrices d'insuline, de cellules alpha (α , en bleu), sécrétant le glucagon, et de cellules delta (δ , en rose), sécrétant la somatostatine. À partir de (83).

L'insuline

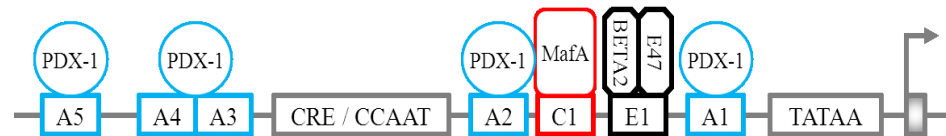
L'insuline est une hormone produite et sécrétée par les cellules bêta pancréatiques en réponse à une augmentation de la concentration de glucose dans le sang afin de la réduire à un niveau normal (Tableau I). Ainsi, elle stimule l'absorption du glucose par les tissus périphériques sensibles à l'insuline tels le muscle et le tissu adipeux. Bien qu'elle soit connue pour être exclusivement produite par le pancréas, de très faibles quantités ont toutefois été détectées dans le cerveau (84), le thymus (85), les glandes lacrymales (86) ainsi que les glandes salivaires (87). Cependant, le rôle de l'insuline exprimée dans ces tissus ainsi que sa régulation ne sont pas clairs. Elle pourrait dans certains cas jouer un rôle dans la signalisation hormonale essentielle au maintien de l'homéostasie énergétique (88,89). Elle pourrait également être impliquée dans la maturation du système immunitaire (90).

Les mécanismes de synthèse de l'insuline par la cellule bêta pancréatique sont complexes et hautement régulés depuis la transcription du gène jusqu'à la sécrétion de la protéine (91).

Structure du gène de l'insuline

Chez l'humain, le gène de l'insuline est situé sur le chromosome 11p15.5 (92). Sa séquence contient 3 exons et deux introns. Chez l'humain ainsi que chez la plupart des espèces, le gène de l'insuline est présent sous une seule forme alors que chez le rat (93) et la souris (94,95), il existe sous deux formes non alléliques I et II, la première ne possédant qu'un seul intron. Les séquences régulatrices situées de 300 à 400 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription du gène de l'insuline sont hautement conservées et se lient

à des facteurs de transcriptions dont l'expression de certains est exclusivement bêta pancréatique ce qui confère au gène de l'insuline sa spécificité tissulaire. Parmi ces motifs de liaison, les plus déterminants pour la régulation de la transcription sont les séquences E, C1 et A, liées par les facteurs BETA2 (ou NeuroD1, de l'anglais pour *Neurogenic differentiation 1*)/E47, MafA (de l'anglais pour *mammalian homologue of avian MafA/L-Maf*) et PDX-1, respectivement (figure 3).



© Meriem Semache, 2013

Figure 3: Régulation de la transcription du gène de l'insuline. La séquence du promoteur du gène de l'insuline s'étend sur environ 400 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription. Adaptée de (1).

Boîtes E

Deux séquences E, situées dans les régions entre -104 et -112 (E1) et entre -233 et -241 (E2), sont présentes sur le promoteur du gène de l'insuline du rat (figure 3). Elles sont caractérisées par la séquence consensus CANNTG et sont des sites de liaison des protéines à domaine bHLH (de l'anglais pour *basic helix-loop-helix*) (96). La boîte E1 est celle la plus conservée entre les deux et elle est également retrouvée chez l'humain (97,98). Sa mutation entraîne

une diminution significative du niveau basal de transcription du gène de l'insuline (99) ainsi qu'une inhibition de sa réponse au glucose (100).

Élément C1

Situé entre -118 à -107, l'élément C1 se caractérise par la séquence consensus CAGG, sur laquelle se fixent les facteurs de transcription de type bZIP (de l'anglais pour *basic leucine zipper*) tel MafA. Chez l'humain, la mutation de la séquence C1 diminue drastiquement l'activité du promoteur du gène de l'insuline (99) et inhibe sa réponse au glucose (100).

Boîtes A

Le facteur de transcription PDX-1 a été identifié par EMSA (de l'anglais pour *electrophoretic mobility shift assay*) ou essai à retardement sur gel pour s'être lié à trois régions du promoteur du gène de l'insuline humain et qui sont situées aux positions -77 à -84, -210 à -217 et -313 à -320 (101). Initialement connues sous le nom de séquences CT puis en tant que boîtes A (102), ces séquences sont aujourd'hui au nombre de 5, A1 à A5 (figure 3). Elles contiennent toutes la séquence TAAT, spécifique à la liaison des facteurs de transcription à homéodomaine, excepté la boîte A2 qui, elle, est composée de la séquence GGAAAT (103). La boîte A3, comprenant la région -196 à -201, est une des séquences les plus déterminantes de l'activité du promoteur, car sa mutation entraîne l'effet le plus significatif sur la transcription du gène de l'insuline induite par PDX-1 (104-106). C'est également la séquence la plus conservée chez tous les mammifères, ce qui fait valoir son rôle dans la stimulation du gène de l'insuline par PDX-1 (107).

Transcription du gène de l'insuline

La transcription du gène de l'insuline est sous le contrôle d'une multitude de signaux responsables d'une régulation positive ou négative, répondant et s'adaptant aux variations dans la disponibilité des nutriments. Ceci est principalement orchestré par les trois facteurs de transcription clés : PDX-1, MafA et BETA2/NeuroD1.

PDX-1

Étant donné l'intérêt de cette thèse pour le mode de régulation de PDX-1, ce dernier sera traité à part dans le prochain chapitre.

BETA2/NeuroD1

BETA2 ou NeuroD1 fait partie de la famille des facteurs de transcription à motif bHLH (de l'anglais pour *basic helix-loop-helix*). C'est une protéine de 335 acides aminés qui doit former un hétérodimère avec la protéine E47 pour pouvoir se lier à la boîte E du promoteur de gène de l'insuline. Son effet est synergique avec celui de PDX-1 (108). Son activité est augmentée par sa liaison à l'histone acétylase p300 ou à la protéine CBP (de l'anglais pour *CREB [cAMP-response-element-binding protein]-binding protein*) (108) et réprimée lorsque lié à la protéine SHP (de l'anglais pour *small heterodimer partner*) (109). Le glucose stimule la translocation nucléaire ainsi que l'activité de NeuroD1 via sa phosphorylation par les protéines kinases ERK1/2 (de l'anglais pour *extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2*) (110) et GSK3 β (de l'anglais pour *glycogen synthase kinase 3 beta*) (111), son acétylation par p300 (112) ainsi que sa glycosylation par OGT (de l'anglais

pour *O-linked Glc Nac transferase*) (113). En plus de son expression dans la cellule bêta pancréatique, NeuroD1 est également détecté dans environ 2 % des cellules alpha (114) ainsi que dans les cellules neuronales (115). Des altérations dans la fonction du facteur de transcription NeuroD1 ont été associées à de nombreuses maladies telles l'ataxie, la surdité en plus du diabète de type 1 et 2 (116).

MafA

MafA (de l'anglais pour *mammalian homologue of avian MafA/L-Maf*) est un facteur de transcription appartenant à la famille Maf à motif en agrafes de leucine, bZIP (de l'anglais pour *basic zipper leucine*) nommé ainsi selon l'élément oncogène v-Maf, du rétrovirus aviaire oncogénique, AS42, isolé d'un fibrosarcome musculoaponeurotique chez la poule (117). Les protéines Maf sont divisées en deux catégories selon leur taille moléculaire : les petites (149 – 162 acides aminés), et les grandes (236 – 370 acides aminés). Ces dernières se distinguent par la présence d'un domaine de transactivation N-terminal (118). MafA fait partie de la famille des grandes protéines Maf. En plus de son expression dans les cellules bêta, il est également exprimé dans les yeux où il joue un rôle important dans le développement de la rétine (119) ainsi que dans le thymus où il pourrait avoir un rôle dans le développement de l'immunité. Dans la cellule bêta pancréatique, MafA régule l'expression du gène de l'insuline ainsi que celle de plusieurs autres gènes dont GLUT2 et Nkx6.1 (120). Les souris déficientes en MafA sont viables, mais développent un diabète dû à une diminution significative de l'expression des gènes bêta pancréatiques dont l'insuline (121). L'expression de MafA est nucléaire. En réponse au glucose, MafA se lie à la boîte C1 sur le promoteur du gène de

l'insuline. Le potentiel d'activation ainsi que la stabilité protéique de MafA varie selon l'état de phosphorylation de un ou plusieurs résidus spécifiques. Par exemple, il a été démontré que la phosphorylation des résidus sérine 65, 61, 49, 70 et thréonine 57 et 53, initiée par GSK3 β , entraîne l'induction de son activité de liaison au promoteur du gène de l'insuline (122). Par ailleurs, sa phosphorylation sur le résidu sérine 65 par GSK3 β a également été rapportée pour entraîner l'ubiquitination et la dégradation de MafA (123).

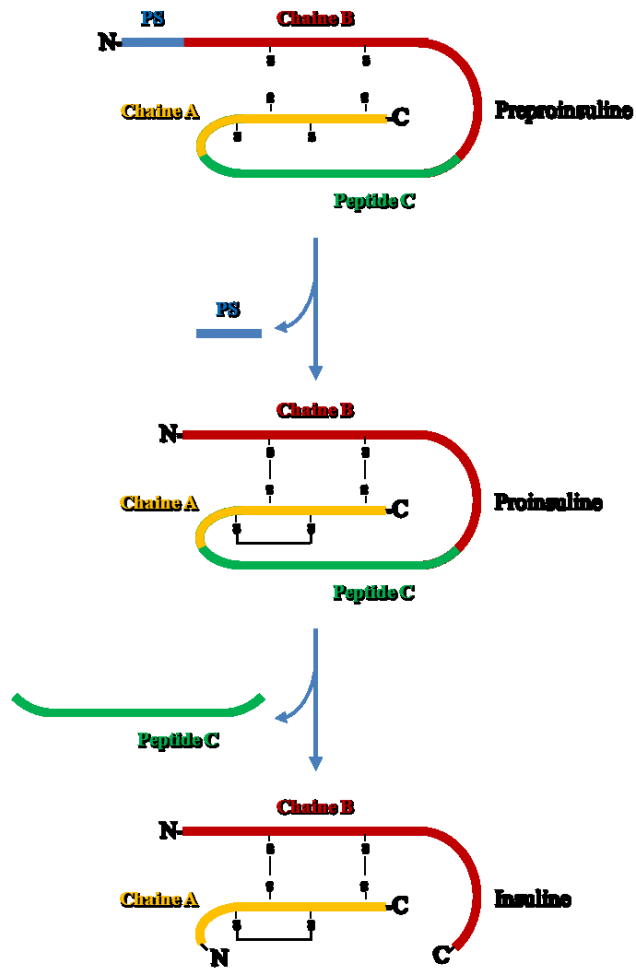
Synthèse et sécrétion de l'insuline

La structure tridimensionnelle du monomère d'insuline a été découverte pour la première fois en 1926 par cristallographie aux rayons X (124), mais sa structure hexamérique n'a été résolue que 40 ans plus tard (125,126).

La cellule bêta pancréatique transcrit l'ARN messenger de l'insuline en grandes quantités et de façon très rapide. Une stimulation de 1 heure au glucose suffit pour entraîner une augmentation de 10 à 20 fois les niveaux d'ARN messenger de la forme précurseur de l'insuline, la préproinsuline (figure 4). Cette première forme de l'insuline contient un peptide signal N-terminal, hydrophobe de 24 résidus. Ce peptide est caractéristique de presque toutes les protéines sécrétées et sert à les acheminer vers la machinerie sécrétoire (127-130). Le peptide signal est ensuite excisé et rapidement dégradé dans le réticulum endoplasmique pour générer la proinsuline. Cette dernière est formée de trois chaînes : la chaîne A, la chaîne B et la chaîne peptide C qui relie ces deux dernières. Enfin, le peptide C est à son tour clivé dans l'appareil de Golgi et stocké avec l'insuline ainsi formée suite à ce clivage dans les granules de sécrétion qui s'accumulent dans le cytoplasme.

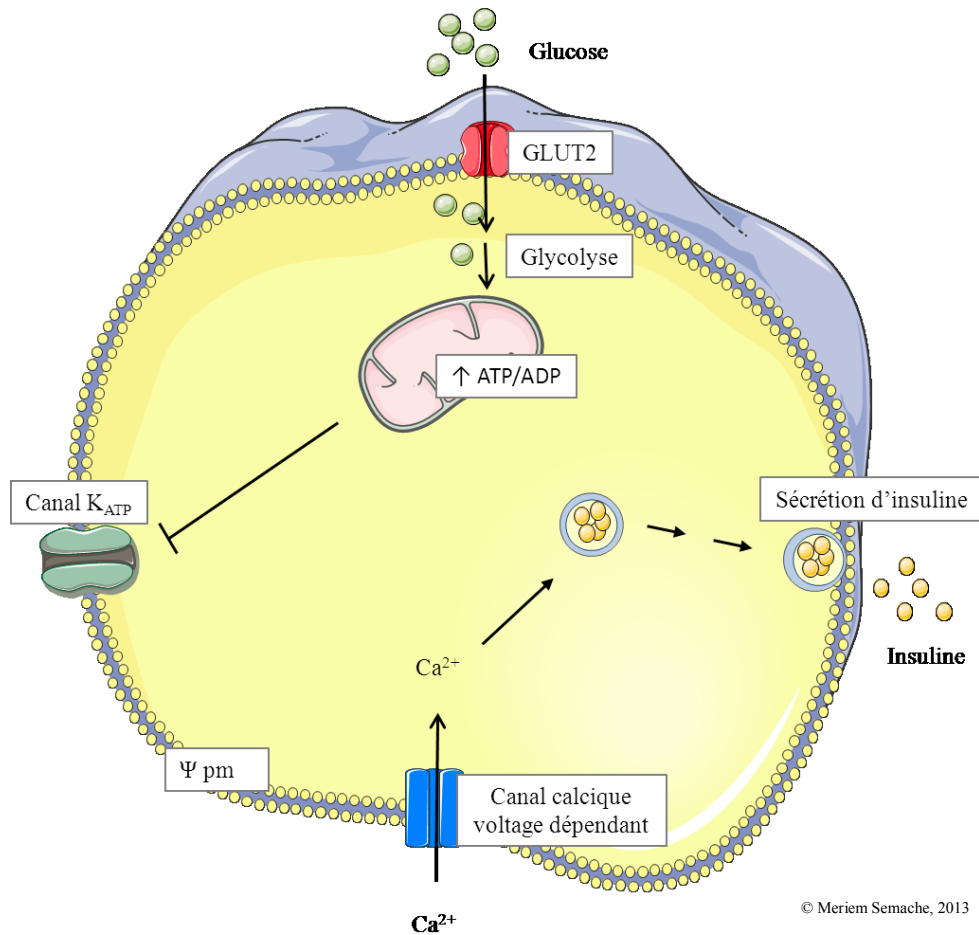
L'insuline ainsi produite est une petite protéine de 6 kDa composée des deux chaînes A et B, de 21 et 30 acides aminés, respectivement, reliées entre elles par trois ponts disulfures (figure 4). En réponse à une augmentation de la concentration de glucose, l'insuline est sécrétée par exocytose et envoyée vers la circulation sanguine.

La cellule bêta pancréatique sécrète l'insuline principalement en réponse à une augmentation des quantités de glucose dans le sang. Toutefois, une augmentation des niveaux d'autres macronutriments, comme les acides aminés, stimule également la sécrétion de l'insuline (figure 5). Un modèle classique schématisant les étapes clé de régulation de la sécrétion de l'insuline par le glucose a été établi selon plusieurs études, maintes fois répétées et validées. Le glucose entre dans la cellule bêta pancréatique par transport passif via le récepteur GLUT2. Son métabolisme entraîne une augmentation du ratio ATP/ADP qui induit la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP présents sur la surface des cellules. Il y a alors dépolarisation de la membrane cellulaire et ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, permettant l'entrée d'un flux de calcium extracellulaire. L'augmentation du calcium engendre alors l'exocytose de l'insuline vers la circulation sanguine.



© Meriem Semache, 2013

Figure 4 : Biosynthèse de l'insuline. La préproinsuline est composée d'un peptide signal, N-terminal (PS) ainsi que de deux chaînes A et B reliées entre elles par le peptide C. La proinsuline résulte du clivage du PS et la formation de ponts disulfures reliant les chaînes A et B. Une dernière modification post-traductionnelle consiste en le clivage du peptide C pour former l'insuline active. Adaptée de (131).



© Meriem Semache, 2013

Figure 5 : Sécrétion de l'insuline. Le glucose entre dans la cellule bêta pancréatique via le récepteur GLUT2. Son métabolisme entraîne une augmentation du ratio ATP:ADP ce qui inactive les canaux potassiques dépendants de l'ATP (Canal K_{ATP}). Il y a alors dépolarisation de la membrane (Ψ_{pm}) et ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée du calcium (Ca^{2+}) permet ensuite l'activation de l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline. Adaptée de (83,131).

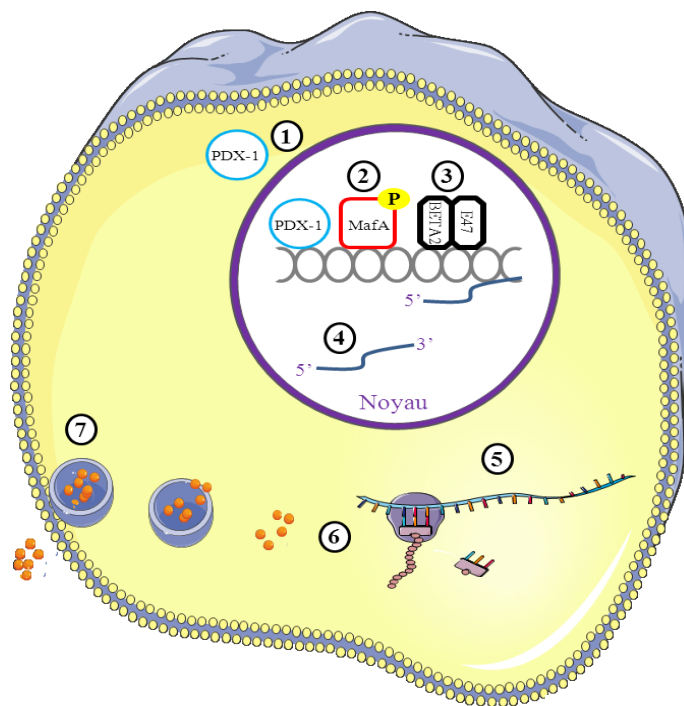
Régulation de l'expression, de la synthèse et de la sécrétion de l'insuline

Régulation épigénétique

Les modifications épigénétiques modulent la structure de la chromatine. Dans la cellule bêta pancréatique, ce mode de régulation permet son ouverture sous forme euchromatine, pour stimuler la transcription du gène de l'insuline. Les modifications épigénétiques ont lieu selon deux principaux mécanismes: la modification des histones, et la méthylation de l'ADN. Les résidus cytosine contenus dans la séquence dinucléotide CG sont cibles de méthylation. Ces résidus deviennent alors sites de liaison de facteurs de transcription répresseurs, ce qui permet le recrutement d'histones désacétylases et l'inhibition de l'expression du gène d'intérêt (132). Dans la cellule bêta pancréatique, les histones désacétylases HDAC-1 et HDAC-2 se lient à PDX-1 et inhibent la transcription du gène de l'insuline (133).

La modification des histones peut avoir lieu par phosphorylation, glycosylation, sumoylation, méthylation, acétylation et ribosylation (134). L'acétylation et la méthylation des résidus lysine des histones H3 et H4 sont les modifications épigénétiques les plus fréquentes. L'acétylation des histones est associée à une augmentation de la transcription des gènes, tandis que leur méthylation peut être impliquée tant dans l'activation que dans la répression des gènes (134). *Chakrabarti et al.* ont montré que le promoteur du gène de l'insuline est hautement acétylé uniquement dans la cellule bêta pancréatique ce qui est consistant avec la spécificité tissulaire de l'insuline (135). Cette acétylation est associée à la liaison de l'histone acétyltransférase p300 (135). Les histones H3K4 du promoteur du gène de l'insuline sont également hyperméthylés, ce qui est associé à une augmentation de la liaison de la

méthyltransférase Set7/9. PDX-1 interagit avec la Set7/9 sur le promoteur du gène de l'insuline. Ceci qui entraîne une augmentation de la liaison de la Polymérase II au promoteur et l'induction de son activité (136,137). Set7/9 est indispensable pour le maintien de la structure euchromatine du gène de l'insuline ainsi que celle d'autres gènes clés impliqués dans la transcription ainsi que la sécrétion de l'insuline (137).



© Meriem Semache, 2013

Figure 6: Les niveaux de régulation de l'insuline par le glucose. Le glucose régule la transcription du gène de l'insuline via la régulation de la translocation (1), la phosphorylation (2) et la liaison de facteurs de transcriptions au promoteur du gène de l'insuline (3). Le glucose régule également la stabilité et l'épissage de l'ARNm de la préproinsuline (4) ainsi que sa traduction (5), sa maturation (6) jusqu'à sa sécrétion (7). À partir de (83, 139-144).

Régulation positive

Régulation par le glucose

Le glucose est le principal régulateur de la fonction bêta pancréatique et de ce fait, régule la production de l'insuline depuis la transcription du gène jusqu'à la sécrétion de l'hormone (figure 6). Ainsi, en plus de stimuler la liaison et l'activité des facteurs de transcription (27,138), le glucose régule également l'épissage (139) et la stabilité de son ARNm (140). En effet, le glucose augmente la demie vie de l'ARN messenger (ARNm) de la préproinsuline de 29 à 77 heures (140) et ceci est médié par la séquence UUGAA ainsi que la séquence riche en pyrimidine, toutes deux situées dans la région 3'-URT de l'ARNm (141,142). Le glucose régule également la traduction et la maturation post-traductionnelle (143) de l'insuline jusqu'à sa sécrétion (144).

Régulation hormonale

L'insuline pourrait activer la transcription de son propre gène par régulation autocrine en se liant à son récepteur et en activant la voie PI3K ainsi que la voie CaM kinase (de l'anglais pour *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase*) (145) ou en stimulant la liaison de PDX-1 sur le promoteur de son gène (146,147). L'hormone incrétine, GLP-1, stimule l'expression du gène de l'insuline en augmentant l'expression du facteur de transcription PDX-1 ainsi que son activité de liaison sur le promoteur du gène de l'insuline (30,32). Enfin, l'hormone de croissance ainsi que la prolactine stimulent également la transcription du gène de l'insuline en plus de leur rôle dans la régulation de la prolifération des cellules bêta pancréatiques (148).

Régulation négative

Inhibition de la transcription du gène de l'insuline

Le facteur de transcription C/EBP β (de l'anglais pour *CCAAT-enhancer-binding protein beta*) est un répresseur de la transcription du gène de l'insuline. Son expression est augmentée dans des conditions supraphysiologiques de glucose ainsi qu'en réponse à une exposition prolongée dans des conditions de lipotoxicité induisant la mort cellulaire (149). C/EBP β agit via son hétérodimérisation avec la protéine E47 et empêche donc sa liaison avec BETA2 (150).

Toxicité par le glucose

Selon l'hypothèse de glucotoxicité, l'exposition chronique des cellules bêta pancréatiques à de hautes concentrations de glucose entraîne un défaut dans la fonction bêta pancréatique. Notamment, un défaut dans l'expression du gène de l'insuline (151-153) ainsi qu'une diminution significative de la réponse maximale de sécrétion d'insuline (152) ont été observés chez les personnes atteintes de diabète de type 2. Plusieurs études ont reproduit ces effets délétères du glucose dans différents modèles animaux (154-157). Les mécanismes à la base de cette glucotoxicité proposés incluent le stress oxydatif (158), l'inflammation (159), le stress du réticulum endoplasmique (160) ainsi que l'accumulation de l'IAPP (de l'anglais pour *islet amyloid polypeptide*) (161). L'IAPP est produite par les cellules bêta pancréatiques où elle inhibe la sécrétion de l'insuline et du glucagon. Dans des conditions toxiques, l'IAPP induit l'apoptose des cellules bêta pancréatiques via le stress du réticulum (162). Toutefois, les mécanismes les plus dominants seraient une

augmentation des molécules réactives de l'oxygène (ROS, de l'anglais pour *reactive oxygen species*) ainsi qu'une augmentation des produits terminaux de glycation (AGEs de l'anglais pour *advanced glycation end-products*) (158) qui conduisent à une diminution de la transcription du gène de l'insuline.

Toxicité par les acides gras

À court terme, les acides gras sont une importante source d'énergie pour la cellule bêta pancréatique, mais comme dans le cas du glucose, une hyperlipidémie chronique entraîne un défaut dans la fonction bêta pancréatique (163,164). Il a été montré que les acides gras, notamment le palmitate, inhibent l'expression du facteur de transcription PDX-1 à des concentrations intermédiaires de glucose (5.6 mM) (165). Toutefois, l'hypothèse prévalente est que leurs effets délétères n'ont lieu qu'en présence de concentrations élevées de glucose.

La glucolipotoxicité

De façon aiguë, les acides gras potentialisent la stimulation de la sécrétion de l'insuline par le glucose. Toutefois, dans un contexte de glucolipotoxicité, les cellules bêta pancréatiques sont exposées de manière chronique aux acides gras simultanément à de hautes concentrations de glucose. Ces conditions entraînent un défaut de la fonction bêta pancréatique allant de l'inhibition de la transcription du gène de l'insuline jusqu'au défaut de sécrétion de l'insuline, voire l'apoptose des cellules (Annexe I: *Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell*). Il est bien admis que les acides gras exercent leur effet délétère sur

ces mécanismes en présence de hautes concentrations de glucose (166-170) et plusieurs études ont rapporté ces observations (171-179).

L'exposition prolongée des cellules bêta pancréatiques aux acides gras en présence de hautes concentrations de glucose entraîne un défaut dans l'expression du gène de l'insuline via des mécanismes distincts de ceux affectant la sécrétion (165-167,175,179-181). Contrairement au palmitate qui inhibe à la fois l'expression et la sécrétion de l'insuline, l'oléate inhibe seulement la sécrétion de l'insuline. Nous avons en effet montré que la transcription du gène de l'insuline est médiée par la synthèse *de novo* des céramides, pour laquelle le palmitate est le seul substrat (175). Le palmitate n'affecte pas la stabilité de l'ARNm de l'insuline, mais diminue l'activité de liaison des facteurs de transcription PDX-1 et MafA à leur séquence respectives sur le promoteur du gène de l'insuline (179). Le palmitate entraîne également l'exclusion nucléaire de PDX-1 (179,180,182) et une diminution de son expression (183). Les niveaux d'ARNm de MafA sont également diminués (179). L'expression du facteur de transcription C/EBP β semble au contraire être induite dans ces conditions. Plusieurs des voies de signalisation impliquées dans ces mécanismes ont été identifiées. C'est par exemple, le cas des protéines kinases ERK1/2 et PASK, dont fait l'objet cette thèse.

Chapitre III PDX-1

Le facteur de transcription PDX-1 (de l'anglais pour *pancreatic and duodenal homeobox 1*) également connu sous les noms IUF-1 (*insulin upstream factor 1*), GSF (*glucose sensitive factor*), IPF-1 (*insulin promoter factor 1*), IDX-1 (*islet duodenum homeobox 1*) et STF-1 (*somatostatin transcription factor 1*) (92,138,184,185) est un facteur de transcription à homéodomaine qui joue un rôle central dans le développement du pancréas et dans la régulation de la fonction bêta pancréatique.

PDX-1 dans le développement et le maintien de la fonction du pancréas

Le rôle de PDX-1 dans le développement du pancréas est central. Chez l'embryon, PDX-1 est exprimé dès 8.5 jours dans l'endoderme dorsal et ventral qui donne naissance, entre autres, aux bourgeons pancréatiques (186,187). PDX-1 est ensuite exprimé dans toutes les cellules pancréatiques précurseurs qui donnent lieu aux tissus endocrines, exocrines ainsi qu'au canal pancréatique (188-190). Chez l'adulte, son expression devient restreinte aux cellules bêta pancréatiques ainsi qu'à une petite population de cellules delta. PDX-1 est également détecté dans les cellules acinaires ainsi que dans l'antre gastrique et le duodénum (191,192).

Les souris déficientes en *pdx-1* n'ont pas de pancréas et meurent suivant la naissance étant donné la déficience en insuline qui en résulte (193,194). Les souris hétérozygotes développent, quant à elles, un pancréas normal, mais

deviennent hyperglycémiques dû à une diminution significative de la production d'insuline. Il y a également une augmentation de l'apoptose des cellules bêta de ces souris ainsi qu'une diminution de la masse bêta pancréatique avec l'âge (195-197). Enfin, les souris dont le gène de PDX-1 a été invalidé spécifiquement dans la cellule bêta pancréatique développent également un diabète ce qui démontre le rôle de PDX-1 dans le maintien de l'identité des cellules bêta pancréatiques (198). Un phénotype similaire est observé chez l'humain. Plusieurs mutations du gène *IPF-1* sont associées au diabète (199-204). Certaines mutations hétérozygotes du gène *PDX-1* sont responsables de l'apparition de la forme monogénique du diabète, MODY4 (69,203,204). Elles incluent des mutations faux-sens, des insertions ainsi que des mutations causant un changement du cadre de lecture et sont responsables d'environ 1 % des diabètes monogéniques (69). Les individus porteurs d'une délétion homozygote SNP dans le gène de PDX-1 ont également une agénésie du pancréas (200). Ceci a été mis en évidence pour la première fois par une étude ayant rapporté la naissance d'un enfant dont le pancréas ne s'était pas développé. Un traitement avec de l'insuline ainsi que des enzymes hépatiques ont nettement amélioré l'état de santé de l'enfant qui s'est avéré porteur d'une mutation homozygote, une délétion d'une cytosine dans la séquence codante du gène *Ipf-1* (équivalent de *pdx-1* chez l'humain). La protéine PDX-1 ainsi synthétisée était tronquée et donc inactive. Elle était dépourvue du domaine de liaison à l'ADN ainsi que du signal de localisation nucléaire. Les parents, porteurs de la mutation hétérozygote, avaient développé la forme monogénique du diabète, MODY (69,200,205).

PDX-1 maintient l'identité et la fonction du pancréas. En plus de l'insuline, il régule l'expression du gène de l'amyline (ou IAPP, de l'anglais pour *islet*

amyloid polypeptide) (206), du transporteur du glucose GLUT2 (de l'anglais pour *glucose transporter 2*) (207) ainsi que de la glucokinase (208). PDX-1 régule également l'expression du facteur de transcription MafA (209) ainsi que sa propre expression (186,210). Dans les cellules delta, PDX-1 est essentiel à la régulation de l'expression de la somatostatine (211). PDX-1 agit également en tant que répresseur d'autres gènes afin de maintenir l'intégrité de la cellule bêta pancréatique. C'est le cas du gène du glucagon (198,212), spécifique aux cellules alpha ainsi que de la cytokératine K19, spécifique aux cellules du canal pancréatique (212). PDX-1 régule la transcription des gènes de manière tissu spécifique grâce à son interaction avec d'autres facteurs de transcription. Par exemple, dans les cellules acinaires, PDX-1 se lie avec les protéines PBX1 β (de l'anglais pour *pre-B-cell leukemia homeobox 1*) et MRG1 (de l'anglais pour *melanocyte-specific gene*), des protéines de la classe TALE à homéodomaine et qui ne sont pas exprimées dans la cellule bêta, pour activer le promoteur de l'élastase (213).

PDX-1 dans la régulation du gène de l'insuline

PDX-1 se lie à d'autres facteurs de transcription et cofacteurs pour activer le promoteur du gène de l'insuline de manière synergique (99,110,214-217). C'est par exemple le cas lors de sa liaison avec l'hétérodimère NeuroD1/E47 (216).

Un des mécanismes moléculaires par lesquels PDX-1 active la transcription du gène de l'insuline en réponse au glucose est la modification d'histones qui engendre un changement dans la structure de la chromatine en la rendant transcriptionnellement active. PDX-1 se lie à l'histone acétylase p300 qui

augmente l'acétylation des histones (108,218,219), ainsi qu'à l'histone méthyltransférase Set9 qui entraîne la diméthylation de l'histone H3K4 (220). Ces changements de chromatine permettent alors à la polymérase II d'adopter sa forme d'élongation, pSer² (résidu sérine 2 phosphorylé). En absence de PDX-1, la polymérase II reste sous sa forme d'initiation, pSer⁵ et ne peut donc pas transcrire le gène de l'insuline (220,221). L'activation de la transcription du gène de l'insuline par PDX-1 et p300 implique également la liaison du facteur de transcription avec la protéine co-activatrice Bridge-1 (222,223).

PDX-1 dans la régulation de la sécrétion de l'insuline

L'hormone gastrointestinale GLP-1 (de l'anglais pour *glucagon-like peptide 1*) est un stimulateur puissant de la sécrétion d'insuline induite par le glucose qui agit via l'augmentation de l'AMPc (224). GLP-1 est produit par les cellules intestinales. Il a été montré que le GLP-1 ainsi que l'agoniste de son récepteur, l'Exendine 4, stimulent, entre autres, l'expression du facteur de transcription PDX-1 (225). De plus, la suppression de l'expression de PDX-1 dans la lignée cellulaire bêta pancréatique de rats, INS-1, entraîne une diminution significative de l'expression du récepteur de cette incréatine, le GLP-1R (de l'anglais pour *GLP-1 receptor*). Par conséquent, la stimulation de l'AMPc induite par GLP-1 ainsi que celle induite par l'Exendine4, sont également diminuées (33). La suppression de PDX-1 dans ces cellules entraîne également une diminution de l'expression des prohormones convertases, PC1/3 et PC2, responsables de la maturation de la proinsuline en insuline (33). Ainsi, ces observations mettent en évidence le rôle potentiel de PDX-1 dans la stimulation de la biosynthèse et la sécrétion de l'insuline.

Structure et régulation du gène de PDX-1

Ipf-1, le gène humain du facteur de transcription PDX-1 est situé sur le chromosome 13q12.1 (92,226). Ceux de la souris et du rat sont sur le chromosome 5 (227) et 12 (228), respectivement. Le gène contient deux exons. Le premier code pour un domaine N-terminal contenant une séquence de transactivation et inclut une partie du motif homéodomaine. Le second exon code pour la seconde partie du motif homéodomaine, du côté C-terminal de la protéine (186,192).

La spécificité tissulaire de l'expression de PDX-1 est conférée par la séquence CACGTG (boîte E) à la position -104 du promoteur du gène *Ipf-1*. La liaison du facteur de transcription USF-1 (de l'anglais pour *upstream stimulating factor 1*) à cette séquence stimule l'activité du gène de PDX-1, tandis que la liaison du dominant négatif USF-2 à cette même séquence la réprime (229). USF-2 est également exprimé par la cellule bêta pancréatique, ce qui démontre l'implication d'une étroite et complexe régulation de l'expression de PDX-1 dans la cellule bêta pancréatique.

D'autres séquences sur le promoteur du gène de PDX-1 sont liées par les facteurs de transcription HNF-3 β (de l'anglais pour *hepatocyte nuclear factor 3 beta*) qui sont responsables de l'ouverture de la chromatine, permettant ainsi le recrutement d'autres facteurs également (210,230-232). PDX-1 régule sa propre expression en se fixant au motif TAAT de la séquence de liaison du facteur HNF3 β (210). Les facteurs de transcription HNF-1 α , SP1/3 (de l'anglais pour *specificity protein 1*) et NeuroD1/E47 se lient également au promoteur du gène de PDX-1 et régulent son expression (192). Enfin, les

glucocorticoïdes empêchent la liaison du facteur HNF3 β et inhibent donc la transcription du gène de PDX-1.

En plus de sa régulation par le glucose, l'expression et l'activité de PDX-1 sont également modulées par de nombreux autres nutriments, facteurs de croissance et hormones (31,32,225,233,234). Par exemple, le facteur TGF β (de l'anglais pour *transforming growth factor beta*) stimule la sécrétion de l'insuline via l'augmentation de l'expression nucléaire de PDX-1 et son effet est augmenté par le glucose (234). Le GLP-1 potentialise l'induction de la transcription du gène de l'insuline par le glucose. Il augmente l'expression et la translocation nucléaire de PDX-1, son activité de liaison au promoteur du gène de l'insuline ainsi que son potentiel de transactivation (30-32). Au contraire, les glucocorticoïdes régulent négativement l'expression du gène de l'insuline ainsi que l'expression de PDX-1 (235,236).

Structure et régulation de la protéine PDX-1

La forme humaine de la protéine PDX-1 est composée de 283 acides aminés, ce qui équivaut à un poids moléculaire de 31 kDa. Cependant, dû aux nombreuses modifications post-traductionnelles, PDX-1 peut être détecté à des tailles allant jusqu'à 46 kDa (133,237-239). Le domaine N-terminal de PDX-1 est un domaine de transactivation qui permet son interaction avec d'autres facteurs de transcription tel NeuroD1 ainsi qu'avec des co-activateurs telle l'histone désacétylase p300. Le domaine central de PDX-1 contient un motif de type homéodomaine délimité de chaque côté par une région riche en proline, qui permet sa liaison à l'ADN (191). Il contient également un signal

de localisation nucléaire, RRMKWKK, nécessaire à la translocation nucléaire de PDX-1 (figure 7) (240,241).

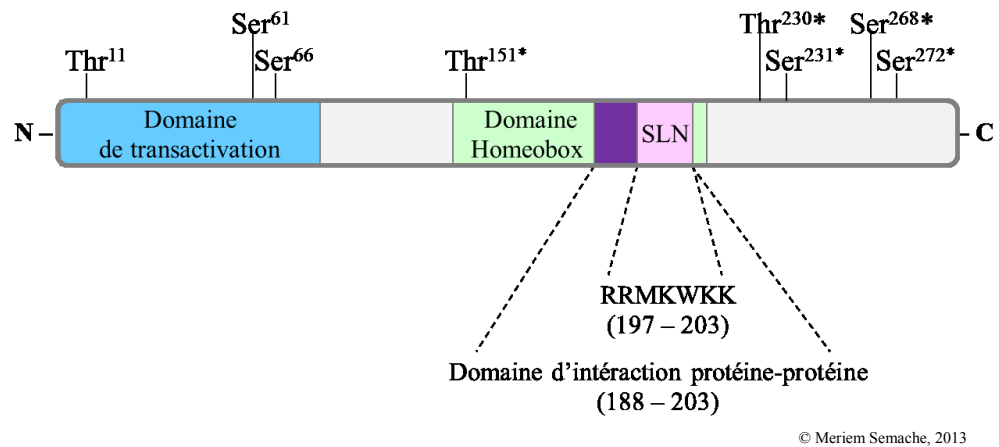


Figure 7: Représentation schématique de la structure du facteur de transcription PDX-1. PDX-1 est une protéine de 283 acides aminés. Les résidus indiqués sont cibles de phosphorylation par différentes kinases. Thr: thréonine, Ser: sérine, SLN: signal de localisation nucléaire. Les positions indiquées des résidus correspondent à celles retrouvées chez l'humain. Elles sont équivalentes à celles retrouvées chez le rat et la souris sauf exception: *Thr¹⁵¹, Ser²³⁰, Ser²⁶⁸ et Ser²⁷² correspondent à Thr¹⁵² et Ser²³¹, Ser²⁶⁹ et Ser²⁷³, respectivement chez la souris (110,146,218,237,242-252).

Régulation par le glucose

Le glucose régule de nombreuses modifications post-traductionnelles de PDX-1. Ceci inclut la phosphorylation (110,133,146,237,242-246,248,251-253), la SUMOylation (238) et la glycosylation (254,255). Ces modifications affectent

son activité de liaison au promoteur du gène de l'insuline (254-256) et son potentiel d'activation (257), sa translocation nucléaire (238), son expression ainsi que sa stabilité (245,258,259).

Phosphorylation de PDX-1

PDX-1 contient le long de sa séquence plusieurs résidus pouvant être phosphorylés (110,146,218,237,242-252). Ces résidus sont généralement situés dans son domaine de transactivation ainsi que dans son homéodomaine (figure 7). PDX-1 peut être phosphorylé par plusieurs protéines kinases incluant p38/SAPK (de l'anglais pour *stress-activated protein kinase*) (243,260), PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) (146), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (110,261), HIPK-2 (*homeodomain-interacting protein kinase 2*) (253) et GSK3 β (245,246). La phosphorylation de PDX-1 est une modification post-traductionnelle majeure et complexe, car elle permet de moduler la fonction de PDX-1 à plusieurs niveaux. Elle permet entre autres de réguler sa translocation nucléaire (243,262), son activité de liaison au promoteur du gène de l'insuline (146,244,263), sa liaison à des co-facteurs (133,264), son potentiel de transactivation (257) et sa stabilité protéique (246,249).

Une stimulation par le glucose entraîne une diminution de la phosphorylation globale de PDX-1 sur résidus sérine (246,249). Cependant, les conséquences de ce mode de régulation sur PDX-1 diffèrent dépendamment des résidus ainsi ciblés. Par exemple, la phosphorylation des résidus Ser⁶² et Ser⁶⁶ par ERK1/2, situés du côté N-terminal de la protéine, augmente le potentiel d'activation de PDX-1 (110), tandis que la phosphorylation des résidus Ser²⁶⁸ et Ser²⁷² du côté

C-terminal par GSK3 β entraîne la dégradation de PDX-1 (246). Le rôle des résidus ainsi phosphorylés diffère également selon la voie de signalisation activée. Par exemple, la phosphorylation de résidu Ser²⁶⁹ (correspondant à Ser²⁶⁸ chez l'humain comme dans le cas de (246)) par HIPK-2 entraîne l'exclusion de PDX-1 du noyau (253). De même, bien que la phosphorylation des résidus Ser⁶² et Ser⁶⁶ par ERK1/2 induise une augmentation du potentiel d'activation de PDX-1 (110), la phosphorylation de ces mêmes résidus par GSK3 β en réponse au stress oxydatif entraîne la dégradation de PDX-1 (245,265). Enfin, la phosphorylation de PDX-1 par SAPK et PI3K induit la translocation nucléaire de PDX-1 (242,243).

La phosphorylation joue un rôle important dans la régulation de la stabilité de PDX-1 (245,246,249). La protéine kinase GSK3 β joue un rôle majeur dans la dégradation de PDX-1 (245,246,249) et agit via la phosphorylation du résidu Ser²⁶⁸ sur la partie C-terminal de PDX-1 (246). Le glucose inactive GSK3 β et prévient donc cette phosphorylation et par conséquent la dégradation du facteur de transcription (246,249). Le glucose agit sur GSK3 β via l'activation de la protéine Akt/PKB (de l'anglais pour *protein kinase B*) (246) ou de PASK (de l'anglais pour *per-arnt-sim kinase*) (249). D'ailleurs, l'expression de PDX-1 est augmentée chez les souris déficientes en GSK3 β (266) et diminuée lorsque cette dernière est surexprimée (246,265). De même, l'expression de PDX-1 est diminuée chez les souris déficientes en PASK (249) et augmentée lorsque Akt est surexprimée (246). Il est important de noter que la phosphorylation de PDX-1 sur le résidu Ser²⁶⁹ par l'enzyme HIPK-2 (de l'anglais pour *homeodomain interacting protein kinase 2*) n'affecte pas sa stabilité (247), ce qui suggère que l'une et/ou l'autre de ces deux enzymes phosphorylent également d'autres sites.

Enfin, la phosphorylation de PDX-1 par la protéine kinase CK2 (de l'anglais pour *casein kinase II*) sur le résidu Ser²³² est également impliquée dans la régulation du potentiel de transactivation du facteur de transcription (252).

Peu de données ont été rapportées quant à la phosphorylation de PDX-1 sur résidus thréonine. Le résidu Thr¹¹ a été identifié comme cible de phosphorylation par la protéine kinase dépendante de l'ADN, DNA-PK (de l'anglais pour *DNA-dependent protein kinase*). Bien qu'il soit situé dans le domaine de transactivation, il ne semble pas être impliqué dans l'activité de liaison de PDX-1 au promoteur du gène de l'insuline ni dans son potentiel de transactivation. Il affecterait plutôt sa stabilité protéique en réponse au stress induit par des radiations UV (248). Le résidu Thr¹⁵² serait également phosphorylable par PASK (251), mais son rôle potentiel *in vivo* a toutefois pas encore été démontré (251).

PDX-1 est phosphorylé *in vitro* par PKC (de l'anglais pour *protein kinase C*) sur résidus Thr²³¹ et Ser²³² ce qui pourrait réguler son activité de liaison au promoteur du gène de l'insuline (267). L'implication de la protéine kinase JNK (de l'anglais pour *c-Jun NH2-terminal kinase*) dans la régulation de la translocation nucléaire de PDX-1 par phosphorylation et changement de conformation a également été proposé dans un contexte de stress oxydatif (268), mais cette hypothèse reste à valider.

SUMOylation de PDX-1

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'addition d'un motif SUMO (de l'anglais pour *small ubiquitin-like modifier*) aux protéines pour réguler leur fonction (269). Elle cible entre autres les molécules impliquées dans la réparation de l'ADN, l'organisation de la chromatine, la transcription ainsi que la translocation sub-cellulaire et elle est réversible. Ainsi, il a été montré que la SUMOylation de PDX-1 se fait par l'ajout de SUMO-1, une protéine d'environ 12 kDa (238), ce qui expliquerait la modification importante du poids moléculaire de PDX-1 qui varie de 31 à 46 kDa en réponse à une stimulation au glucose (238,243). Ceci permettrait la translocation nucléaire de PDX-1 ainsi que l'activation de la transcription du gène de l'insuline (238). Il est à noter cependant qu'il s'agit là de la seule étude ayant rapporté ce mode de régulation et que ses conclusions ont été réfutées par d'autres groupes (237,239). Le rôle potentiel de la SUMOylation dans la régulation de PDX-1 *in vivo* reste alors à confirmer.

Glycosylation de PDX-1

Une petite partie (2 à 3 %) du glucose métabolisé à l'intérieur de la cellule bêta pancréatique est redirigée vers la voie des hexasamines (270). L'UDP-GlcNAc (de l'anglais pour *uridine diphosphate N-acetylglucosamine*) est un produit dérivé de ce mécanisme et sert de substrat pour l'enzyme OGT qui le lie à un résidu sérine ou thréonine de protéines ayant des propriétés de translocation nucléocytoplasmique (254,255). Ainsi, il y a une compétition entre la glycosylation et la phosphorylation pour les mêmes résidus (271). Dans la cellule bêta pancréatique, le glucose augmente la glycosylation des

protéines (272,273). En réponse au glucose, PDX-1 est O-glycosylé (254,273) ce qui corrèle avec son activité de liaison à l'ADN (254,273).

Ubiquitination et stabilité protéique

Le niveau d'expression de PDX-1 dans la cellule bêta pancréatique est critique et sous haute régulation. En effet, de petits changements dans la quantité de ce facteur de transcription peuvent avoir des conséquences majeures sur la fonction endocrine du pancréas comme en témoignent les diverses études ayant rapporté des mutations hétérozygotes de PDX-1 (199-202). Ainsi, le glucose augmente l'expression de PDX-1 (176,245,246,249,274) et maintient sa stabilité protéique tandis que l'acide gras palmitate inhibe les effets du glucose sur son expression (176,274). En absence de stimulation au glucose, la protéine Pcif1 (de l'anglais pour *PDX-1 C-terminal interacting factor 1*) se lie au domaine C-terminal de PDX-1 (275,276). Pcif1, également connu sous l'acronyme SPOP (de l'anglais pour *speckle-type POZ protein*), appartient à la famille des protéines à domaine BTB (pour *tramtrack*, bric-à-brac). Ce sont des adaptateurs spécifiques aux complexes d'ubiquitine ligase contenant la protéine d'échafaudage Cul3 (277,278). Le complexe Pcif-1/Cul3 se lie à PDX-1 et entraîne donc sa dégradation par le complexe du protéasome (279). Les mécanismes de régulation de l'interaction de Pcif1 avec PDX-1 ne sont toutefois pas connus. Néanmoins, le niveau d'expression de Pcif-1 est inversement proportionnel à celui de PDX-1 (279). En effet, la baisse de l'expression de Pcif-1 chez les souris *Pdx1*^{+/-} normalise le niveau d'expression de PDX-1 en plus de restaurer la fonction bêta pancréatique (279).

Translocation sub-cellulaire de PDX-1

Appartenant à la famille des protéines à homéodomaine, capables de lier l'ADN, et ayant une séquence de localisation nucléaire RRMKWKK, PDX-1 peut être vu comme étant une protéine exclusivement nucléaire. C'est d'ailleurs ce qui a été montré par quelques études où la localisation sub-cellulaire de PDX-1 était restée nucléaire malgré les variations dans la concentration du glucose (241,258,280). Ceci est concordant avec son activité de liaison aux protéines nucléaires HDAC-1 et HDAC-1 lorsque la transcription du gène de l'insuline est inhibée (133). D'ailleurs, le traitement à l'inhibiteur des phosphatases PP1, PP2A et PP2B, l'acide okadaïque, à bas glucose, empêche l'interaction de PDX-1 avec HDAC-1 et HDAC-2 et favorise son interaction avec l'histone acétylase p300 (133,218). D'autres études ont pourtant rapporté son expression cytoplasmique dans des conditions de faible concentration de glucose (242,243,281). PDX-1 serait alors transporté dans le noyau en réponse à une stimulation au glucose. Ceci peut être expliqué par l'existence de deux isoformes de PDX-1, comme démontré par Macfarlane et al. (243). À basses concentrations de glucose (3 mM) PDX-1 serait sous forme inactive d'un poids moléculaire de 31 kDa et exprimé dans le cytoplasme, alors qu'à des concentrations stimulantes (16 mM), PDX-1 se trouverait dans le noyau sous sa forme active, de 46 kDa.

Enfin, un troisième groupe d'observations indique plutôt une translocation intranucléaire, entre la périphérie et le nucléosome (218,247,251,262). Il a été par exemple montré que l'expression de PDX-1 colocalise avec l'expression des protéines des pores nucléaires à basses concentrations de glucose (262).

L'expression de PDX-1 est majoritairement nucléaire dans les cellules bêta pancréatiques exposées *ex vivo* à des concentrations stimulantes de glucose, (179,180). En revanche, des concentrations supra physiologiques de glucose (33.3 mM) peuvent entraîner l'exclusion de PDX-1 du noyau (282). Deux études ont examiné la localisation sub-cellulaire de PDX-1 dans les cellules bêta pancréatiques des souris *db/db* (282,283). Toutefois, ces données sont contradictoires puisque la première montre une expression cytosolique de PDX-1 tandis que la seconde rapporte une expression nucléaire de PDX-1. L'expression de PDX-1 a été montrée exclusivement cytosolique chez les donneurs atteints de diabète de type 2 (282).

L'exposition chronique des cellules bêta pancréatiques aux acides gras entraîne des effets délétères sur leur fonction. De même, le palmitate inhibe l'induction de l'expression de PDX-1 par le glucose (176,274) et entraîne son exclusion du noyau (179,274). PDX-1 est également exclu du noyau des cellules bêta pancréatiques de rats infusés simultanément avec du glucose et de l'Intralipide (180) ainsi que dans le noyau des cellules bêta pancréatiques de rats exposés à une diète riche en gras (282).

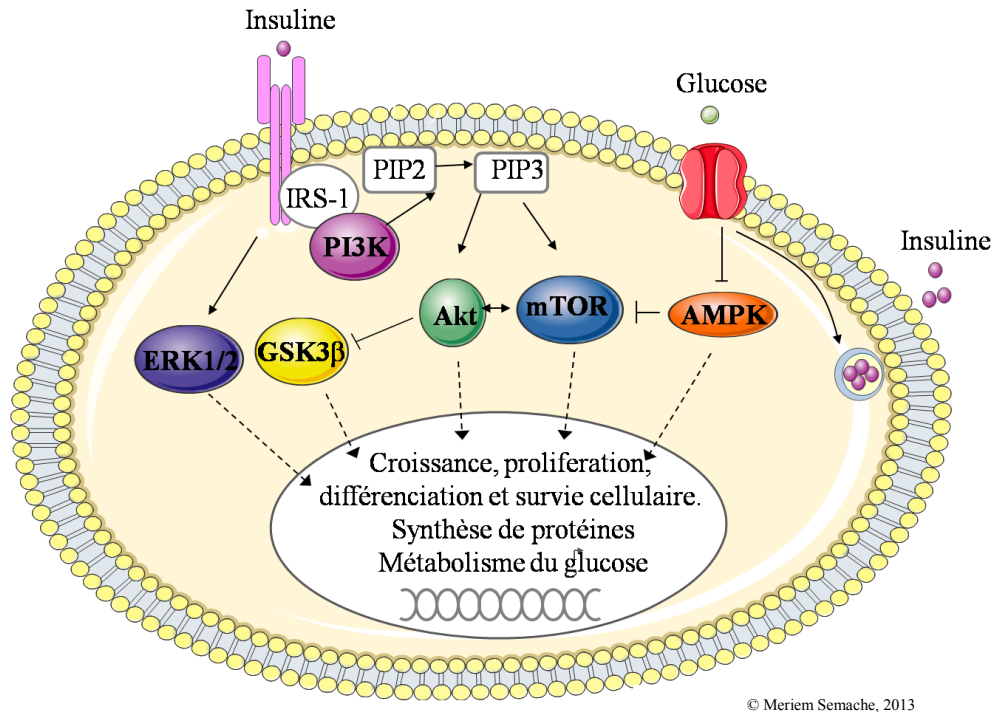
Le stress oxydatif affecte également la localisation sub-cellulaire de PDX-1 via la protéine kinase JNK. En effet, l'inactivation de JNK dans les cellules bêta pancréatiques bloque l'exclusion de PDX-1 du noyau en réponse à un traitement au H₂O₂ (268,284,285). De même, un traitement à l'antioxydant NAC (de l'anglais pour *N-acetyl-L-Cysteine*) permet de restaurer la localisation nucléaire de PDX-1 chez les souris *db/db* (285). PDX-1 possède dans sa séquence un motif classique, riche en résidus leucine, caractéristique du signal d'exclusion nucléaire et qui serait sensible au stress oxydatif. Sa

séquence est située à la position 82 à 94 chez la souris (268). Le signal de localisation nucléaire de PDX-1 ne serait pas, quant à lui, affecté dans ces conditions (268,284).

Chapitre IV Principales voies de signalisation régulant l'expression du gène de l'insuline

Protéines kinases sensibles aux nutriments

Le maintien de l'homéostasie énergétique est central pour tous les organismes vivants. C'est ce qui assure leur survie. Pour préserver leur fonction, les cellules sont dotées d'un système robuste et complexe qui leur permet de détecter les moindres variations dans la disponibilité des nutriments présents dans leur environnement (figure 8). Ainsi elles s'adaptent et ajustent leur métabolisme en conséquence. L'AMPK (de l'anglais pour *AMP-activated protein kinase*) ainsi que mTOR (de l'anglais pour *mammalian target of rapamycin kinase*) sont les deux protéines senseurs de nutriments et d'énergie les mieux caractérisées à ce jour. Dans les cas de diabète, d'obésité et de cancer, il y a une augmentation de l'activité de l'AMPK et une diminution de l'activité de mTOR d'où l'intérêt pour ces molécules en tant que cibles thérapeutiques potentielles (286-288). PAS kinase (pour *Per-Arnt-Sim kinase*) a été plus récemment identifiée comme nouvelle protéine kinase sensible aux variations nutritionnelles et aux besoins énergétiques de la cellule chez l'humain. Un progrès significatif a été fait dans le but de comprendre les mécanismes de régulation et d'action de PASK depuis les dernières années.



© Meriem Semache, 2013

Figure 8: Principales voies de signalisation impliquées dans le maintien de la fonction des cellules bêta pancréatiques. Le glucose est le principal inducteur de la production de l'insuline. L'insuline se lie à son récepteur à la surface des cellules bêta pancréatique pour activer une cascade de signalisation impliquant entre autres les protéines kinases ERK1/2, Akt et mTOR. Ces mécanismes peuvent à leur tour être modulés via le métabolisme du glucose et ont un effet sur la croissance, la prolifération, la différenciation cellulaire ainsi que sur la fonction bêta pancréatique. À partir de (438).

L'AMP kinase

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase composée d'une sous-unité catalytique α , d'une sous-unité régulatrice β et d'une sous-unité γ . L'AMPK est activée en réponse à une baisse d'énergie cellulaire provoquée par un état nutritionnel ou à un stress métabolique qui entraînent une baisse des niveaux d'ATP, plus précisément une élévation du ratio AMP:ATP. L'AMP est un régulateur allostérique de l'AMPK qui entraîne un changement de conformation de la sous-unité α et une augmentation de sa phosphorylation sur résidu Thr¹⁷² (289,290). L'activation de l'AMPK permet de basculer la fonction cellulaire d'une consommation d'ATP vers une production d'ATP pour rétablir l'homéostasie énergétique. Elle inhibe la biosynthèse des acides gras et du cholestérol, deux mécanismes majeurs de consommation d'énergie, et stimule l'oxydation des acides gras pour fournir l'ATP (289,291). L'activation de l'AMPK affecte également l'expression de gènes ainsi que la synthèse protéique, notamment dans le foie, le muscle, le tissu adipeux et le pancréas (291). L'AMPK pourrait jouer un rôle particulièrement important dans la régulation de la fonction de la cellule bêta-pancréatique étant donné l'importance des intermédiaires métaboliques générés lors des mécanismes de sécrétion d'insuline (292-295). D'ailleurs, les médicaments anti-diabétiques de la famille des thiazolidinediones (activateurs du récepteur PPAR- γ) ainsi que la metformine (hormone hypoglycémiant) agissent en partie via l'AMPK.

Plusieurs études ont montré que l'activation de l'AMPK entraîne l'inhibition de la synthèse et de la sécrétion de l'insuline *in vitro* et *in vivo* (291,296-298). D'autre part, l'AMPK est également connue pour phosphoryler des protéines nucléaires telle l'histone acétyltransférase p300 (299). Cependant, très peu

d'études ont été rapportées l'implication potentielle de PDX-1 dans ces mécanismes. Notamment, deux études ont mené à des résultats contradictoires. La première suggère que la diminution de l'expression de la glucokinase ainsi que du récepteur Glut2 par l'AMPK pourrait être due à l'inactivation du facteur de transcription PDX-1 par l'AMPK (300). La seconde étude montre, au contraire, que l'AMPK induit une augmentation de l'expression de PDX-1 via PPAR α (301). Des études plus approfondies seront nécessaires pour élucider le rôle exact de l'AMPK sur l'expression et l'activité de PDX-1 dans la cellule bêta pancréatique.

mTOR

mTOR est une sérine/threonine kinase de la famille des protéines PIKKs (de l'anglais pour *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*) qui joue un rôle important dans la régulation de la synthèse des protéines (302). Contrairement à l'AMPK, mTOR répond à un surplus de nutriments, plus particulièrement, des hormones (telle l'insuline), des facteurs de croissance (tel IGF-1, de l'anglais pour *insulin growth factor 1*) et des acides aminés (telle la leucine) (303). Lorsque activée, mTOR phosphoryle le facteur 4E-BP1 (de l'anglais pour *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein-1*) ainsi que la protéine kinase p70S6K (pour *p70 ribosomal S6 kinase*). Ceci permet l'activation des voies anaboliques et la croissance cellulaire (304). En ce qui concerne l'implication de mTOR dans le métabolisme énergétique, sa signalisation serait importante dans la réponse aux variations dans la disponibilité des nutriments en modulant l'action de l'insuline (305,306). Des études ont montré l'activation de la voie mTOR chez les animaux obèses (307) alors qu'une déficience en S6 kinase (S6K), une protéine cible de mTOR, protège les

animaux contre la résistance à l'insuline induite par une diète riche en gras (308). Plus particulièrement, l'insuline active S6K qui inactive IRS-1 par phosphorylation directe de son résidu sérine 270, ce qui entraîne une diminution du captage du glucose par les cellules musculaires (308).

PAS kinase

Tout comme l'AMPK et mTOR, PAS kinase (PASK) est une enzyme qui répond aux variations en quantités de macronutriments présents dans la cellule pour réguler le métabolisme énergétique et assurer son homéostasie. PASK contrôle le métabolisme du glucose en régulant son utilisation ou son stockage sous forme de glycogène. PASK régule également l'expression du gène de l'insuline, le métabolisme lipidique ainsi que la respiration mitochondriale (100,176,249,309,310).

Structure de la protéine PASK

La protéine comprend un domaine C-terminal sérine/thréonine kinase et un domaine N-terminal Per-Arnt-Sim (PAS) de régulation (311) (figure 9). Les domaines PAS sont des domaines sensibles aux nutriments et à divers stimuli tels la lumière, l'oxygène et l'état redox (312). Ils sont souvent activés suite à la liaison de petits ligands tels l'ATP, l'hème ou les flavines (313-316) à leur site hydrophobique (317). Chez l'humain, PASK est la seule protéine kinase contenant un domaine PAS connue à ce jour et contrairement aux autres protéines à domaine PAS des autres espèces, les ligands du domaine PAS de PASK sont encore inconnus (318,319).

Environ 7000 structures PAS ont été identifiées à ce jour (320). Leur composition primaire en acides aminés n'est pas très conservée (moins de 20 % d'homologie), mais leur structure est quant à elle très caractéristique et fonctionnellement très versatile. Elle consiste en cinq feuillets bêta anti-parallèles entourés de plusieurs hélices alpha (310). L'annotation « PAS » est un acronyme dérivé du nom de trois facteurs de transcription ayant ce motif dans leur structure protéique : PER, ARNT et SIM. PER (de l'anglais pour *period*) est un facteur de transcription impliqué dans l'horloge biologique (321). ARNT (de l'anglais pour *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) forme un hétérodimère avec le récepteur AHR (de l'anglais pour *aryl hydrocarbon receptor*) (322). Le facteur de transcription SIM (de l'anglais pour *single-minded*) quant à lui joue un rôle clé dans la neurogenèse (323).

Régulation et fonction de PASK

L'activité de la plupart des protéines kinases est modulée par phosphorylation/déphosphorylation d'un ou de plusieurs résidus se trouvant dans la boucle d'activation de leur domaine kinase (324). Le domaine catalytique de PASK contient dans sa boucle d'activation deux résidus thréonines autophosphorylables, Thr¹¹⁶¹ et Thr¹¹⁶⁵. Leur phosphorylation induit une augmentation significative de l'activité de PASK, mais leur mutation ne semble pas affecter l'activité basale de la protéine suggérant l'implication d'autres résidus (319,325). Les mécanismes exacts menant à l'activation de PASK sont à ce jour encore inconnus. Chez l'humain, PASK semble être activée par la liaison de petites molécules dérivées du métabolisme du glucose au domaine PAS. Ceci provoquerait un changement

de conformation de la protéine, dévoilant ainsi son domaine kinase ce qui résulte en son activation (figure 9) (326).

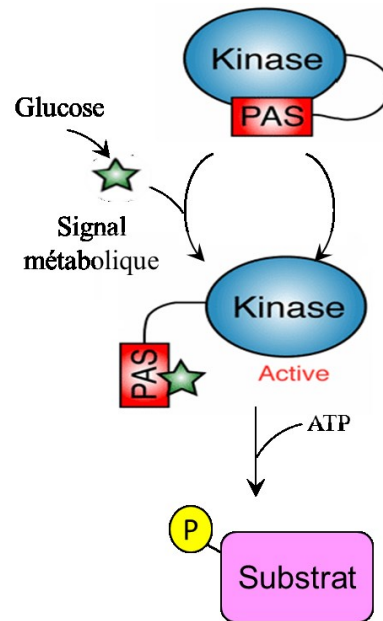


Figure 9: Structure et mode de régulation de PAS kinase. Adaptée de (308). Les mécanismes exacts d'activation de PAS kinase ne sont pas tout à fait connus. Une petite molécule dérivée du métabolisme du glucose se lierait au domaine PAS de PASK, ce qui entraînerait une séparation des domaines PAS et kinase. Ce changement de conformation est associé à une autophosphorylation du domaine kinase et activation de la protéine. PASK peut alors phosphoryler ses substrats sur résidus sérine et/ou thréonine.

Les génomes appartenant aux levures, à la drosophile et aux souris encodent tous une séquence de PASK homologue à celle de l'humain. Le rôle de PASK a d'abord été mis en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* où les protéines orthologues Psk1 et Psk2 ont été identifiées pour avoir un rôle

important dans la régulation du métabolisme du glucose dans le but d'assurer la croissance et la division cellulaire (319,326-329). L'enzyme Ugp1 (de l'anglais pour *UDP-glucose phosphorylase*) est un des quatre substrats les plus spécifiques à Psk2. Elle catalyse la conversion de l'UTP et du glucose-1-phosphate en UDP-glucose et en pyrophosphate (328). Psk2 phosphoryle Ugp1 sur Ser¹¹ *in vitro* et *in vivo* (327). La glycogène synthase Gsy2 est également un substrat connu de Psk2 et la déficience en *psk1* et *psk2* entraîne une accumulation du glycogène (319). Chez l'humain PASK ne phosphoryle pas l'Ugp1, mais semble toutefois contrôler la synthèse du glycogène puisqu'elle phosphoryle et inactive la glycogène synthase *in vitro* (330). Dans les cellules bêta pancréatiques de souris MIN6 ainsi que dans les îlots isolés à partir de pancréas de rats, le glucose induit l'expression et l'activité de PASK (100,176) alors que le palmitate bloque cette induction (176). À bas glucose (2 à 3 mM), la surexpression de PASK mime les effets du glucose sur l'expression du gène de l'insuline ainsi que sur l'expression de PDX-1 et prévient les effets délétères du palmitate alors que la surexpression de la forme inactive (un dominant négatif) de PASK bloque les effets du glucose (100,176).

Les souris déficientes en PASK sont viables et fertiles (331). Elles ont une insulinémie basse due à un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose (309). Une autre étude a été effectuée sur ce modèle de souris, mais ces observations n'ont cependant pas pu être confirmées (332). Par ailleurs, l'expression de l'ARNm de PASK est significativement diminuée dans les îlots isolés à partir de pancréas de donneurs atteints de diabète de type 2 (333). Chez l'humain, il existe deux mutations rares dans le gène *PASK*, p.L1051V et p.G1117E, associées à une forme encore inconnue de diabète de type

MODY (334). La mutation p.G1117E entraîne une augmentation d'environ 25 % de l'autophosphorylation de PASK et un doublement de son activité. Son expression dans les îlots de souris entraîne une augmentation de l'insuline sécrétée à bas glucose (2.8 mM) (334). Ceci démontre l'importance de PASK dans la régulation de la fonction bêta pancréatique chez l'humain.

Autres voies de signalisation majeures dans la cellule bêta pancréatique

ERK1/2

ERK1 et ERK2 (de l'anglais pour *extracellular signal regulated kinase 1 and 2*) sont des protéines sérine/thréonine kinases de 44 et 42 kDa, respectivement, exprimées dans toutes les cellules de l'organisme (335). Également connues sous les noms MAPK3 et MAPK1, ERK1/2 font partie de la famille des MAPK (de l'anglais pour *mitogen activated protein kinase*). Elle sont impliquées dans de nombreux mécanismes de transduction du signal, notamment dans la croissance et la prolifération cellulaire, la migration, la survie, la différenciation cellulaire ainsi que le métabolisme énergétique (336).

ERK1/2 sont la cible d'activation d'une variété de stimuli incluant les cytokines, les facteurs de croissance ainsi que via les voies de signalisations activées par les récepteurs couplés aux protéines G (273,336,337). Dans la cellule bêta pancréatique, les protéines ERK1/2 sont activées par le glucose ainsi que par des nutriments potentialisant la sécrétion de l'insuline, tels les acides gras (176,214,217,261,338,339). Le glucose ainsi que le GLP-1

induisent une augmentation du calcium intracellulaire, ce qui déclenche la cascade d'activation des protéines Ras/Raf/MEK1/2 menant à la phosphorylation de ERK1/2 sur résidus Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴ et à leur activation (261).

L'activation des protéines ERK1/2 est essentielle à l'activation de la transcription du gène de l'insuline induite par le glucose (339). Elle est plus particulièrement requise pour la liaison des facteurs de transcription PDX-1, MafA et NeuroD au promoteur du gène de l'insuline (340-342). Il a été également démontré que le glucose stimule la liaison de ERK1/2 au promoteur du gène de l'insuline (261). La régulation de la fonction bêta pancréatique par ERK1/2 est complexe, car ces enzymes sont également activées dans des conditions de glucolipotoxicité où la transcription du gène de l'insuline est réprimée (176). De plus, l'inhibition de l'activité de ERK1/2 bloque les effets délétères des acides gras sur la transcription du gène de l'insuline (176).

L'activité des protéines ERK1/2 est également détectée dans le cytoplasme des cellules bêta pancréatique en réponse à une stimulation au glucose et serait responsable de la phosphorylation d'autres protéines substrats impliquées dans l'exocytose des granules d'insuline, telle la synapsin I (343). En plus de son rôle dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline et sa sécrétion, ERK1/2 module également la phosphorylation et l'expression de la protéine CREB (de l'anglais pour *cAMP-responsive element-binding protein*) qui joue un rôle crucial dans la survie des cellules bêta pancréatiques (344).

GSK3 β

GSK3 β (de l'anglais pour *glycogen synthase kinase 3 beta*) est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire, impliquée dans divers mécanismes cellulaires tels la division et la prolifération cellulaire, le développement ainsi que le métabolisme (345). GSK3 β est constitutivement active. Elle est inactivée par phosphorylation sur résidu Ser⁹ par la voie PI3K/Akt, Wnt ainsi que celles activées par certains facteurs de croissance (346-348). Elle-même, inactive ses substrats en les phosphorylant. C'est par exemple le cas de la glycogène synthase (GS) qu'elle phosphoryle pour réguler la synthèse du glycogène (349). Le rôle central de GSK3 β dans le maintien de l'homéostasie du glucose dans l'organisme en fait une cible thérapeutique intéressante pour le développement d'outils d'interventions pour la prévention et le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. Par exemple, dans le muscle squelettique, la liaison de l'insuline à son récepteur entraîne la phosphorylation et l'activation de la voie PI3K/PKB (voir prochaine section), qui phosphoryle et inactive GSK3 β . Il y a alors une augmentation de l'activité du récepteur GLUT4. Ainsi, l'inhibition de GSK3 β dans le muscle squelettique résistant à l'insuline résulte en une nette amélioration du transport du glucose.

Dans la cellule bêta pancréatique, GSK3 β joue un rôle important dans la survie et la croissance cellulaire via la voie PI3K/PKB (350). En effet, l'inactivation de GSK3 β suffit pour induire la prolifération ainsi que les mécanismes anti-apoptotiques de la cellule bêta pancréatique (351). Le rôle de GSK3 β dans la régulation de la fonction bêta pancréatique via la

modulation de l'expression et de la stabilité du facteur de transcription PDX-1 a également été mis en évidence (245,246,249).

PI3K/Akt

La phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) est une enzyme impliquée dans diverses fonctions de la cellule telle la croissance, la survie, la différenciation et la prolifération cellulaire (352,353). La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne l'autophosphorylation de ce dernier sur plusieurs résidus tyrosine, ce qui permet le recrutement et la phosphorylation des protéines IRS-1 et IRS-2. Ces dernières se lient alors au domaine SH2 de la sous-unité p85 de la protéine PI3K, ce qui permet le recrutement de sa sous-unité p110 à la membrane et ainsi son activation (353). PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃). PIP₃ se lie à la protéine PDK1 (de l'anglais pour *phosphoinositide-dependent kinase 1*) à la membrane cellulaire et cette dernière phosphoryle et active PKB. PKB, également connue sous l'acronyme Akt, phosphoryle et inactive GSK3 β ce qui permet entre autres d'augmenter la stabilité et l'expression du facteur de transcription PDX-1 (350,354).

Dans la cellule bêta pancréatique, le glucose, via l'insuline, phosphoryle la protéine PKB et l'active (176,355-359) ce qui pourrait être un mécanisme protecteur contre l'apoptose induite par les acides gras (168,358,360,361). Toutefois, dans des conditions non apoptotiques, les acides gras induisent également la phosphorylation de PKB, ce qui suggère, comme dans le cas des protéines ERK1/2, un double rôle de cette voie (176,362).

Chapitre VI Mise en contexte de la thèse

Un défaut de production d'insuline ainsi qu'une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline conduisent à l'apparition du diabète de type 2. Notre laboratoire a montré que l'exposition chronique des cellules bêta pancréatiques à de hautes concentrations de glucose en présence d'acides gras est délétère pour la fonction bêta pancréatique (363). Ceci entraîne entre autres une diminution de l'expression de l'ARNm de la préproinsuline (175). L'activité du promoteur du gène de l'insuline est réduite étant donné l'exclusion nucléaire du facteur de transcription PDX-1 ainsi que la diminution de l'expression de l'ARNm de MafA qui mène donc à une diminution de leur activité de liaison au promoteur du gène de l'insuline (179). Ces conditions de glucolipotoxicité reflètent l'état d'hyperglycémie et de dyslipidémie retrouvés chez les personnes atteintes de diabète de type 2. Notre laboratoire a reproduit ces effets dans plusieurs modèles expérimentaux, notamment chez les rats infusés avec du glucose et de l'Intralipide (une émulsion de lipides à 20 %) (177,180). Chez l'humain, la stimulation de la sécrétion d'insuline en réponse à une infusion aiguë (90 min) de glucose est diminuée lorsque l'infusion se poursuit pendant 48h (178). Cette réponse est également inhibée lorsque les lipides sont infusés simultanément avec le glucose (364).

Les mécanismes moléculaires responsables de la détérioration de la fonction bêta pancréatique sont complexes et pas totalement clairs. Les différentes

voies de signalisation impliquées et identifiées à ce jour incluent les cascades de signalisation des protéines ERK1/2 (99,110,217,261,339), PI3K/Akt (145,355) et beaucoup plus récemment, PASK (100,332,333). Dans la cellule bêta pancréatique, ces protéines kinases sont toutes phosphorylées et activées en réponse à une augmentation des concentrations de glucose et sont impliquées dans le maintien de la fonction bêta pancréatique. D'autre part, le facteur de transcription PDX-1 est un élément déterminant pour le développement, la fonction et le maintien de l'intégrité de la cellule bêta pancréatique. Sa fonction est majeure dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline. Le glucose module à plusieurs niveaux la régulation de PDX-1, incluant son expression, sa phosphorylation ainsi que sa translocation sub-cellulaire. Quelques mécanismes de régulation ont été proposés, mais sont parfois incomplets, voire contradictoires.

L'objectif de cette thèse est d'examiner les mécanismes moléculaires responsables de la régulation de la transcription du gène de l'insuline via PDX-1 dans la cellule bêta pancréatique. Plus particulièrement, les objectifs spécifiques sont :

1. Évaluer la contribution des voies de signalisation ERK1/2, PI3K/Akt et PASK dans la régulation de l'expression du gène de l'insuline.
2. Déterminer les mécanismes de régulation du facteur de transcription PDX-1 par l'enzyme PASK.
3. Examiner le profil de translocation sub-cellulaire de PDX-1 dans différents modèles cellulaires.

Ces travaux ont mené à a publication de deux articles originaux ainsi qu'à la rédaction d'un troisième manuscrit qui sera soumis au moment du dépôt de la thèse :

Fontés G, Semache M, Hagman DK, Tremblay C, Shah R, Rhodes CJ, Rutter J, Poitout V. *Involvement of Per-Arnt-Sim Kinase and extracellular-regulated kinases-1/2 in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta-cells*. Diabetes, 2009. Sep;58(9):2048-58.

Semache M, Zarrouki B, Fontés G, Fogarty S, Kikani C, Chawki MB, Rutter J, Poitout V. *Per-Arnt-Sim kinase regulates pancreatic duodenal homeobox-1 protein stability via phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β in pancreatic β -cells*. Journal of Biological Chemistry, 2013. Aug 23;288(34):24825-33.

Semache M, Zarrouki B, Ghislain J, Poitout V. *Pancreatic and duodenal homeobox-1 nuclear localization is regulated by glucose in dispersed rat islets but not in insulin-secreting cell lines*. Sera soumis à Endocrinology.

RÉSULTATS

Article 1 Implication des protéines PASK, PI3K et ERK1/2 dans la régulation du gène de l'insuline.

Mise en contexte :

L'exposition chronique à de hautes concentrations de glucose en présence d'acides gras entraîne une détérioration de la fonction de la cellule bêta pancréatique. Notre laboratoire a démontré que les mécanismes par lesquels les acides gras inhibent la transcription du gène de l'insuline (165,175,179,181) sont distincts de ceux affectant la sécrétion de l'insuline (171-174,365). Les acides gras, qu'ils soient saturés (le palmitate) ou insaturés (l'oléate) inhibent la sécrétion de l'insuline tandis que seul le palmitate inhibe l'expression du gène. En effet, nous avons démontré que l'inhibition de l'expression du gène de l'insuline par les acides gras se fait via la synthèse *de novo* de céramides, dont le palmitate est le seul substrat (175). Les céramides inhibent l'expression du gène de l'insuline et peuvent induire l'apoptose des cellules bêta pancréatiques (366), mais n'affectent cependant pas la sécrétion de l'insuline, ce qui suggère l'implication d'autres dérivés dans ces mécanismes de régulation (365). Le palmitate entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm du facteur de transcription MafA ainsi qu'une exclusion de PDX-1 du noyau, ce qui entraîne la diminution de l'activité du promoteur du gène de l'insuline (175,179).

L'objectif de ce premier volet de la thèse est d'évaluer la contribution des voies de signalisation ERK1/2, PI3K/Akt et PASK dans la régulation de l'expression du gène de l'insuline. Plus spécifiquement, cette partie de l'étude vise à :

1. Examiner l'effet du glucose et du palmitate sur la phosphorylation et/ou l'expression des protéines kinases ERK1/2, Akt et PASK dans les cellules bêta pancréatiques ainsi que dans les îlots isolés de rats.
2. Déterminer la contribution de ces voies de signalisation dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline en réponse au glucose et au palmitate.
3. Déterminer le rôle de ces voies de signalisation dans la régulation de l'expression des facteurs de transcription PDX-1, MafA et C/EBP β .

Titre: Involvement of Per-Arnt-Sim Kinase and extracellular-regulated kinases-1/2 in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta-cells.

Auteurs : Ghislaine Fontés, Meriem Semache, Derek K. Hagman, Caroline Tremblay, Ramila Shah, Christopher J. Rhodes, Jared Rutter et Vincent Poitout.

Publié dans le journal Diabetes, 2009.

Contribution des auteurs :

Ghislaine Fontés : Auteure principale. A élaboré les hypothèses, conçu et réalisé les expériences, a analysé les données et rédigé le manuscrit.

Meriem Semache : Coauteur. A réalisé la plupart des expériences *in vitro*. A participé à la révision du manuscrit.

Derek K. Hagman : Coauteur. A participé aux études sur l'effet inhibiteur des acides gras sur le gène de l'insuline.

Caroline Tremblay : Coauteur. A effectuer les dosages d'insuline par essai radioimmunologique.

Ramila Shah : Coauteur et collaborateur, sous la direction de CR. A amplifié les adénovirus codant pour la luciférase, la forme sauvage et la forme mutée de PASK humaine.

Christopher J. Rhodes : Coauteure et collaborateur. A fourni les adénovirus codant pour la luciférase, la forme sauvage et la forme mutée de PASK humaine.

Jared Rutter: Coauteur et collaborateur. A fourni les anticorps anti PASK, a participé à la révision du manuscrit.

Vincent Poitout: Directeur de thèse. A dirigé tout le projet et rédigé le manuscrit.

**Involvement of PAS Kinase and ERK1/2 in Palmitate Inhibition
of Insulin Gene Expression In Pancreatic Beta-Cells**

Running Title: Signalling pathways in β -cell glucolipotoxicity

Ghislaine Fontés^{1,2}, Meriem Semache¹, Derek K. Hagman^{1,2}, Caroline Tremblay¹, Ramila Shah³, Christopher J. Rhodes³, Jared Rutter⁴, Vincent Poitout^{1,2}

Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM¹ and Department of Medicine, University of Montréal², Québec, Canada; Kovler Diabetes Center, University of Chicago, Chicago, Illinois, USA³; Division of Endocrinology, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah, USA⁴

Word count: Abstract: 243

Main text: 3,976

Abstract

Objective: Prolonged exposure of pancreatic beta cells to simultaneously elevated levels of fatty acids and glucose (glucolipotoxicity) impairs insulin gene transcription. However, the intracellular signalling pathways mediating these effects are mostly unknown. This study was aimed to ascertain the role of ERK1/2, PKB, and PASK in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta cells.

Research Design and Methods: MIN6 cells and isolated rat islets were cultured in the presence of elevated glucose, with or without palmitate or ceramide. ERK1/2 phosphorylation, PKB phosphorylation, and PASK expression were examined by immunoblotting and real-time PCR. The role of these kinases in insulin gene expression was assessed using pharmacological and molecular approaches.

Results: Exposure of MIN6 cells and islets to elevated glucose induced ERK1/2 and PKB phosphorylation, which was further enhanced by palmitate. Inhibition of ERK1/2, but not of PKB, partially prevented the inhibition of insulin gene expression in the presence of palmitate or ceramide. Glucose-induced expression of PASK mRNA and protein levels was reduced in the presence of palmitate. Overexpression of wild-type PASK increased insulin and PDX-1 gene expression in MIN6 cells and rat islets incubated with glucose and palmitate, while overexpression of a kinase-dead PASK mutant overexpressed in rat islets decreased expression of insulin and PDX-1 and increased C/EBP β expression.

Conclusions: Both the PASK and ERK1/2 signalling pathways mediate palmitate inhibition of insulin gene expression. These findings identify PASK as a novel mediator of glucolipotoxicity on the insulin gene in pancreatic beta cells.

The glucolipotoxicity hypothesis posits that abnormalities in lipid metabolism, in conjunction with chronic hyperglycemia, contribute to the deterioration of beta-cell function in type 2 diabetes (1; 2). In vitro, prolonged exposure of isolated islets and insulin-secreting cells to simultaneously elevated levels of fatty acids (FA) and glucose leads to inhibition of glucose-induced insulin secretion, impairment of preproinsulin gene (hereafter referred to as “insulin gene”) expression, and cell death by apoptosis (reviewed in (1)). Our observation (3) that inhibition of insulin gene expression also occurs in islets from rats chronically infused with glucose and Intralipid confirmed the relevance of this phenomenon to in vivo situations.

Studies in our laboratory have attempted to define the cellular and molecular mechanisms of FA inhibition of the insulin gene. First, we showed that the mechanisms by which FA impair insulin secretion and insulin gene expression are distinct (4; 5). Thus, both saturated (e.g. palmitate) and unsaturated (e.g. oleate) long-chain FA inhibit glucose-induced insulin secretion (5), whereas only palmitate impairs insulin gene expression (4). This is due to the fact that inhibition of insulin gene expression is mediated by de novo synthesis of ceramide, for which only palmitate can serve as a substrate (4). Second, palmitate inhibits glucose-induced insulin promoter activity (4) through decreased glucose-induced MafA expression and nuclear exclusion of pancreas-duodenum homeobox-1 (PDX-1), thereby reducing the binding activities of both transcription factors (6).

The signalling pathways implicated in palmitate inhibition of insulin gene expression are mostly unknown. Several members of the mitogen-activated protein kinase family are activated by phosphorylation in response to glucose. Upon activation, the extracellular-regulated kinases (ERK)1/2

promote nuclear translocation and/or binding of PDX-1, MafA and Beta2/NeuroD1 to the insulin promoter, and in turn these transcription factors synergistically activate insulin gene transcription (7-11). On the other hand, glucose activates the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-dependent insulin signalling pathway and increases protein kinase B (PKB) phosphorylation in beta cells (12), although the role of the PI3K pathway in the regulation of insulin gene expression remains controversial (10; 13; 14). Finally, induction of mRNA and protein expression of the Per-Arnt-Sim kinase (PASK) in MIN6 cells and isolated islets mediates glucose-induced insulin gene expression (15).

The aims of this study were 1) to examine the effects of glucose and palmitate on the phosphorylation state and expression levels of ERK1/2, PKB, and PASK in MIN6 insulin-secreting cells and isolated rat islets; 2) to ascertain, using pharmacological and molecular tools, whether these signalling pathways mediate palmitate inhibition of insulin gene expression.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Reagents and solutions- RPMI 1640 and fetal bovine serum were from Invitrogen (Burlington, ON). DMEM was from Wisent (Saint Bruno, QC) and bovine growth serum was from HyClone (Logan, UT). FA-free bovine serum albumin (BSA) was from Equitech-Bio Inc (Kerrville, TX). LY 294002, PD98059, U0126 and thapsigargin were from Calbiochem (EMD Biosciences, San Diego, CA). Propidium iodide (PI) was from Invitrogen. C2-ceramide was from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Palmitate (sodium salt) and all other reagents (analytical grade) were from Sigma unless otherwise noted. Rabbit anti-PKB, anti-phospho-Ser⁴⁷³-PKB, anti-phospho-p44/p42

MAP kinase (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) and anti-cleaved caspase 3 antibodies were from Cell Signalling (New England Biolabs, Beverly, MA). Rabbit anti-ERK1/2 antibody was from Promega (Madison, WI). IL-1 β was from Cedarlane Laboratories (Burlington, ON). Rabbit anti- p85 subunit of PI3K and anti-PDX-1 antibodies were from Upstate (Lake Placid, NY). Rabbit anti-hPASK (U2501), anti-m/rPASK (U2508) antibodies and hPASK adenoviruses were generated as described (16). Insulin radioimmunoassay kits were from Linco Research (St Charles, MI). Palmitate and C2-ceramide solutions were prepared as described (4). The final molar ratio of palmitate: BSA was 5:1. All control conditions included a solution of vehicle (ethanol: H₂O) mixed with FA-free BSA.

Animals- 225-275 g male Wistar rats (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) were housed on a 12h light/dark cycle with free access to standard laboratory chow and water. All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

Rat islets isolation and cell culture- Rat islets were isolated as described (4; 17). Isolated islets were pre-cultured for 16h at 2.8 mM, and then exposed to 2.8 or 16.7 mM glucose in various experimental conditions as described in "Results". MIN6 cells (passage 28-40) were maintained as previously described (18). Cells were seeded in 6-well plates at a density of 1x10⁶ cells per well for 3-5 days. One day before the experiment, cells were cultured in medium containing 5.5 mM glucose for 16h. Cells were serum-starved in medium containing 0.5% BSA for 2h and then exposed to various experimental conditions as described in "Results".

Acridine Orange (AO) and propidium iodide (PI) fluorescent staining- Islets were incubated for 30 min with 1 μ M AO and 15 μ M PI. Stained islets were examined under a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems (Canada) Inc., Richmond Hill, ON). Living cells were identified by green staining (AO) and dead cells by brown-red staining (PI). For immunohistochemistry, MIN6 cells were fixed with 3.7% formaldehyde for 30 min and permeabilized in cold methanol for 20 min. After saturation with 5% normal horse serum, cells were incubated with rabbit anti-PDX-1 antibody, followed by FITC goat anti-rabbit (Vector Laboratories). Cells were observed under a fluorescent microscope (Leica Microsystems).

Adenoviral infection of islets and MIN6 cells- The appropriate titer of recombinant adenovirus (Adv) encoding luciferase (Adv-Luc) or human PASK (Adv-hPASK (16)) was determined in pilot experiments. MIN6 cells were sub-cultured in 6-well plates (1×10^6 cells per well). After 3 days of culture to reach $\sim 60\%$ confluence, MIN6 cells were infected with 4×10^5 plaque-forming unit/cell of Adv-Luc or Adv-hPASK for 2h, after which the medium was replaced and the cells further cultured for 16h before serum-starvation and exposure to various experimental conditions as described in *Results*. For arterial delivery of adenoviral vectors in rat pancreas, Wistar rats were anesthetized and subjected to laparotomy. After ligation of the portal vein, the superior aorta, and the hepatic, mesenteric, and right and left renal arteries, adenoviruses (4.10^{10} pfu/pancreas) were injected in the celiac trunk of the inferior aorta as described (19).

Protein extraction and immunoblotting- Proteins from cells or islets were extracted and resolved by SDS-PAGE as described (6). Membranes were blotted with antibodies against pERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) or total ERK1/2,

pSer⁴⁷³-PKB or total PKB, hPASK, m/rPASK, or the p85 sub-unit of PI3K. Signals were detected using a horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG (BioRad) and enhanced chemiluminescence (ECL, PerkinElmer Las Canada Inc., Woodbridge, ON) on Kodak BioMax XAR films (Kodak, Rochester, NY). The bands were quantified by G Box Chemi 16 using Gene Tools from Syngene software (Syngene, Frederick, MD).

Real-time PCR- Total RNA was extracted from aliquots of 100 islets each using the RNeasy Qiagen micro-kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON). MIN6 cell RNA was extracted by the Trizol method, reverse transcribed, and RT-PCR was carried out using the Faststart DNA Master PLUS SYBR Green Kit (Roche, Indianapolis, IN), as previously described (3). All mouse, rat and human primer sets, listed in Supplementary Table 1, were designed using Primer3 (20). To amplify preproinsulin pre-mRNA (pre-INS2), a forward primer was designed against a sequence in exon 2 and a reverse primer designed against a sequence in intron 2, as described (21).

Insulin content- Intracellular insulin content was determined by radioimmunoassay after acidified-ethanol extraction.

Statistical analysis- Data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc adjustment for multiple comparisons, using GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA). $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Palmitate inhibits glucose-induced expression of insulin pre-mRNA and mRNA species in MIN6 cells and rat islets- The long half-life of mature

insulin mRNA species makes it difficult to examine early changes in insulin gene expression induced by palmitate ((4)). To circumvent this, we used a set of primers against the short-lived pre-mRNA (pre-INS2), as described by Evans-Molina et al. (21). We used primers specific for the insulin 2 gene containing intron 2 since its short half-life reflects earlier changes in transcriptional rates (22). Glucose induced a larger increase in pre-INS2 mRNA than in mature INS2 mRNA after 24h of exposure in both MIN6 cells (n=3; P<0.05; Fig. 1A) and rat islets (n=3; P<0.001; Fig. 1B). Palmitate significantly blocked the stimulatory effect of glucose on pre-INS2 mRNA within 24h in both MIN6 cells (n=3; P<0.001) and rat islets (n=3; P<0.001), whereas at that time point mature INS2 mRNA levels were not yet significantly decreased (Fig. 1A&B). Since palmitate inhibition of insulin gene expression is, at least in part, due to nuclear exclusion of PDX-1 (6), we measured PDX-1 target genes in islets exposed to glucose \pm palmitate for 24 h (Fig. 1C). We observed that during this timeframe glucose induced the expression of GLUT2 mRNA and islet amyloid polypeptide (IAPP) pre-mRNA, but not INS1, glucokinase (GK), or IAPP mature mRNA levels. Palmitate significantly decreased INS1 mRNA levels at both low and high glucose, as well as GLUT2 and GK mRNA and IAPP pre-mRNA levels at high glucose (Fig. 1C). To exclude a possible effect of palmitate on cell viability, we first measured caspase 3 cleavage in MIN6 cells. As expected, a 24-h exposure to IL-1 β or thapsigargin induced caspase 3 cleavage, whereas palmitate had no effect (Suppl. Fig. 1). Similarly, culture of islets for 24 h with palmitate did not lead to an increase in PI-positive cells, in contrast to the positive control H₂O₂ (Suppl. Fig. 2).

Prolonged exposure of MIN6 cells and isolated rat islets to high glucose and palmitate increases ERK1/2 and PKB phosphorylation- We first

assessed the phosphorylation state and expression levels of ERK1/2 and PKB in MIN6 cells and isolated islets. As shown in Fig. 2A-C, exposure of MIN6 cells to 11 mM glucose time-dependently increased both ERK1 and ERK2 phosphorylation (n=4; P<0.01; Fig. 2B&C, respectively), which was further enhanced by addition of palmitate. The effect of palmitate was detected at 4h (data not shown), further increased after 12h and was sustained over a 24-h period (n=4; P<0.001; Fig. 2B&C). Ser⁴⁷³-phosphorylation of PKB was slightly but not significantly enhanced by glucose, and strongly augmented by palmitate after 12h, but not 24h (n=5; P<0.01; Fig. 2D&E). Similar effects of palmitate on ERK1/2 and PKB phosphorylation were observed in isolated rat islets following an 18-h exposure (Fig. 2F&G).

Inhibition of MEK1/2, but not PI3K, partially prevents palmitate inhibition of insulin gene expression- To determine whether phosphorylation of ERK1/2 and PKB by palmitate plays a role in the inhibition of insulin gene expression, pharmacological inhibitors of their respective signalling pathways were used. As expected, glucose-induced ERK1/2 phosphorylation with or without palmitate was blocked by the MEK1/2 inhibitors U0126 (Fig. 3A) and PD98059 (not shown). PKB phosphorylation was blocked in the presence of LY294002 (Fig. 3B). In MIN6 cells, both U0126 and LY294002 significantly potentiated the stimulatory effect of glucose on insulin pre-mRNA (n=4-7; P<0.001; Fig. 3C), suggesting some degree of tonic inhibition of insulin gene expression by the ERK1/2 and PKB pathways in MIN6 cells, but not in islets, in which neither U0126 (Fig. 3D) nor LY294002 (Fig. 3F) had any effect on basal or glucose-stimulated insulin pre-mRNA expression. Palmitate inhibited insulin pre-mRNA levels in MIN6 cells at 11 mM glucose (n=4; P<0.001; Fig. 3C) and rat islets at both 2.8 and 16.7 mM glucose (n=8; P<0.001; Fig. 3D&E).

This effect was partially reversed in the presence of U0126 in MIN6 cells (Fig. 3C) and in the presence of either U0126 (Fig. 3D) or PD98059 (Fig. 3E) in rat islets. In contrast, LY294002 did not prevent palmitate inhibition of insulin pre-mRNA levels in either MIN6 cells (Fig. 3C) or rat islets (Fig. 3F). Altogether, these data indicate that blockade of the ERK1/2 pathway, but not of PKB, partially prevents palmitate inhibition of insulin gene expression.

C2-ceramide enhances ERK1/2 phosphorylation and inhibits insulin gene expression in MIN6 cells- We have previously shown that de novo ceramide synthesis mediates palmitate inhibition of insulin gene expression in islets (4). To address whether the effect of ceramide is mediated by ERK1/2 phosphorylation, we exposed MIN6 cells to the cell-permeable analogue C2-ceramide in the absence or presence of MEK1/2 inhibitors (Fig. 4). First, we observed that C2-ceramide further enhanced ERK1/2 phosphorylation in response to glucose (Fig. 4A), similar to the effects of palmitate shown in Fig. 2. As expected, this was blocked in the presence of U0126 or PD98059 (Fig. 4A). C2-ceramide significantly inhibited glucose induction of insulin pre-mRNA levels, and this effect was totally prevented in the presence of U0126 (Fig. 4B). The non metabolisable analogue C2-dihydroceramide had no effect on insulin gene expression (not shown).

Inhibition of ERK1/2 does not alter the expression levels of MafA, PDX-1, and C/EBP β - We have previously shown that the molecular mechanisms whereby palmitate inhibits insulin gene expression involve decreased MafA expression and PDX-1 nuclear exclusion (6). On the other hand, Lawrence et al. have shown that the transcription factor C/EBP β inhibits insulin promoter activity (9). We examined whether ERK1/2 was involved in the changes in MafA, PDX-1, and C/EBP β expression in response to palmitate. As expected,

a 24-h exposure of MIN6 cells to elevated glucose increased MafA and PDX-1 mRNA, and decreased C/EBP β mRNA (Fig. 5A, 5B and 5C, respectively). Addition of palmitate decreased MafA mRNA (Fig. 5A) but did not alter PDX-1 (Fig. 5B) or C/EBP β mRNA (Fig. 5C), and these effects of palmitate were unchanged in the presence of the MEK1/2 inhibitor U0126.

PASK is implicated in palmitate inhibition of insulin gene expression-

PASK has been demonstrated to play a role in metabolic sensing and in the control of insulin gene expression by glucose in pancreatic beta-cells (15; 23; 24). A 6-h exposure to high glucose induced a significant increase in PASK mRNA levels in MIN6 cells (n=3; P<0.05; Fig. 6A) and in rat islets (n=3; P<0.001; Fig. 6B), consistent with a previous report (15). The concomitant presence of palmitate nearly abrogated glucose-induced PASK mRNA expression in both MIN6 cells (Fig. 6A) and rat islets (Fig. 6B). A similar pattern was observed at the protein level in MIN6 cells (Fig. 6C&D). To determine whether palmitate inhibition of PASK expression mediates its effects on the insulin gene, we first infected MIN6 cells with an adenovirus encoding for wild-type (WT) hPASK (Fig. 7A). As previously reported (15), overexpression of hPASK significantly increased insulin gene expression at low glucose (P<0.001; Fig. 7B). In MIN6 cells infected with a control adenovirus expressing luciferase (Luc), palmitate inhibited glucose-induced insulin pre-mRNA levels after 24h of exposure (n=7; P<0.05; Fig. 7B). In contrast, palmitate had no effect on insulin pre-mRNA in MIN6 cells overexpressing hPASK (n=7; NS; Fig. 7B). Overexpression of PASK did not affect ERK1/2 phosphorylation (not shown). These data suggest that PASK mediates palmitate inhibition of insulin gene expression in MIN6 cells. To confirm these observations in islets, we overexpressed the WT or a kinase-

dead (KD) mutant of hPASK in islets using arterial adenoviral delivery (Fig. 7C). After isolation, islets were exposed to 16.7 mM glucose and 0.5 mM palmitate. We verified that the adenoviral infection did not affect cell viability, as indicated by the absence of PI-positive cells (Suppl. Fig. 2C-E). In islets exposed to elevated glucose and palmitate, overexpression of WT hPASK increased insulin pre-mRNA levels (Fig. 7D), consistent with the observation in MIN6 cells (Fig. 7B). The KD hPASK mutant was previously shown to abrogate PASK activity and to block glucose-induction of insulin promoter activity in MIN6 cells (15; 16). Accordingly, overexpression of the KD hPASK mutant in MIN6 cells decreased intracellular insulin content by approximately 28% (1060 ± 53 vs. 1484 ± 61 ng/ml in Luc-expressing cells; $P < 0.05$; $n = 4$). In islets, overexpression of KD hPASK decreased insulin pre-mRNA and PDX-1 mRNA levels, and increased C/EBP β expression (Fig. 7D). To confirm the effects of PASK on PDX-1 expression, we examined PDX-1 protein levels by immunohistochemistry (Fig. 8). PDX-1 protein expression was induced by high glucose (Fig. 8B) and reduced in the presence of palmitate (Fig. 8C). WT hPASK overexpression enhanced PDX-1 expression at low glucose (Fig. 8D) as well as in the presence of palmitate (Fig. 8F). In contrast, overexpression of the KD hPASK mutant blocked the stimulation of PDX-1 expression by glucose (Fig. 8I).

DISCUSSION

This study was aimed to identify the intracellular signalling pathways mediating palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta cells. We found that palmitate enhances glucose-induced PKB and ERK1/2 phosphorylation and decreases glucose-induced PASK expression. Both ERK1/2 and PASK are implicated in the inhibitory effects of palmitate on

insulin gene expression. Further, modulation of ERK1/2 phosphorylation seems to occur downstream of ceramide synthesis, while inhibition of PASK expression decreases PDX-1, but not MafA, expression.

Our observation that glucose enhances PKB phosphorylation is consistent with a number of previous studies in pancreatic beta cells (12; 25-28). This is believed to represent a protective mechanism by which glucose exerts anti-apoptotic effects (29). In contrast, the observed effect of palmitate enhancing PKB phosphorylation in both MIN6 cells and rat islets is in contradiction with most (12; 26; 30), but not all (31) previous studies in pancreatic beta cells, C2C12 muscle cells (32), and 3T3-L1 adipocytes (33). However, most of these studies investigated the pro-apoptotic action of FA (12; 30; 34-36), whereas in our experimental conditions we did not observe any detectable cell death. It is therefore possible that under non pro-apoptotic conditions, FA enhance PKB phosphorylation, whereas when either the concentration or the length of exposure is increased, FA-induced cell death is associated with a secondary decrease in PKB phosphorylation. Martinez et al. (30) demonstrated in MIN6 cells an early enhancement of PKB phosphorylation by palmitate at 4h, followed by a decrease at 24h associated with marked cell death. While the time-course of changes in PKB phosphorylation is clearly different in our study in islets than in the Martinez et al. (30) study in MIN6 cells, their results also suggest that the effects of palmitate on PKB phosphorylation might be biphasic.

The observed stimulation of ERK1/2 phosphorylation by glucose is consistent with several previous studies (8; 9; 37-40). Also as reported (38), PD98059 inhibited glucose-stimulation of insulin mRNA expression. Importantly, both palmitate and ceramide enhanced ERK1/2 phosphorylation

in MIN6 cells and isolated islets, and blockade of ERK1/2 phosphorylation by U0126 or PD98059 increased insulin pre-mRNA expression in the presence of palmitate. This suggests that the ERK1/2 pathway is implicated in both the stimulation of insulin gene expression by glucose and its inhibition by palmitate, consistent with a dual role of ERK1/2 in the regulation of insulin gene expression by glucose as reported under glucotoxic conditions (9). Further, the inhibitory effect of ceramide on insulin gene expression was completely reversed upon inhibition of ERK1/2 in MIN6 cells. In view of our previous findings that blockade of de novo ceramide synthesis prevents palmitate inhibition of the insulin gene in islets (4), this observation suggests that ceramide generated de novo from palmitate inhibits the insulin gene via ERK1/2 activation. Since ERK1/2 inhibitors did not affect PDX-1 expression, we hypothesize that ERK1/2 induces post-translational modifications of PDX-1 directly or indirectly, thereby regulating its nuclear translocation, which we have shown to be implicated in palmitate inhibition of insulin gene transcription (3; 6).

PASK is an evolutionarily conserved serine/threonine protein kinase, containing a PAS domain sensitive to the intracellular environment which regulates the kinase domain to transduce the signal (41). In budding yeast, it coordinates sugar storage and protein synthesis with carbohydrate availability (42). In mammals, it has been demonstrated to be an important regulator of glycogen synthase and cellular energy balance (43). The role of PASK in vivo remains unclear, since two different studies using PASK^{-/-} mice exhibited different phenotypes. While the findings of Borter et al. (44) did not support a role for PASK in the regulation of insulin expression or secretion, Hao et al. (45) found that PASK^{-/-} mice had impaired glucose-induced insulin secretion and were protected from high-fat diet-induced obesity and insulin resistance.

In pancreatic beta cells, PASK was shown to be required for glucose-induced insulin gene transcription (15). In the present study, we demonstrated that palmitate blocks glucose-induction of PASK expression, and that overexpression of hPASK prevented the inhibitory effect of palmitate on insulin mRNA and PDX-1 mRNA and protein expression in MIN6 cells. In addition, adenoviral-mediated overexpression of WT PASK increased, whereas a KD mutant of PASK decreased, insulin mRNA and PDX-1 protein expression in islets. The partial restoration of insulin pre-mRNA levels in islets exposed to glucose and palmitate is presumably due to a lower transfection efficiency than in MIN6 cells, in which restoration was complete.

To better understand the links between the two signalling pathways identified as implicated in palmitate inhibition of insulin gene expression – namely ERK1/2 and PASK – and the transcription factors MafA and PDX-1 which we previously reported to be involved in this process (3; 6), we measured the expression of these transcription factors upon ERK1/2 inhibition or PASK overexpression. In addition, we measured the expression of C/EBP β , which was recently shown to be increased in MIN6 cells exposed to palmitate (46) and is known to repress insulin gene transcription (9). First, we observed that expression of neither MafA nor PDX-1 was augmented in the presence of U0126 in cells exposed to glucose and palmitate, suggesting that the ERK1/2 pathway does not affect expression of these transcription factors. This, of course, does not rule out the possibility that ERK1/2 regulates the activity of these factors at the post-translational level (9; 47). Second, expression of PDX-1 was inhibited in islets overexpressing the KD hPASK mutant, suggesting that PASK regulates PDX-1 mRNA expression, as previously suggested by da Silva Xavier et al. (15) under high glucose conditions. Whether or not this is associated with changes in PDX-1 binding

activity remains to be examined. Contrary to a recent observation by Plaisance et al. (46), we did not observe an increase in C/EBP β expression in MIN6 cells exposed to high glucose and palmitate. This difference might be due to a lower concentration of palmitate and shorter exposure in our study. Interestingly, overexpression of the KD hPASK mutant resulted in a marked increase in C/EBP β expression, which could contribute to the decrease in insulin gene expression under these conditions. We hypothesize that under our relatively mild conditions of exposure to glucose and palmitate, which are not associated with cell death, C/EBP β expression is not yet increased, whereas under more drastic conditions, such as KD hPASK overexpression or longer times in culture with palmitate (46) or glucose (9; 48), C/EBP β expression is enhanced and contributes to the decrease in insulin gene expression and eventual cytotoxicity (46). A similar opposite pattern of expression for PDX-1 and C/EBP β was also found in islets from animal models of type 2 diabetes (48), suggesting that perhaps PASK regulates these two transcription factors and, thereby, insulin gene expression under conditions of fuel surfeit. As we previously observed (6), the concomitant presence of palmitate in culture blocked glucose-induction of MafA mRNA expression. However, this effect was prevented neither by ERK1/2 inhibition nor by hPASK overexpression, suggesting that it is mediated by another, yet to be identified, signalling pathway. We acknowledge that the inherent caveats of pharmacological tools and the fact that we have not examined transcription factor binding activities limit the interpretation of our findings. However, our results suggest that palmitate inhibits insulin gene expression by three distinct signalling arms. First, de novo ceramide synthesis from palmitate activates ERK1/2, which in turn might affect, directly or indirectly, transcription factor binding activity. Second, palmitate inhibits glucose-

induced PASK expression, which leads to decreased PDX-1 expression and, presumably, binding activity. Third, palmitate inhibits glucose-induced MafA expression, via mechanisms that do not appear to involve ERK1/2 or PASK.

In conclusion, we have demonstrated a role for both the ERK1/2 and PASK pathways in mediating FA inhibition of glucose-induced insulin gene expression in rodent beta cells. These findings uniquely identify PASK as a novel mediator of glucolipotoxicity on the insulin gene. Whether or not similar mechanisms are operative in human islets remains to be examined.

Acknowledgements

This work was supported by the National Institutes of Health (R01 DK-58096 to VP). GF is supported by a Post-Doctoral Fellowship from the Canadian Diabetes Association. VP holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic Beta-Cell Function. We thank D^{rs} Thierry Alquier, Marc Prentki, and Erik Joly for critical input, as well as Grace Ferguson, Mélanie Ethier, Annie Tardif, and Mélanie Guévremont for valuable technical help.

Abbreviations

Adv, adenovirus; AO, acridine orange; BSA, bovine serum albumine; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; FA, fatty acid; Luc, luciferase; KD, kinase dead; PASK, Per-Arnt-Sim (PAS) kinase; PDX-1, pancreas-duodenum homeobox-1; PI3K, phosphatidylinositol 3'-kinase; PI, propidium iodide; PKB, protein kinase B; WT, wild-type.

References

1. Poitout V, Robertson RP: Glucolipotoxicity: Fuel Excess and b-Cell Dysfunction. *Endocr Rev*, 2007
2. Prentki M, Corkey BE: Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 45:273-283, 1996
3. Hagman DK, Latour MG, Chakrabarti SK, Fontes G, Amyot J, Tremblay C, Semache M, Lausier JA, Roskens V, Mirmira RG, Jetton TL, Poitout V: Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets. *Diabetes* 57:424-431, 2008
4. Kelpke CL, Moore PC, Parazzoli SD, Wicksteed B, Rhodes CJ, Poitout V: Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *J Biol Chem* 278:30015-30021, 2003
5. Moore PC, Ugas MA, Hagman DK, Parazzoli SD, Poitout V: Evidence against the involvement of oxidative stress in fatty acid inhibition of insulin secretion. *Diabetes* 53:2610-2616, 2004
6. Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V: Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 280:32413-32418, 2005

7. Docherty HM, Hay CW, Ferguson LA, Barrow J, Durward E, Docherty K: Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter. *Biochem J* 389:813-820, 2005
8. Khoo S, Griffen SC, Xia Y, Baer RJ, German MS, Cobb MH: Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 278:32969-32977, 2003
9. Lawrence MC, McGlynn K, Park BH, Cobb MH: ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter. *J Biol Chem* 280:26751-26759, 2005
10. Leibiger B, Moede T, Schwarz T, Brown GR, Kohler M, Leibiger IB, Berggren PO: Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9307-9312, 1998
11. Leibiger B, Moede T, Uhles S, Berggren PO, Leibiger IB: Short-term regulation of insulin gene transcription. *Biochem Soc Trans* 30:312-317, 2002
12. Wrede CE, Dickson LM, Lingohr MK, Briaud I, Rhodes CJ: Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* 277:49676-49684, 2002
13. Leibiger IB, Leibiger B, Moede T, Berggren PO: Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways. *Mol Cell* 1:933-938, 1998
14. Wicksteed B, Alarcon C, Briaud I, Lingohr MK, Rhodes CJ: Glucose-induced translational control of proinsulin biosynthesis is proportional to

preproinsulin mRNA levels in islet beta-cells but not regulated via a positive feedback of secreted insulin. *J Biol Chem* 278:42080-42090, 2003

15. da Silva Xavier G, Rutter J, Rutter GA: Involvement of Per-Arnt-Sim (PAS) kinase in the stimulation of preproinsulin and pancreatic duodenum homeobox 1 gene expression by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8319-8324, 2004

16. Rutter J, Michnoff CH, Harper SM, Gardner KH, McKnight SL: PAS kinase: an evolutionarily conserved PAS domain-regulated serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8991-8996, 2001

17. Briaud I, Harmon JS, Kelpe CL, Segu VB, Poitout V: Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* 50:315-321, 2001

18. Dalle S, Smith P, Blache P, Le-Nguyen D, Le Brigand L, Bergeron F, Ashcroft FM, Bataille D: Miniglucagon (glucagon 19-29), a potent and efficient inhibitor of secretagogue-induced insulin release through a Ca²⁺ pathway. *J Biol Chem* 274:10869-10876, 1999

19. Mukai E, Fujimoto S, Sakurai F, Kawabata K, Yamashita M, Inagaki N, Mizuguchi H: Efficient gene transfer into murine pancreatic islets using adenovirus vectors. *J Control Release* 119:136-141, 2007

20. Rozen S, Skaletsky H: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386, 2000

21. Evans-Molina C, Garmey JC, Ketchum R, Brayman KL, Deng S, Mirmira RG: Glucose regulation of insulin gene transcription and pre-mRNA processing in human islets. *Diabetes* 56:827-835, 2007
22. Iype T, Francis J, Garmey JC, Schisler JC, Nesher R, Weir GC, Becker TC, Newgard CB, Griffen SC, Mirmira RG: Mechanism of insulin gene regulation by the pancreatic transcription factor Pdx-1: application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess formation of functional transcriptional complexes. *J Biol Chem* 280:16798-16807, 2005
23. An R, da Silva Xavier G, Hao HX, Semplici F, Rutter J, Rutter GA: Regulation by Per-Arnt-Sim (PAS) kinase of pancreatic duodenal homeobox-1 nuclear import in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans* 34:791-793, 2006
24. Grose JH, Smith TL, Sabic H, Rutter J: Yeast PAS kinase coordinates glucose partitioning in response to metabolic and cell integrity signaling. *Embo J* 26:4824-4830, 2007
25. Briaud I, Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig JF, Lawrence JC, Rhodes CJ: Insulin receptor substrate-2 proteasomal degradation mediated by a mammalian target of rapamycin (mTOR)-induced negative feedback down-regulates protein kinase B-mediated signaling pathway in beta-cells. *J Biol Chem* 280:2282-2293, 2005
26. Cousin SP, Hugl SR, Wrede CE, Kajio H, Myers MG, Jr., Rhodes CJ: Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Endocrinology* 142:229-240, 2001

27. Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig J, Hugl SR, Snow L, Kahn BB, Myers MG, Jr., Rhodes CJ: Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* 276:21110-21120, 2001
28. Martinez SC, Cras-Meneur C, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA: Glucose regulates Foxo1 through insulin receptor signaling in the pancreatic islet beta-cell. *Diabetes* 55:1581-1591, 2006
29. Dickson LM, Rhodes CJ: Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E192-198, 2004
30. Martinez SC, Tanabe K, Cras-Meneur C, Abumrad NA, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA: Inhibition of Foxo1 Protects Pancreatic Islet (R)-Cells Against Fatty Acid and ER-Stress Induced Apoptosis. *Diabetes*, 2008
31. Higa M, Shimabukuro M, Shimajiri Y, Takasu N, Shinjyo T, Inaba T: Protein kinase B/Akt signalling is required for palmitate-induced beta-cell lipotoxicity. *Diabetes Obes Metab* 8:228-233, 2006
32. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ: Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 274:24202-24210, 1999
33. Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ: Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 18:5457-5464, 1998

34. El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, Joly E, Dbaibo G, Rosenberg L, Prentki M: Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* 144:4154-4163, 2003
35. Karaskov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, Volchuk A: Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 147:3398-3407, 2006
36. Piro S, Anello M, Di Pietro C, Lizzio MN, Patane G, Rabuazzo AM, Vigneri R, Purrello M, Purrello F: Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. *Metabolism* 51:1340-1347, 2002
37. Arnette D, Gibson TB, Lawrence MC, January B, Khoo S, McGlynn K, Vanderbilt CA, Cobb MH: Regulation of ERK1 and ERK2 by glucose and peptide hormones in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 278:32517-32525, 2003
38. Benes C, Poitout V, Marie JC, Martin-Perez J, Roisin MP, Fagard R: Mode of regulation of the extracellular signal-regulated kinases in the pancreatic beta-cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription. *Biochem J* 340 (Pt 1):219-225, 1999
39. Benes C, Roisin MP, Van Tan H, Creuzet C, Miyazaki J, Fagard R: Rapid activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in response to physiological concentration of glucose in the MIN6 pancreatic beta cell line. *J Biol Chem* 273:15507-15513, 1998

40. Maedler K, Storling J, Sturis J, Zuellig RA, Spinas GA, Arkhammar PO, Mandrup-Poulsen T, Donath MY: Glucose- and interleukin-1beta-induced beta-cell apoptosis requires Ca²⁺ influx and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and is prevented by a sulfonylurea receptor 1/inwardly rectifying K⁺ channel 6.2 (SUR/Kir6.2) selective potassium channel opener in human islets. *Diabetes* 53:1706-1713, 2004
41. Amezcua CA, Harper SM, Rutter J, Gardner KH: Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation. *Structure* 10:1349-1361, 2002
42. Rutter J, Probst BL, McKnight SL: Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. *Cell* 111:17-28, 2002
43. Wilson WA, Skurat AV, Probst B, de Paoli-Roach A, Roach PJ, Rutter J: Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16596-16601, 2005
44. Borter E, Niessen M, Zuellig R, Spinas GA, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH: Glucose-stimulated insulin production in mice deficient for the PAS kinase PASKIN. *Diabetes* 56:113-117, 2007
45. Hao HX, Cardon CM, Swiatek W, Cooksey RC, Smith TL, Wilde J, Boudina S, Abel ED, McClain DA, Rutter J: PAS kinase is required for normal cellular energy balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15466-15471, 2007

46. Plaisance V, Perret V, Favre D, Abderrahmani A, Yang JY, Widmann C, Regazzi R: Role of the transcriptional factor C/EBPbeta in free fatty acid-elicited beta-cell failure. *Mol Cell Endocrinol*, 2008
47. Benkhalifa S, Provot S, Nabais E, Eychene A, Calothy G, Felder-Schmittbuhl MP: Phosphorylation of MafA is essential for its transcriptional and biological properties. *Mol Cell Biol* 21:4441-4452, 2001
48. Seufert J, Weir GC, Habener JF: Differential expression of the insulin gene transcriptional repressor CCAAT/enhancer-binding protein beta and transactivator islet duodenum homeobox-1 in rat pancreatic beta cells during the development of diabetes mellitus. *J Clin Invest* 101:2528-2539, 1998

Figure Legends

Figure 1. Palmitate inhibits preproinsulin pre-mRNA and mRNA levels.

A- MIN6 cells were cultured for 24h with 2 or 11 mM glucose, \pm 0.5 mM palmitate. Mature (mINS2) or pre- (mPre-INS2) preproinsulin mRNA levels were measured by RT-PCR and normalized by β -actin mRNA levels. **B -** Rat islets were cultured for 24h with 2.8 or 16.7 mM glucose \pm 0.5 mM palmitate. Mature (rINS2) or pre- (rPre-INS2) preproinsulin RNA levels were measured by RT-PCR and normalized by cyclophilin mRNA levels. **C-** Insulin 1, Glut2, Glucokinase (GK), and IAPP mRNA as well as IAPP pre-mRNA levels were measured by RT-PCR and normalized by cyclophilin mRNA levels. Results are expressed as fold increase of the ratio of gene/ β -actin or cyclophilin mRNA over the control value and are mean \pm SE of 3 replicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; NS, not significant.

Figure 2. Palmitate enhances ERK1/2 and PKB phosphorylation.

Representative immunoblots of phospho- and total ERK1/2 (**A and F**) and phospho-Ser⁴⁷³- and total PKB (**D and G**) in MIN6 cells or rat islets, respectively. **A-** MIN6 cells were exposed for 12h to 2 or 11 mM glucose \pm 0.5 mM palmitate, and phospho- and total ERK1/2 were examined by immunoblotting. **B, C-** Quantitative measurements of ERK1 (**B**) and ERK2 (**C**) phosphorylation after a 12- and 24-h culture. Data are mean \pm SE of 4 replicate experiments and are normalized to control values at 2 mM glucose and the same time point. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. **D-** MIN6 cells were exposed for 12h to 2 or 11 mM glucose \pm 0.5 mM palmitate, and phospho- and total PKB were examined by immunoblotting. **E-** Quantitative measurements of PKB phosphorylation after a 12- or 24-h culture. **F-** Rat islets were exposed for 18h to 2.8 or 16.7 mM glucose \pm 0.5 mM palmitate,

and phospho- and total ERK1/2 were examined by immunoblotting. Data are mean \pm SE of 4 replicate experiments and are normalized to the control values at 2 mM glucose. **, P<0.01. **G-** Rat islets were exposed for 18h to 2.8 or 16.7 mM glucose \pm 0.5 mM palmitate, and phospho- and total PKB were examined by immunoblotting.

Figure 3. Inhibition of ERK 1/2 pathway, but not PKB, partially prevents palmitate inhibition of insulin gene expression in MIN6 cells and rat islets. **A-** Representative immunoblots of phospho- and total ERK1/2 in MIN6 cells exposed for 24h to 2 or 11 mM glucose \pm 0.5 mM palmitate, in the presence or absence of U0126 (10 μ M). **B-** Representative immunoblots of phospho- and total PKB in MIN6 cells exposed for 24h to 2 or 11 mM glucose \pm 0.5 mM palmitate, in the presence or absence of LY 294002 (20 μ M). **C-** Effects of U0126 (10 μ M) and LY 294002 (20 μ M) on insulin pre-mRNA levels in MIN6 cells. Results are expressed as fold increase of the ratio of Pre-INS2/ β -actin mRNA over the control value and are mean \pm SE of 4 to 7 replicate experiments. **D, E, F-** Insulin pre-mRNA levels in rat islets, exposed for 24-h to 2.8 mM glucose or 16.7 mM glucose, \pm 0.5 mM palmitate, with 0, 10 or 30 μ M U0126 (**D**); 0, 10 or 50 μ M PD98059 (**E**); or 0 or 20 μ M LY 294002 (**F**). Results are expressed as fold increase of the ratio of Pre-INS2/cyclophilin mRNA over control value and are mean \pm SE of 8 replicate experiments. **, P<0.01; ***, P<0.001.

Figure 4. Inhibition of insulin gene expression by C2-ceramide is prevented by ERK1/2 inhibition. **A-** Representative immunoblots of phospho- and total ERK1/2 in MIN6 cells exposed for 24h to 2 or 11 mM glucose \pm 50 μ M C2-ceramide, in the presence or absence of U0126 (30 μ M) or PD98059 (50 μ M). **B-** Effects of U0126 (30 μ M) on insulin pre-mRNA

levels in MIN6 cells. Results are expressed as fold increase of the ratio of Pre-INS2/ β -actin mRNA over control value and are mean \pm SE of 3 replicate experiments.

Figure 5. Inhibition of ERK1/2 does not prevent palmitate inhibition of MafA expression and has no effect on PDX-1 and C/EBP β expression.

MIN6 cells were cultured for 24h with 2 mM or 11 mM glucose, \pm 0.5 mM palmitate, in the presence or absence of U0126 (30 μ M). MafA (A), PDX-1 (B), and C/EBP β (C) mRNA levels were measured by RT-PCR and normalized to β -actin mRNA. Results are expressed as fold increase of the ratio of Gene/ β -actin mRNA over control value and are mean \pm SE of 3 replicate experiments. **, P<0.01; ***, P<0.001 vs. vehicle.

Figure 6. Palmitate decreases glucose-induced PASK kinase expression in MIN6 cells and rat islets.

A- MIN6 cells were cultured for 6h with 2 or 11 mM glucose \pm 0.5 mM palmitate. Results are expressed as fold increase of the ratio of mPASK/ β -actin mRNA over control value and are mean \pm SE of 3 replicate experiments. **B-** Rat islets were cultured for 6h with 2.8 or 16.7 mM \pm 0.5 mM palmitate. Results are expressed as fold increase of the ratio of rPASK/cyclophilin mRNA over control value and are mean \pm SE of 3 replicate experiments. *, P<0.05; ***, P<0.001. **C-** Representative immunoblots for PASK in MIN6 exposed to 2 or 11 mM glucose for 24h \pm 0.5 mM palmitate. **D-** Quantification of PASK expression in MIN6 cells after a 24-h exposure to 2 or 11 mM glucose \pm 0.5 mM palmitate. Results are expressed as fold increase of the ratio of PASK/p85 protein over control value and are mean \pm SE of 3 replicate experiments. *, P<0.05; ***, P<0.001.

Figure 7. Overexpression of PAS kinase prevents the inhibitory effects of palmitate on insulin gene expression. **A-** Representative hPASK and p85 immunoblots of control, Adv-Luc-infected, or Adv-hPASK WT-infected MIN6 cells cultured for 24h in 2 or 11 mM glucose \pm 0.5 mM palmitate. **B-** Insulin pre-mRNA levels. Results are expressed as fold increase of the ratio of mPre-INS2/ β -actin mRNA over control value and are mean \pm SE of 7 replicate experiments. *, P< 0.05; **, P<0.01. **C-** Representative hPASK and p85 immunoblots of control, Adv-Luc-infected, Adv-hPASK WT- or Adv-hPASK KD-infected rat islets cultured for 24h in the presence of 16.7 mM glucose + 0.5 mM palmitate. **D-** Pre-INS2, MafA, PDX-1 and C/EBP β mRNA levels were measured by RT-PCR and normalized to cyclophilin mRNA. Results are expressed as fold increase of the ratio of rGene/rCyclophilin mRNA over control value (Adv-Luc) and are mean \pm SE of 3 replicate experiments. *, P< 0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

Figure 8. PDX-1 protein expression in MIN6 cells overexpressing hPASK WT or KD. MIN6 cells were infected with adenoviruses expressing Luc (**A-C**), WT hPASK (**D-F**) or KD hPASK (**G-I**), and cultured for 24h with 2 mM glucose (**A, D, G**), 11 mM glucose (**B, E, H**), or 11 mM glucose + palmitate (**C, F, I**). Cells were immunostained for PDX-1 and examined under a fluorescence microscope. Images are representative of 3 replicate experiments.

Figure 1

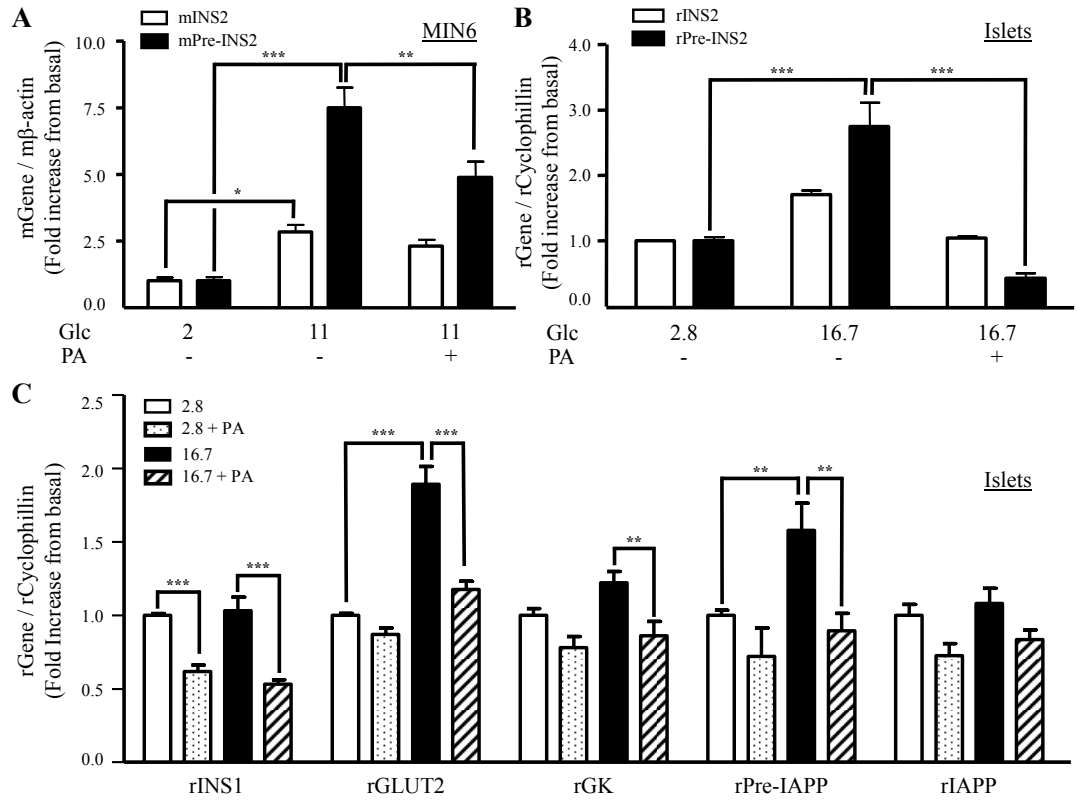


Figure 2

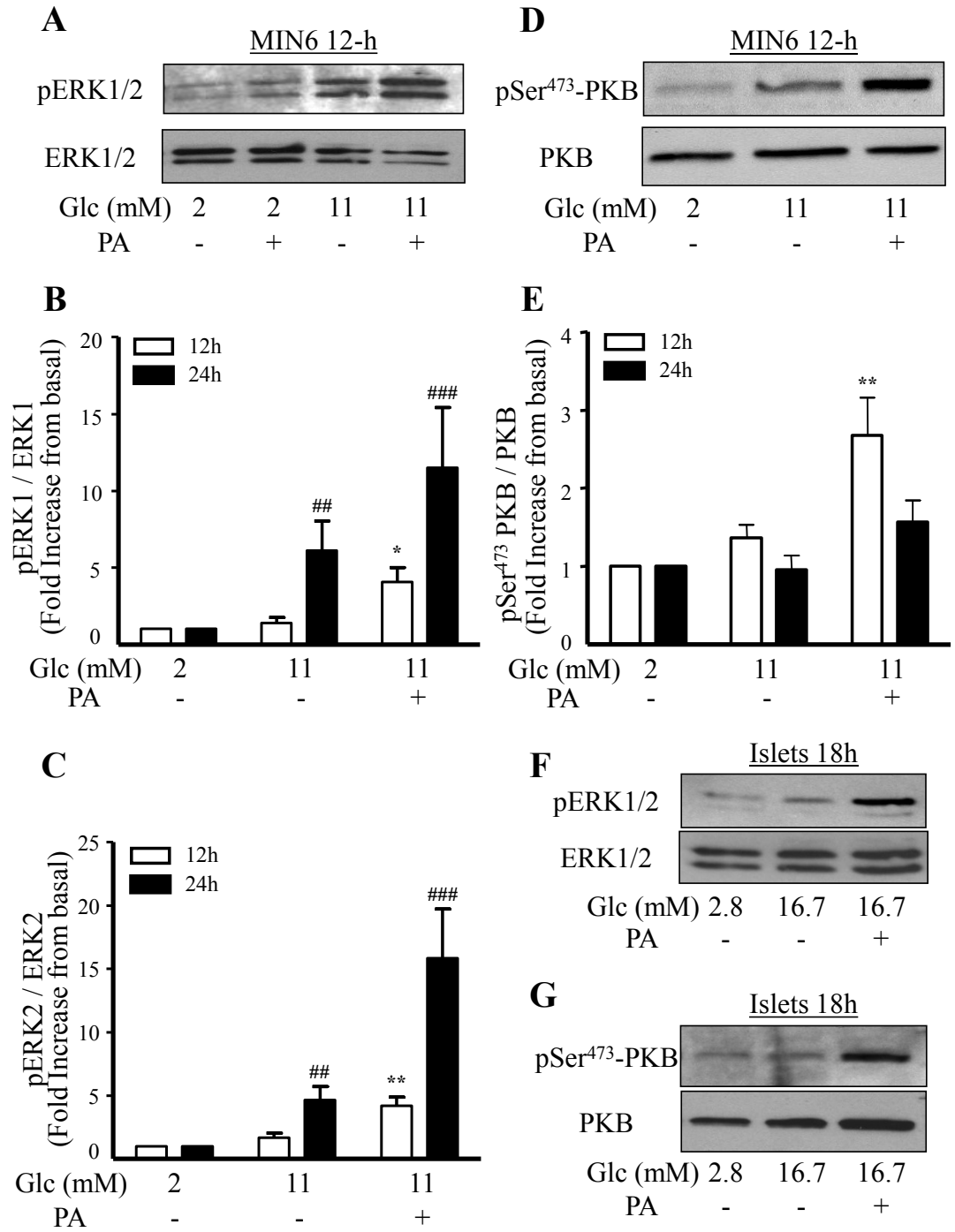


Figure 3

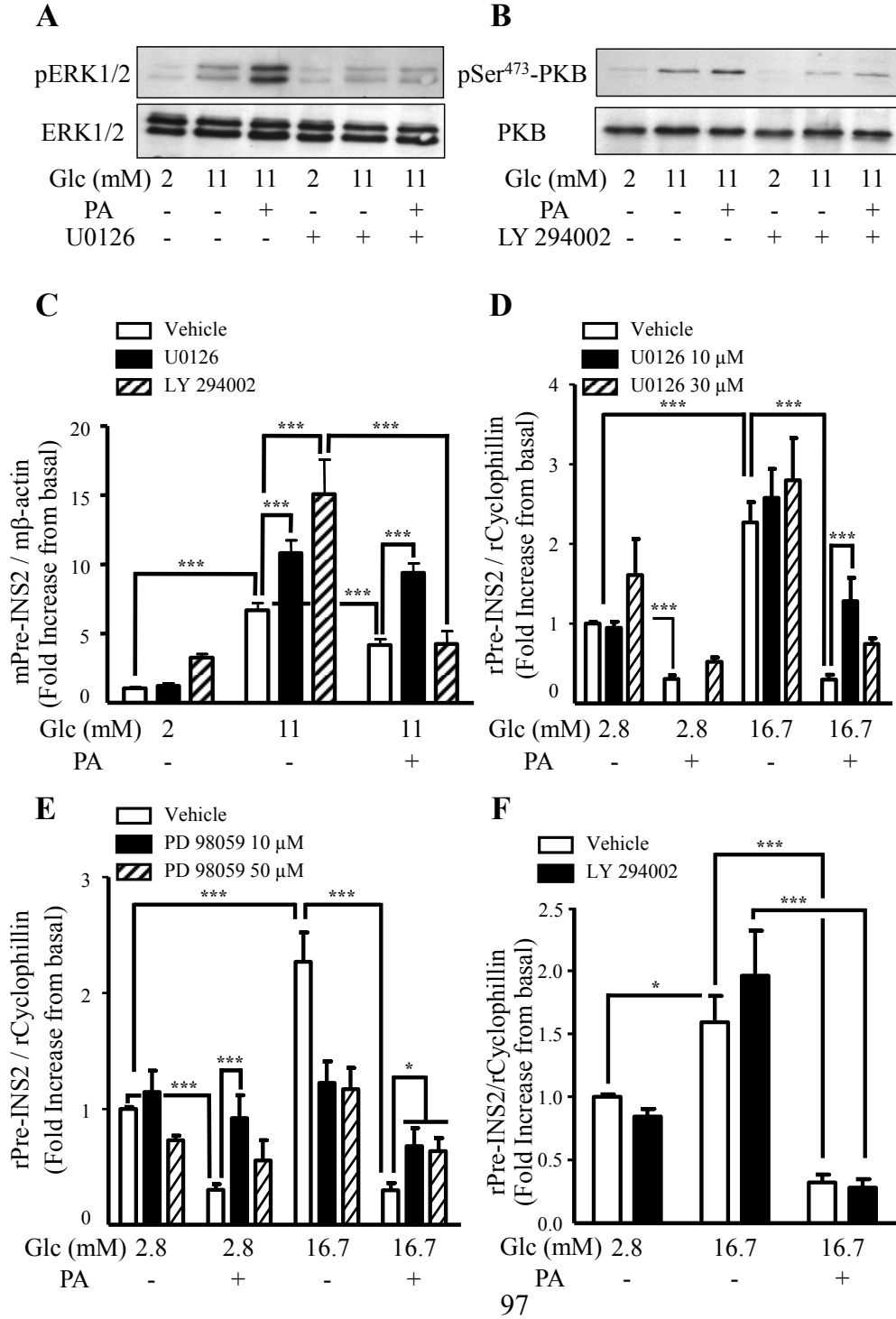


Figure 4

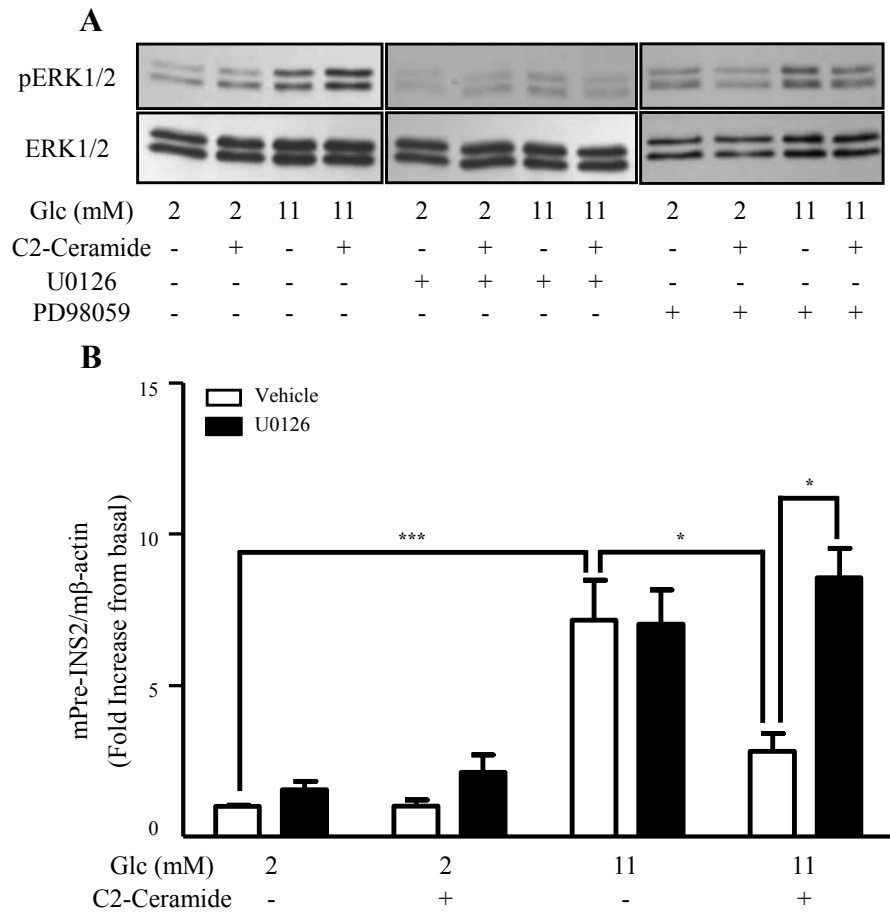


Figure 5

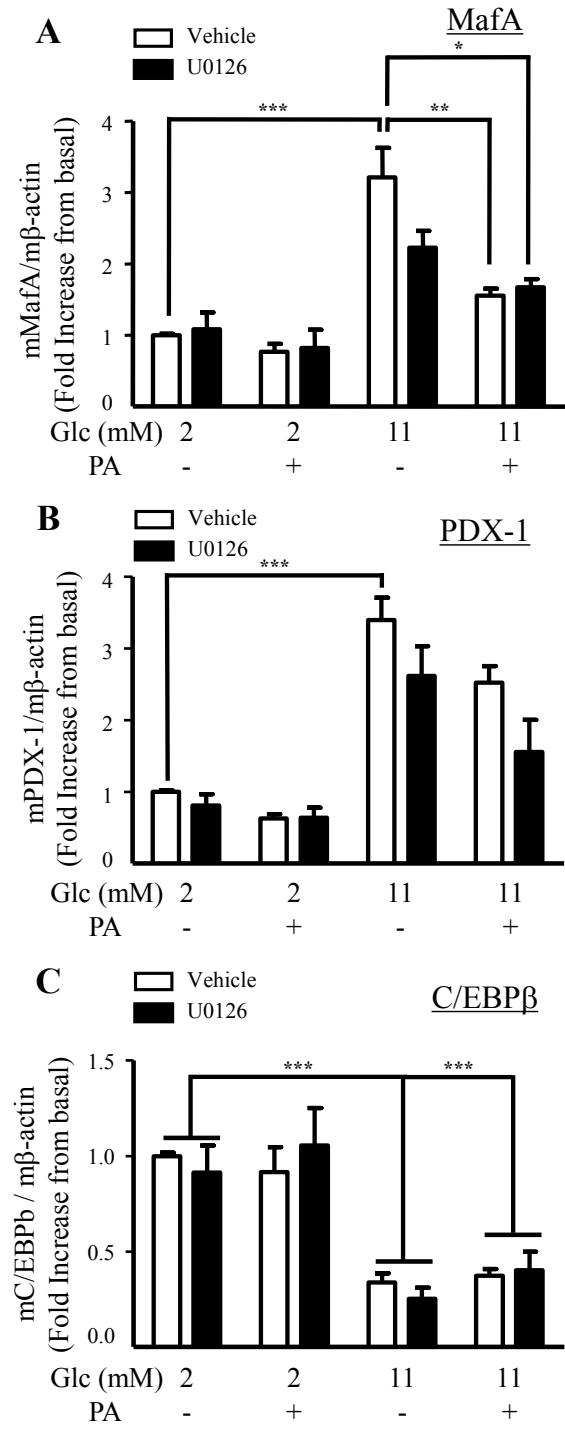


Figure 6

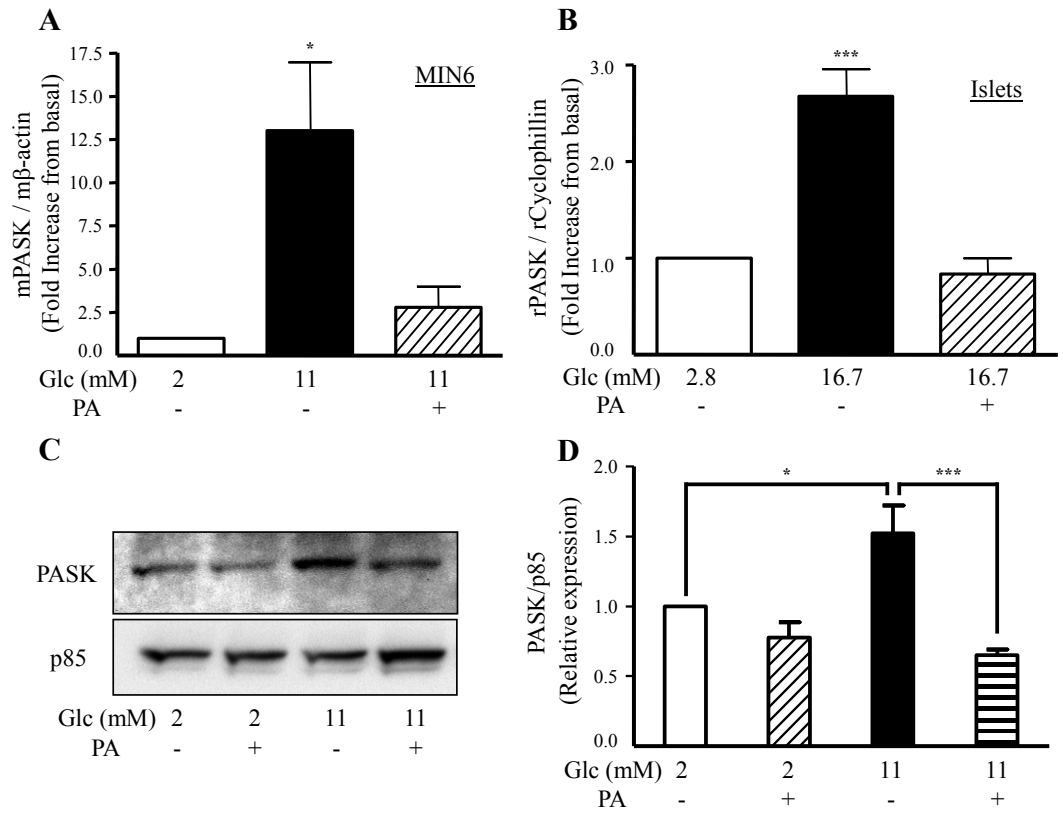


Figure 7

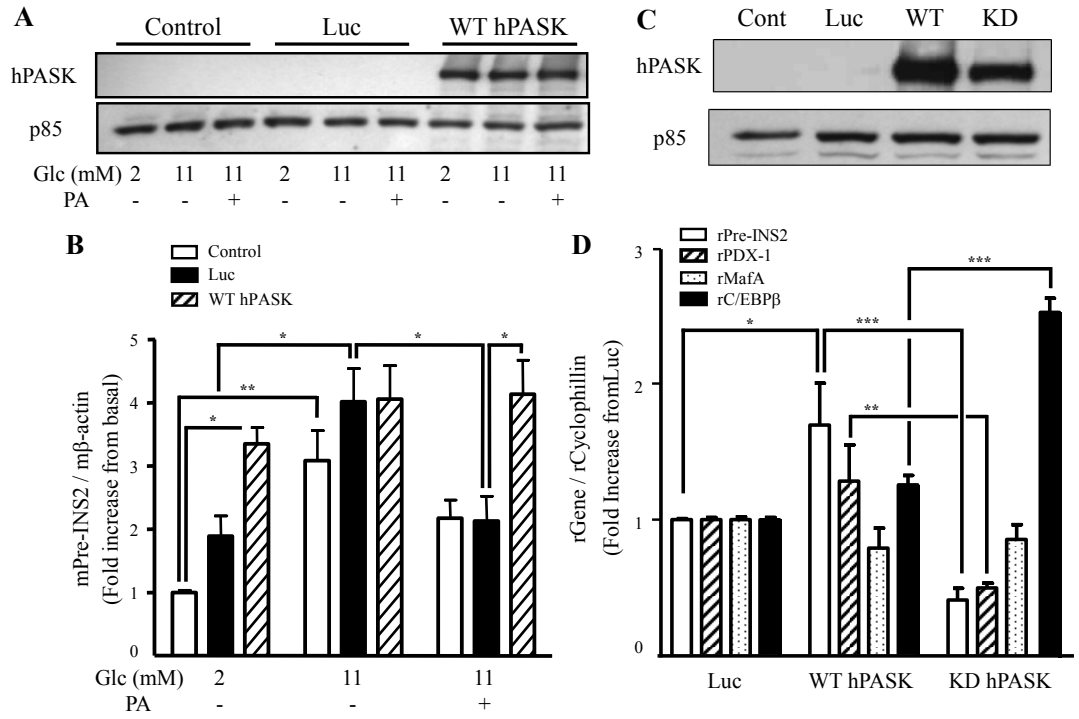
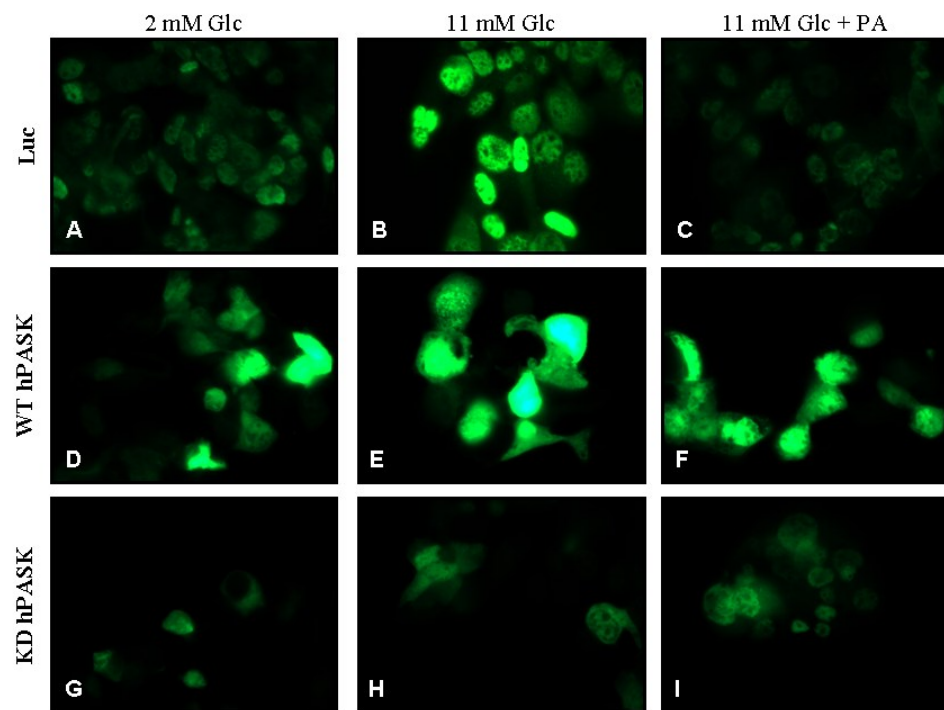


Figure 8



Supplemental Table 1. Primer sequences for RT-PCR.

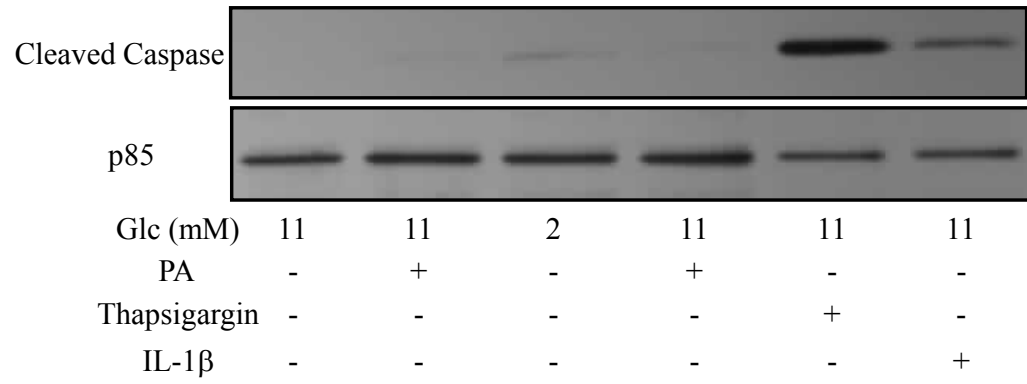
Gene	Primers Sequences (5'-3')
rINS2	Fwd: AAGCTCTCTACCTGGTGTGTGG Rev: GTAGAGAGAGCAGATGCTGGTG
Pre-rINS2	Fwd: AGCGTGGATTCTTCTACACACC Rev: AAGGATTCTCACTCCTTCTTGG
rCyclophilin	Fwd: CTTGCTGCAGACATGGTCAAC Rev: GCCATTATGGCGTGTGAAGTC
rIAPP	Fwd: CGCAGGATGGACACTAATGA Rev: GCAGTGGCAGCAATAACAGA
Pre-rIAPP	Fwd: ATCTGTTATTGCTGCCACTGC Rev: AACCCACCTCCTTCAGTTCTGG
rINS1	Fwd: GCTCTGTACCTGGTGTGTGG Rev: GTGCCAAGGTCTGAAGATCC
rGlucokinase	Fwd: GGATGCAGAAGGAGATGGACC Rev: GTCTCCGACTTCTGAGCCTTC
rGLUT2	Fwd: AGCCAGCCTGTGTATGCAACC Rev: AGTCCCAGCGACATGAAGACG
rPASK	Fwd: ATCTCCTGTGTGGAAGTGTCC Rev: TGTGATGGAGTTCTGTCTGTCC
rMafA	Fwd: AGCAAGGAGGAGGTGATCC Rev: ATCTCCTGCTTGAGGTGGTC
rPDX-1	Fwd: GAACCGGAGGAGAATAAGAGG Rev: AGTCAAGTTGAGCATCACTGC
rC/EBP β	Fwd: CAAGCTGAGCGACGAGTACA Rev: CAGCTGCTCCACCTTCTTCT
hPASK	Fwd: GGAGGATTGTTGGATTGAGG Rev: CATCACAAGCTGGAAGAACC
mINS2	Fwd: TGGAGGCTCTCTACCTGGTG Rev: TCTACAATGCCACGCTTCTG
Pre-mINS2	Fwd: TGTGTCCATCCATGACCAGT Rev: CAGTGCCAAGGTCTGAAGGT

m β -actin	Fwd: CATGGATGACGATATCGCTGC Rev: GTACGACCAGAGGCATACAGG
mPASK	Fwd: TACTTCCTGCTGCTCCTTGC Rev: TCTCTGTGGTCTTGGCATCC
mMafA	Fwd: GTGCTGGAGGATCTGTACTGG Rev: ATGGTGGTGTGGTGTATGG
mPDX-1	Fwd: GGTATAGCCGGAGAGATGC Rev: CTGGTCCGTATTGGAACG
mC/EBP β	Fwd: CAAGCTGAGCGACGAGTACA Rev: CAGCTGCTCCACCTTCTTCT

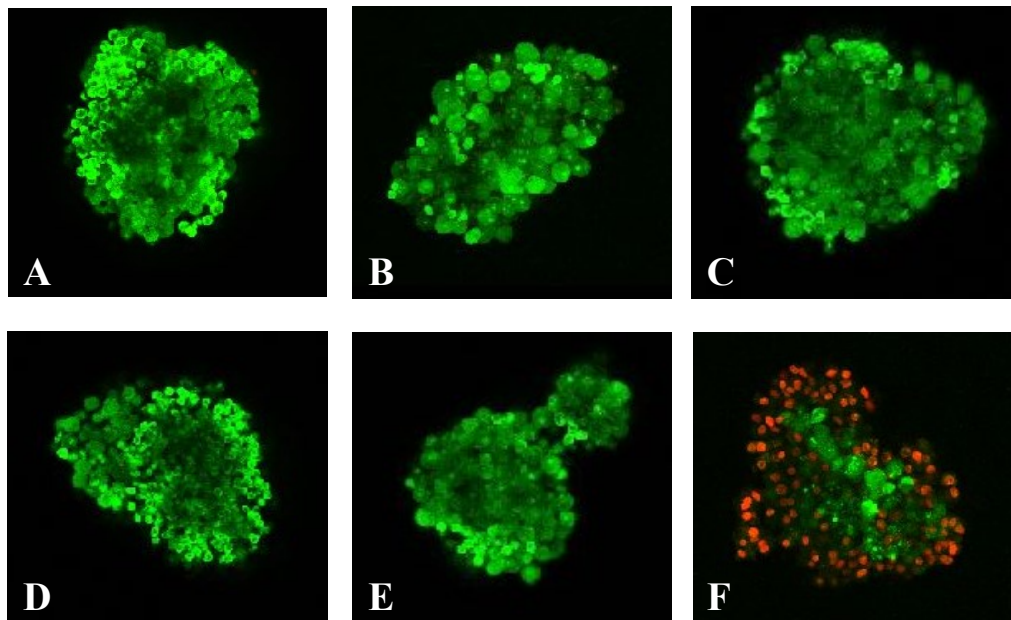
Supplemental Figure 1: Caspase 3 cleavage in MIN6 cells. Representative immunoblots for cleaved caspase 3 and the p85 sub-unit of PI3K, as a loading control, in MIN6 exposed for 24h to 2 mM glucose, 11 mM glucose \pm 0.5 mM palmitate, 2 μ M thapsigargin, or 200 ng/ml IL-1 β .

Supplemental Figure 2. AO/PI staining in islets. Rat islets were exposed for 24h to 2.8 mM glucose (**A**) or 16.7 mM glucose + 0.5 mM palmitate (**B**). Rat islets infected with adenoviruses expressing Luc (**C**), WT hPASK (**D**), or KD hPASK (**E**) were cultured for 24h with 16.7 mM glucose + 0.5 mM palmitate. (**F**): Islets were exposed for 4h to 100 μ M H₂O₂. Islets were stained with acridine orange (AO; green, viable cells) and propidium iodide (PI; red, dead cells) and examined by confocal microscopy.

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



Article 2 Rôle de PAS kinase dans la régulation de la stabilité protéique de PDX-1.

Mise en contexte :

Le facteur de transcription PDX-1 joue un rôle central dans le développement du pancréas ainsi que dans la régulation et le maintien de la fonction bêta pancréatique. La déficience totale en PDX-1 entraîne une agénésie du pancréas chez la souris (194) comme chez l'humain (200). Chez l'humain, les mutations hétérozygotes dans le gène de PDX-1 donnant lieu à un défaut d'expression de la protéine entraînent un défaut de l'activité du promoteur du gène de l'insuline, une diminution de l'expression de la préproinsuline ainsi qu'un défaut de la sécrétion d'insuline et prédispose les individus porteurs au diabète de type MODY (69,203,204). Les souris hétérozygotes pour la déficience en PDX-1 ont également un défaut dans la fonction bêta pancréatique (195,197). Enfin, les études effectuées sur les souris déficientes en PDX-1 de façon conditionnelle ont clairement démontré l'importance du maintien des niveaux normaux en PDX-1 lors du développement embryonnaire ainsi que dans le maintien de la fonction bêta pancréatique à l'âge adulte (367,368). Ainsi, l'homéostasie du glucose est sensible aux niveaux d'expression de PDX-1.

La phosphorylation de PDX-1 est régulée par le glucose. Elle joue un rôle important dans sa translocation nucléaire (243), son activité de liaison au promoteur du gène de l'insuline (146,244) ainsi que son potentiel de

transactivation du promoteur du gène de l'insuline (218,369). La phosphorylation joue également un rôle crucial dans la régulation de l'expression et la stabilité de PDX-1. En effet, il a été montré que la protéine kinase GSK3 β phosphoryle PDX-1 sur le résidu Ser²⁶⁸ (246), ce qui entraîne sa dégradation par le complexe du protéasome (245,246). En réponse au glucose, la protéine kinase Akt phosphoryle et inactive GSK3 β , ce qui diminue la phosphorylation de PDX-1 sur résidus sérine et prévient donc sa dégradation (245,246).

Les travaux publiés dans l'article 1 cité plus haut dans le cadre de cette thèse ont permis de montrer que la surexpression de la forme sauvage de PASK dans les cellules β pancréatiques mime les effets du glucose sur l'expression du gène de l'insuline ainsi que sur l'expression de PDX-1 et prévient les effets délétères du palmitate (176). La surexpression de la forme inactive de PASK dans ces cellules bloque l'induction de l'expression du gène de l'insuline et de PDX-1 par le glucose. Ainsi, ces observations suggèrent un rôle important de PASK dans la régulation de l'expression de PDX-1.

L'objectif de ce second volet de la thèse est d'identifier les mécanismes par lesquels PASK module l'expression de PDX-1. Plus spécifiquement, cette étude vise à :

1. Examiner l'effet du glucose et de PASK sur la phosphorylation de PDX-1.
2. Déterminer l'implication de GSK3 β dans les mécanismes de régulation de l'expression et de la stabilité de PDX-1 par PASK.
3. Étudier le rôle de PASK dans la régulation de la translocation sub-cellulaire de PDX-1.

Titre: Per-Arnt-Sim Kinase Regulates Pancreatic Duodenal Homeobox-1 Protein Stability via Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3 Beta in Pancreatic Beta Cells.

Auteurs : Meriem Semache, Bader Zarrouki, Ghislaine Fontés, Sarah Fogarty, ChintanKikani, Mohammad B Chawki, Jared Rutter et Vincent Poitout.

Publié dans le Journal of Biological Chemistry, 2013.

Contribution des auteurs :

Meriem Semache : Auteure principale. A élaboré les hypothèses, conçu et réalisé toutes les expériences, sauf celles de la figure 2 (collaboration). A analysé toutes les données et rédigé la première version du manuscrit.

Bader Zarrouki : Coauteur. A contribué à l'élaboration des hypothèses et à la conception des expériences. A participé aux isolements des îlots de pancréas de rats et de souris et a effectué les expériences de mise au point sur les îlots de souris.

Ghislaine Fontés : Coauteure. A contribué à l'élaboration des hypothèses. A procédé aux chirurgies sur les rats servant à l'infection des pancréas.

Sarah Fogarty : Coauteure et collaborateur sous la supervision de JR. A effectué les expériences de phosphorylation de GSK3 β par PASK *in vitro*. A participé à la révision du manuscrit.

ChintanKikani : Coauteur et collaborateur sous la supervision de JR. A effectué les expériences de phosphorylation de GSK3 β sur résidu Ser⁹ par PASK *in vitro*.

Mohammad B Chawki : Coauteur. A aidé dans les expériences de stabilité protéique dans les cellules MIN6.

Jared Rutter: Coauteur et collaborateur. A fourni les résultats de phosphorylation de GSK3 β par PASK *in vitro*. A participé dans la révision du manuscrit.

Vincent Poitout: Directeur de thèse. A dirigé tout le projet et rédigé le manuscrit.

Per-Arnt-Sim Kinase Regulates Pancreatic Duodenal Homeobox-1 Protein Stability via Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3 Beta in Pancreatic Beta Cells.

Running title: PASK regulates PDX-1 stability via GSK3 β .

Meriem Semache^{1,2}, Bader Zarrouki^{1,3}, Ghislaine Fontés¹, Sarah Fogarty⁴, Chintan Kikani⁴, Mohammad B Chawki¹, Jared Rutter⁴ and Vincent Poitout^{1,2,3}

¹Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, Departments of ²Biochemistry and ³Medicine, University of Montreal, QC, Canada and ⁴Department of Biochemistry, University of Utah, Salt Lake City, UT, USA

Keywords: PAS kinase, GSK3 β , PDX-1.

Background: The enzyme PASK regulates the expression of PDX-1 and insulin in pancreatic beta cells via unknown mechanisms.

Results: PASK enhances PDX-1 protein stability via phosphorylation of GSK3 β on Ser⁹.

Conclusion: PASK regulates insulin gene expression at least in part through inactivation of GSK3 β and stabilization of PDX-1 protein.

Significance: We identified GSK3 β as a novel target of PASK in the regulation of pancreatic beta-cell function.

SUMMARY

In pancreatic β cells, glucose induces the binding of the transcription factor pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) to the *insulin* gene promoter to activate *insulin* gene transcription. At low glucose levels, glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) is known to phosphorylate PDX-1 on C-terminal serine residues, which triggers PDX-1 proteasomal degradation. We previously showed that the serine/threonine Per-ARNT-Sim domain-containing kinase (PASK) regulates *insulin* gene transcription via PDX-1. However, the mechanisms underlying this regulation are unknown. In this study, we aimed to identify the role of PASK in the regulation of PDX-1 phosphorylation, protein expression and stability in insulin secreting cells and isolated rodent islets of Langerhans. We observed that glucose induces a decrease in overall PDX-1 serine phosphorylation, and that overexpression of wild-type PASK mimics this effect. *In vitro*, PASK directly phosphorylates GSK3 β on its inactivating phosphorylation site Ser⁹. Overexpression of a kinase-dead (KD), dominant-negative version of PASK blocks glucose-induced Ser⁹ phosphorylation of GSK3 β . Accordingly, GSK3 β Ser⁹ phosphorylation is reduced in islets from *pask*-null mice. Overexpression of wild-type (WT) PASK or KD GSK3 β protects PDX-1 from degradation and results in increased PDX-1 protein abundance. Conversely, overexpression of KD PASK blocks glucose-induction of PDX-1 protein. We conclude that PASK phosphorylates and inactivates GSK3 β , thereby preventing PDX-1 serine phosphorylation and alleviating GSK3 β -mediated PDX-1 protein degradation in pancreatic β cells.

The production and secretion of insulin by the pancreatic β cell is an exquisitely regulated process ensuring the maintenance of circulating glucose levels within a narrow physiological range despite large variations in energy intake and expenditure throughout the day. Dysregulation of this process leads to diabetes, a disease affecting over 370 M people worldwide. The major regulator of β -cell function is glucose, which coordinately stimulates transcription of the *insulin* gene; splicing, stability and translation of the insulin mRNA; processing of proinsulin into mature insulin; and insulin secretion (1).

Transcription of the *insulin* gene is controlled by a highly complex network of transcription factors, amongst which pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) plays a critical role. PDX-1 is essential for pancreas development and β -cell function in mice (2) and humans (3). Glucose stimulates several aspects of PDX-1 expression and function, including nuclear translocation (4,5), binding to the A boxes on the insulin promoter region (6), transactivation potential (7), and protein stability (8). However, the precise mechanisms by which glucose regulates PDX-1 are largely unknown and still debated. In particular, the functional importance of glucose-stimulated PDX-1 phosphorylation is unclear. While some studies reported a stimulatory effect of PDX-1 phosphorylation (9-12), others have come to opposite conclusions (8,13-16). These discrepancies are partly due to the fact that specific phosphorylated residues are likely to have different functional effects. Indeed, phosphorylation of N-terminal serine residues such as Ser⁶² and Ser⁶⁶ was reported to correlate with PDX-1 activation (12), whereas phosphorylation of C-terminal Ser²⁶⁸ and Ser²⁷² by glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 β) triggers PDX-1 protein degradation (8).

The Per-ARNT-Sim domain-containing kinase (PASK) is a nutrient-responsive serine/threonine protein kinase highly conserved from yeast to humans (17-21). In mammals, PASK regulates glycogen synthase (22) and is required for normal cellular energy homeostasis (22). Glucose induces PASK gene and protein expression in both isolated rat islets and insulin-secreting MIN6 cells (23,24). At basal glucose levels, overexpression of wild-type (WT) PASK increased both insulin and PDX-1 expression, whereas overexpression of a kinase-dead (KD) mutant of PASK acting as a dominant-negative blocked glucose-induced *insulin* gene expression as well as PDX-1 protein expression (23,24), suggesting that PASK regulates the *insulin* gene via PDX-1. However, how PASK modulates PDX-1 activity is unknown. PASK being a serine/threonine kinase, we envisioned two possibilities: either PASK directly phosphorylates PDX-1 at a positive regulatory site; or it alleviates a negative regulation by phosphorylating another kinase such as GSK3 β . This study was aimed to test these possibilities by examining the role of PASK in the phosphorylation, stability and protein abundance of PDX-1 in pancreatic β cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents, plasmids and adenoviruses– Hyclone Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) was from (ThermoFisher Scientific, Ontario, CA). RPMI-1640 and FBS were from Invitrogen (Burlington, ON). Cycloheximide was from Sigma (St. Louis, MO). Adenoviruses encoding for luciferase, wild-type (WT) human (h)PASK and kinase-dead (KD) hPASK were generated and purified as described (23,25). Empty vector (EV), WT hPASK and KD hPASK plasmids as well as pcDNA3.1-PDX-1-cMyc plasmid were from Dr. Guy Rutter (Imperial College London, London, United Kingdom, (26)). The pcDNA3.1-GFP plasmid was from Dr. Marc Prentki (Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, Montreal, QC, Canada). WT and KD GSK3 β constructs were from Addgene (Cambridge, MA).

Cell culture, infection and transfection–MIN6 cells (passage 28–31; obtained from Dr. Guy Rutter, Imperial College London, United Kingdom) were maintained in Hyclone DMEM containing 25 mM glucose and supplemented with 15 % BGS and 0.005 % β -mercaptoethanol. Cells were infected overnight with adenoviruses encoding for Luciferase, WT PASK or KD PASK at 100 multiplicities of infection / cell. HIT-T15 cells (passages 74–86; obtained from R. Paul Robertson, Pacific Northwest Diabetes Research Institute, Seattle, WA, USA) were maintained in RPMI-1640 containing 11.1 mM glucose and supplemented with 10 % FBS. Transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as per manufacturer's instructions. Glucose stimulation in MIN6 cells was performed as previously reported (24). Following HIT-T15 transfection, medium was changed to 1 mM glucose for 24 h and to 0.1 mM glucose 0.5 % BSA for an additional 2 h after which cells were stimulated in 0.1 mM or 5 mM glucose.

Animals– All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Animals were housed on a 12-h light/dark cycle with free access to water and standard laboratory chow. For arterial delivery of adenoviral vectors, 250–275g male Wistar rats (Charles River, St.-Constant,

QC) were anesthetized and subjected to laparotomy. After ligation of the portal vein, the superior aorta, and the hepatic, mesenteric, and right and left renal arteries, adenoviruses encoding for either Luciferase, WT hPASK or KD hPASK were injected in the celiac trunk of the inferior aorta as described (24). Islets were isolated and recovered overnight. They were precultured for 16 h at 2.8 mM glucose and then exposed to 2.8 or 16.7 mM glucose for 24h. WT and *pask*-null mice were purchased from The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). At 8-12 weeks of age, pancreatic islets were isolated and recovered overnight as previously described (27).

Western blotting– Protein extraction and Western blotting were performed as previously described (28). Membranes were blotted against pSer⁹ GSK3 β (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA or Cell Signaling Technologies) or total GSK3 β (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), human PASK (Sigma), PDX-1 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) or the p85 subunit of PI3K (New England Biolabs) as indicated in RESULTS. The density of protein bands was quantified using ImageJ software (NIH, USA).

Cycloheximide treatment– 100 μ g/ml cycloheximide (Sigma) were added to the culture medium 24 h following transfection for 6 h. Proteins were then extracted and subjected to Western blotting as described above.

Immunoprecipitation–MIN6 cells were lysed in sodium orthovanadate (NaOV) buffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 mM NaOV, 1 % NP-40) with a complete complement of protease and phosphatase inhibitors. Total protein extracts were immunoprecipitated using Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and an anti-rabbit PDX-1 antibody (Upstate Biotechnology). Immunoblots were probed with an anti-goat PDX-1 (R&D system, Burlington, CA) or an anti-mouse pSer (Assaydesigns, Exeter, UK).

PDX- immunostaining–MIN6 cells were seeded on poly-L-lysine-coated (Sigma) coverslips and infected overnight with adenoviruses encoding for Luciferase, WT PASK

or KD PASK as described above. Following glucose stimulation, cells were fixed and permeabilized with 3.7 % formaldehyde and 0.2 % Triton X-100. Cells were incubated with PDX-1 or hPASK antibodies followed by Alexa Fluor® 488 and Alexa Fluor® 546 (Life Technologies, Burlington, ON) fluorophore-conjugated secondary antibodies, respectively. Cells were mounted on coverslips with VectaShield mounting media (VectorLab) with DAPI for nuclei detection. Images were acquired using a EE (×40) and Zen Imaging Software. Fluorescence was quantified using ImageJ software.

GSK3β in vitro phosphorylation– HepG2 cells expressing PASK-HA-FLAG were harvested and PASK was purified using anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma). PASK-HA-FLAG was eluted using a 3X FLAG peptide. 7 μl of purified PASK-HA-FLAG was incubated +/- 8 μl His-GSK3β (Abcam) in 50 mM Hepes buffer, pH 7.4 with 50 μM ³²P-ATP, 5 mM MgCl₂. The reaction was incubated for 30 minutes at 30°C and was terminated by the addition of 4x Laemmli buffer. Samples were heated at 95°C for 5 minutes and run on a 10 % SDS-PAGE gel at 100 V for 20 minutes followed by 200 V for 50 minutes. The gel was washed in ddH₂O for 15 minutes, stained with GelCode Blue (Thermo Scientific) for 1 h and destained overnight with ddH₂O. The destained gel was visualized and subjected to autoradiography. Bands were excised and ³²P incorporation was measured by scintillation counting. For Ser⁹ phosphorylation, 150 ng of purified GSK3β (Sigma) were added in the final kinase reaction volume of 30 μl containing either no PASK, ~10ng or ~100ng Flag-tag PASK purified from 293T cells by Flag affinity column. The kinase reaction was performed for 30 min at 30C. The reactions were stopped by adding SDS buffer. Western blots were performed using anti p-Ser⁹ GSK3β, total GSK3β (Cell Signaling Technologies), or FLAG M2 (Sigma) antibodies.

Statistics–Data are expressed as mean ± SEM. Significance was tested using Student's paired *t* test, one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test or two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* adjustment for multiple comparisons, as appropriate, using GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA). A value of *p* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

High glucose and overexpression of WT PASK decrease PDX-1 serine phosphorylation in MIN6 cells. To first assess the phosphorylation state of PDX-1 in response to glucose stimulation, MIN6 cells were exposed to 2 or 11 mM glucose for 24 h. PDX-1 was then immunoprecipitated from total protein extracts and tested for serine phosphorylation by Western blot. As shown in Fig. 1, glucose significantly decreased PDX-1 serine phosphorylation ($p \leq 0.01$; Fig. 1A&B). In contrast, glucose had no detectable effect on threonine phosphorylation (data not shown). To test a potential role for PASK on PDX-1 serine phosphorylation, MIN6 cells were infected with adenoviruses encoding WT hPASK or Luciferase (Luc) as a control and exposed to 2 or 11 mM glucose for 24 h. Immunoprecipitation of total PDX-1 protein followed by Western blot analysis revealed a significant decrease in PDX-1 serine phosphorylation at low glucose in MIN6 cells overexpressing WT hPASK ($p < 0.05$; Fig. 1C&D). Thus, PASK mimics the effect of high glucose on PDX-1 serine phosphorylation. Since PASK is a serine/threonine kinase, these observations suggest that it might indirectly lead to a decrease in PDX-1 serine phosphorylation by phosphorylating and inactivating another kinase which, itself, would phosphorylate PDX-1 on serine residues. A candidate for this is GSK3 β , which is inactivated by phosphorylation at Ser⁹ in response to glucose (29,30). When GSK3 β is active (dephosphorylated), it increases PDX-1 serine phosphorylation at C-terminal residues (8) and induces its proteasomal degradation (8,14,15).

PASK phosphorylates GSK3 β at Ser⁹ in vitro. The amino-acid sequence surrounding Ser⁹ of GSK3 β (RPRTTS) matches the consensus sequence for PASK substrate phosphorylation (31). To test whether PASK can directly phosphorylate GSK3 β , we incubated His-GSK3 β recombinant protein with purified WT or KD hPASK in the presence of ³²P-ATP. The reaction product was run on SDS-PAGE and first stained with Coomassie Blue for protein quantification (Fig. 2A, lower panel), subjected to autoradiography (Fig. 2A, upper panel) and quantified (Fig. 2B). Incubation of recombinant GSK3 β with WT hPASK, but not with KD hPASK, induced a large increase

in ^{32}P incorporation into GSK3 β ($p < 0.05$; Fig. 2B). Moreover, incubation of GSK3 β with increasing amounts of PASK dose-dependently enhanced phosphorylation of GSK3 β at Ser 9 (Fig. 2C). These results indicate that PASK can directly phosphorylate GSK3 β at Ser 9 *in vitro*.

Inactivation of PASK blocks glucose-induced Ser 9 GSK3 β phosphorylation in islets. To confirm the effect of PASK on GSK3 β Ser 9 phosphorylation in β cells, we overexpressed plasmids or adenoviruses encoding WT hPASK or a KD hPASK acting as a dominant-negative (25) in HIT-T15 cells exposed to 0.1, 1.5 or 5 mM glucose or in isolated rat islets exposed to 2.8 or 16.7 mM glucose, respectively, for 24 h (Fig. 3A-D). As expected, glucose significantly increased Ser 9 GSK3 β in HIT-T15 cells (Fig. 3A&B) and islets (Fig. 3C&D) overexpressing the control vector. Overexpression of WT hPASK tended to increase Ser 9 GSK3 β at 0.1 mM glucose, such that the effect of higher glucose concentrations was no longer significant (Fig. 3A&B). Overexpression of KD hPASK completely blocked glucose-induced Ser 9 GSK3 β phosphorylation both in HIT-T15 cells (Fig. 3A&B) and islets (Fig. 3C&D). In contrast, overexpression of KD hPASK did not affect ERK1/2 phosphorylation in isolated rat islets (data not shown). Consistent with these results, GSK3 β Ser 9 phosphorylation was significantly reduced in islets isolated from *pask*-null mice (Fig. 3E&F). Taken together, our results identify GSK3 β as a novel PASK substrate in pancreatic β cells and reveal a critical role for PASK in glucose-induced Ser 9 GSK3 β phosphorylation.

Overexpression of WT hPASK increases PDX-1 protein stability via GSK3 β in MIN6 cells and isolated rat islets. GSK3 β regulates PDX-1 protein degradation through phosphorylation at Ser 268 and Ser 272 (8). To investigate whether PASK affects PDX-1 protein stability, MIN6 cells and isolated rat islets were respectively transfected or infected with adenoviruses encoding WT hPASK or KD hPASK, and exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ of cycloheximide for 6 h, after which PDX-1 protein levels were measured by Western blot (Fig. 4A-D). While cells overexpressing EV showed an approximately 50% decrease in PDX-1 protein levels upon cycloheximide treatment, this decrease was completely

prevented in cells overexpressing WT hPASK, but not in cells overexpressing KD hPASK (Fig. 4A&B). Similarly, adenoviral overexpression of WT hPASK, but not that of KD hPASK, prevented the decrease in PDX-1 protein levels in islets treated with cycloheximide (Fig. 4C&D). These results indicate that PASK regulates PDX-1 protein stability. To determine whether GSK3 β is implicated in this effect, we co-expressed both KD PASK and KD GSK3 β in MIN6 cells exposed to cycloheximide as described above. As shown in Fig. 4E&F, co-expression of KD GSK3 β prevented PDX-1 protein degradation in cells overexpressing KD hPASK, indicating that the regulation of PDX-1 stability by PASK requires GSK3 β .

PASK regulates PDX-1 protein abundance. To confirm the effect of PASK on PDX-1 protein abundance, MIN6 cells were infected with adenoviruses encoding for Luciferase, WT hPASK or KD hPASK and exposed to 0.5 or 16 mM glucose for 24 h. At low glucose levels, PDX-1 immunostaining was detected exclusively in the nucleus as it colocalizes with DAPI (Fig. 5A, panels a-d). As expected, glucose induced an increase in PDX-1 protein abundance in control cells (Fig. 5A, panel e vs. a and Fig. 5B, $p < 0.005$). At low glucose, PDX-1 protein level was significantly enhanced in MIN6 cells overexpressing WT PASK (Fig. 5A, panel i vs. a and Fig. 5B, $p < 0.001$). This increase was not further enhanced by 16 mM glucose (Fig. 5A, panel m vs. i and Fig. 5B, NS). In contrast, KD PASK overexpression blocked glucose-induced PDX-1 protein level (Fig. 5A, panel u vs. q and Fig. 5B, $p < 0.005$).

DISCUSSION

In this study, we aimed to identify the mechanisms by which PASK regulates PDX-1 in the pancreatic β cell. We found that PASK directly phosphorylates GSK3 β on Ser⁹, prevents GSK3 β -mediated PDX-1 serine phosphorylation, and increases PDX-1 protein stability and abundance (Fig. 6).

PASK is an evolutionary conserved, nutrient-responsive serine/threonine kinase (17,21,32). In *Saccharomyces cerevisiae*, the PASK orthologs Psk1 and Psk2 regulate the

partitioning of glucose between storage as glycogen or utilization (33). In mammalian cells, PASK is responsive to the nutrient environment (23) and regulates several signaling pathways involved in the maintenance of energy homeostasis (32), including glycogen synthesis in the liver by direct phosphorylation of glycogen synthase at Ser⁶⁴⁰(22). The precise mechanisms by which PASK detects changes in intracellular nutrient concentrations are unknown, but most likely involve the binding of a nutrient-derived small molecule to the N-terminal PAS domain which induces a conformational change and unmasks the kinase domain of the protein (32). In pancreatic β cells, PASK expression and activity are stimulated by glucose and mediate glucose regulation of *insulin* gene expression via PDX-1 (23,24). Overexpression of WT PASK induces *insulin* promoter activity, while a dominant-negative mutant blocks glucose stimulation of the *insulin* promoter (23). We observed that *pask*-null mice are hypoinsulinemic and display impaired glucose-induced insulin secretion from isolated islets (17), although these findings were not confirmed in another study (34). Importantly however, PASK mRNA levels are reduced and are no longer responsive to glucose in islets from type 2 diabetic humans (35). Recently, we have identified two rare mutations in the *pask* gene associated with early-onset diabetes (36). One of these induced an approximately 2-fold increase in PASK activity and its expression in islets increased basal insulin secretion and gene expression, supporting an important role for PASK in human β -cell function.

In response to changing glucose levels, PDX-1 undergoes a number of post-translational modifications that modulate its stability, sub-cellular localization and binding to the *insulin* gene promoter. These include phosphorylation (4,8,9,12-14,16,37-42), SUMOylation (43) and *O*-GlcNAcylation (44,45). SUMOylation of PDX-1 increases its nuclear localization as well as its protein stability and is correlated with an increase in insulin promoter activity (43). PDX-1 contains at least two sites of *O*-GlcNAcylation that increase its DNA binding-activity (44,45). PDX-1 can be phosphorylated on multiple residues, but the functional role of these specific phosphorylation sites remains poorly understood. In fact, although phosphorylation of PDX-1 in response to glucose was initially proposed to regulate its nuclear translocation, more recent studies have shown that the effects on PDX-1 function depend on the phosphorylated residues. Phosphorylation downstream of the mitogen-

activated protein kinase p38 and phosphatidylinositol 3 kinase was shown to stimulate PDX-1 nuclear localization (4,9) whereas phosphorylation on Ser²⁶⁹ by homeodomain interacting protein kinase 2 (HIPK2) has been shown to lead to nuclear exclusion (37). Phosphorylation of Thr¹⁵² by PASK has also been reported (16), although whether this occurs *in vivo* remains to be demonstrated. In this study, we were not able to detect a significant effect of glucose on Thr phosphorylation of immunoprecipitated PDX-1 (data not shown). Phosphorylation also regulates PDX-1 DNA binding activity (39,41) as well as its interaction with transcriptional co-factors (42,46). Finally, phosphorylation has also been shown to regulate PDX-1 stability ((8,14); see below).

Our results confirm a significant decrease in the overall serine phosphorylation of PDX-1 in response to glucose stimulation, in agreement with a previous study (8). The inverse relationship between the increase in PDX-1 protein levels and its degree of serine phosphorylation suggests that phosphorylation at specific serine residues is associated with degradation of the protein (8,14). Indeed, Humphrey et al. (8) have shown that GSK3 β phosphorylation of PDX-1 at C-terminal Ser²⁶⁸ targets the protein for proteasomal degradation, and that glucose alleviates GSK3 β -mediated degradation of PDX-1 via inactivation of GSK3 β by the Ser/Thr protein kinase Akt. Consistent with this, PDX-1 protein expression is reduced in pancreatic β cells overexpressing GSK3 β (8,15) and, conversely, is increased upon loss of GSK3 β (47) or Akt overexpression (8). An et al. (37) have come to opposite conclusions regarding Ser²⁶⁹ (corresponding to Ser²⁶⁸ in humans, as in the Humphrey et al. study (8)). Even though glucose decreased its phosphorylation, neither PDX-1 stability nor its transactivation potential were affected, suggesting that GSK3 β and/or HIPK2 target more than one site which would explain the difference in the observed effects. In the present study we identified an additional mechanism by which glucose stabilizes PDX-1, namely via phosphorylation of GSK3 β by PASK. Although we cannot unequivocally conclude from our data that direct phosphorylation of Ser⁹ GSK3 β mediates PASK stabilization of PDX-1, this possibility is highly likely considering our observations that PASK directly phosphorylates GSK3 β *in vitro* and that overexpression of PASK mimics the effects of glucose on PDX-1 serine phosphorylation.

The increase of GSK3 β Ser⁹ phosphorylation at basal glucose in response to WT PASK overexpression was not statistically significant, suggesting that this event might be necessary but not sufficient for the full effect of glucose on GSK3 β Ser⁹ phosphorylation. A role for PASK in this process is supported by our finding in islets isolated from *pask*-null mice where GSK3 β Ser⁹ phosphorylation is significantly reduced. This does not exclude the possibility that PASK might also phosphorylate GSK3 β at additional other residues. Nevertheless, our data strongly suggest that PASK inactivates GSK3 β since phosphorylation at Ser⁹ is a well-known inactivating regulation (29,30). Boucher et al. (14) showed that GSK3 β can also phosphorylate PDX-1 on Ser⁶¹ and Ser⁶⁶, which leads to its degradation in conditions of oxidative stress. In contrast, Khoo et al. (12) observed that ERK1/2 phosphorylates PDX-1 *in vitro* on Ser⁶¹ and Ser⁶⁶ residues, leading to an increase in *insulin* promoter activity. The apparent discrepancy between these studies may be explained by the fact that Boucher et al. (14) examined endogenous PDX-1 phosphorylation whereas Khoo et al. (12) used an *in vitro* approach. Clearly, further studies are required to better understand the mechanisms and functional impact of Ser⁶¹ and Ser⁶⁶ phosphorylation of PDX-1, and to determine whether PASK and ERK1/2 act through different mechanisms to modulate PDX-1 and *insulin* gene expression.

Previously we have shown that overexpression of WT hPASK increases PDX-1 protein levels at low glucose and that overexpression of KD hPASK blocks the glucose effect (24). By performing a cycloheximide chase experiment, here we found that PDX-1 protein stability was enhanced in MIN6 cells overexpressing WT hPASK but not the KD form in both MIN6 cells and isolated rat islets. Consistent with previous data (24,26), overexpression of WT hPASK did not affect PDX-1 mRNA expression (data not shown), consistent with a mainly post-translational effect. Importantly, overexpression of KD GSK3 β blocked PDX-1 degradation in cells overexpressing KD PASK, thus demonstrating the requirement for GSK3 β in PASK regulation of PDX-1 stability.

Although glucose-induced nuclear translocation of PDX-1 had been reported by subcellular fractionation (4) or with an exogenously expressed protein (5,9,16,37,38), fewer studies

have been able to demonstrate similar subcellular redistribution of endogenous PDX-1 by immunohistochemistry (9,38). In our experiments PDX-1 was predominantly expressed in the nucleus of MIN6 cells even at low glucose levels. Consistent with our previous findings (24), overexpression of WT PASK dramatically increased PDX-1 protein abundance at low glucose levels, while overexpression of KD PASK blocked glucose-induced PDX-1 protein abundance. Although we cannot exclude a potential effect of glucose or PASK on PDX-1 subcellular localization, our results suggest that regulation of protein stability and abundance is predominant in this system.

In conclusion, we have demonstrated a novel role for PASK in modulating PDX-1 protein stability, identifying GSK3 β as a new PASK target in the maintenance of pancreatic β -cell function. These observations suggest that PASK could potentially be targeted therapeutically to enhance PDX-1 expression and activity and thereby improve pancreatic β -cell function in type 2 diabetes.

REFERENCES

1. Poitout, V., Stein, R., and Rhodes, C. J. (2004) Insulin Gene Expression and Biosynthesis. in *International Textbook of Diabetes Mellitus, Third Edition*. (DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Keen, H., and Zimmet, P. eds.), John Wiley & Sons, Chichester. pp 98-123
2. Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994) Insulin-promoter factor 1 is required for pancreatic development in mice. *Nature* 371, 606-609
3. Stoffers, D. A., Zinkin, N. T., Stanojevic, V., Clarke, W. L., and Habener, J. F. (1997) Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature genetics* 15, 106-110
4. Macfarlane, W. M., McKinnon, C. M., Felton-Edkins, Z. A., Cragg, H., James, R. F., and Docherty, K. (1999) Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 274, 1011-1016
5. Rafiq, I., Kennedy, H. J., and Rutter, G. A. (1998) Glucose-dependent translocation of insulin promoter factor-1 (IPF-1) between the nuclear periphery and the nucleoplasm of single MIN6 beta-cells. *J Biol Chem* 273, 23241-23247
6. Melloul, D., Ben-Neriah, Y., and Cerasi, E. (1993) Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 3865-3869
7. Shushan, E. B., Cerasi, E., and Melloul, D. (1999) Regulation of the insulin gene by glucose: stimulation of trans-activation potency of human PDX-1 N-terminal domain. *DNA Cell Biol* 18, 471-479
8. Humphrey, R. K., Yu, S. M., Flores, L. E., and Jhala, U. S. (2010) Glucose regulates steady-state levels of PDX1 via the reciprocal actions of GSK3 and AKT kinases. *J Biol Chem* 285, 3406-3416
9. Elrick, L. J., and Docherty, K. (2001) Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes* 50, 2244-2252

10. Macfarlane, W. M., Read, M. L., Gilligan, M., Bujalska, I., and Docherty, K. (1994) Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner. *Biochem J* 303 (Pt 2), 625-631
11. Macfarlane, W. M., Smith, S. B., James, R. F. L., Clifton, A. D., Doza, Y. N., Cohen, P., and Docherty, K. (1997) The p38/Reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 272, 20936-20944
12. Khoo, S., Griffen, S. C., Xia, Y., Baer, R. J., German, M. S., and Cobb, M. H. (2003) Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 278, 32969-32977
13. Lebrun, P., Montminy, M. R., and Van Obberghen, E. (2005) Regulation of the pancreatic duodenal homeobox-1 protein by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280, 38203-38210
14. Boucher, M. J., Selander, L., Carlsson, L., and Edlund, H. (2006) Phosphorylation marks IPF1/PDX1 protein for degradation by glycogen synthase kinase 3-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 281, 6395-6403
15. Liu, Z., Tanabe, K., Bernal-Mizrachi, E., and Permutt, M. A. (2008) Mice with beta cell overexpression of glycogen synthase kinase-3beta have reduced beta cell mass and proliferation. *Diabetologia* 51, 623-631
16. An, R., da Silva Xavier, G., Hao, H. X., Semplici, F., Rutter, J., and Rutter, G. A. (2006) Regulation by Per-Arnt-Sim (PAS) kinase of pancreatic duodenal homeobox-1 nuclear import in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans* 34, 791-793
17. Hao, H. X., Cardon, C. M., Swiatek, W., Cooksey, R. C., Smith, T. L., Wilde, J., Boudina, S., Abel, E. D., McClain, D. A., and Rutter, J. (2007) PAS kinase is required for normal cellular energy balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15466-15471
18. Moglich, A., Ayers, R. A., and Moffat, K. (2009) Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* 17, 1282-1294
19. Amezcua, C. A., Harper, S. M., Rutter, J., and Gardner, K. H. (2002) Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation. *Structure* 10, 1349-1361

20. Cardon, C. M., and Rutter, J. (2012) PAS kinase: integrating nutrient sensing with nutrient partitioning. *Semin Cell Dev Biol* 23, 626-630
21. Grose, J. H., and Rutter, J. (2010) The role of PAS kinase in PASSing the glucose signal. *Sensors (Basel)* 10, 5668-5682
22. Wilson, W. A., Skurat, A. V., Probst, B., de Paoli-Roach, A., Roach, P. J., and Rutter, J. (2005) Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16596-16601
23. da Silva Xavier, G., Rutter, J., and Rutter, G. A. (2004) Involvement of Per-Arnt-Sim (PAS) kinase in the stimulation of preproinsulin and pancreatic duodenum homeobox 1 gene expression by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8319-8324
24. Fontes, G., Semache, M., Hagman, D. K., Tremblay, C., Shah, R., Rhodes, C. J., Rutter, J., and Poitout, V. (2009) Involvement of Per-Arnt-Sim Kinase and extracellular-regulated kinases-1/2 in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 58, 2048-2058
25. Rutter, J., Michnoff, C. H., Harper, S. M., Gardner, K. H., and McKnight, S. L. (2001) PAS kinase: an evolutionarily conserved PAS domain-regulated serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8991-8996
26. Semplici, F., Vaxillaire, M., Fogarty, S., Semache, M., Bonnefond, A., Fontes, G., Philippe, J., Meur, G., Diraison, F., Sessions, R. B., Rutter, J., Poitout, V., Froguel, P., and Rutter, G. A. (2011) Human mutation within Per-Arnt-Sim (PAS) domain-containing protein kinase (PASK) causes basal insulin hypersecretion. *The Journal of biological chemistry* 286, 44005-44014
27. Amyot, J., Semache, M., Ferdaoussi, M., Fontes, G., and Poitout, V. (2012) Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF-kappaB signalling. *PLoS One* 7, e36200
28. Hagman, D. K., Latour, M. G., Chakrabarti, S. K., Fontes, G., Amyot, J., Tremblay, C., Semache, M., Lausier, J. A., Roskens, V., Mirmira, R. G., Jetton, T. L., and Poitout, V. (2008) Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets. *Diabetes* 57, 424-431

29. Sutherland, C., Leighton, I. A., and Cohen, P. (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* 296 (Pt 1), 15-19
30. Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B. A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789
31. Kikani, C. K., Antonysamy, S. A., Bonanno, J. B., Romero, R., Zhang, F. F., Russell, M., Gheyi, T., Iizuka, M., Emtage, S., Sauder, J. M., Turk, B. E., Burley, S. K., and Rutter, J. (2010) Structural bases of PAS domain-regulated kinase (PASK) activation in the absence of activation loop phosphorylation. *J Biol Chem* 285, 41034-41043
32. Hao, H. X., and Rutter, J. (2008) The role of PAS kinase in regulating energy metabolism. *IUBMB Life* 60, 204-209
33. Rutter, J., Probst, B. L., and McKnight, S. L. (2002) Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. *Cell* 111, 17-28
34. Bortner, E., Niessen, M., Zuellig, R., Spinass, G. A., Spielmann, P., Camenisch, G., and Wenger, R. H. (2007) Glucose-stimulated insulin production in mice deficient for the PAS kinase PASKIN. *Diabetes* 56, 113-117
35. da Silva Xavier, G., Farhan, H., Kim, H., Caxaria, S., Johnson, P., Hughes, S., Bugliani, M., Marselli, L., Marchetti, P., Birzele, F., Sun, G., Scharfmann, R., Rutter, J., Siniakowicz, K., Weir, G., Parker, H., Reimann, F., Gribble, F. M., and Rutter, G. A. (2011) Per-arnt-sim (PAS) domain-containing protein kinase is downregulated in human islets in type 2 diabetes and regulates glucagon secretion. *Diabetologia* 54, 819-827
36. Semplici, F., Vaxillaire, M., Fogarty, S., Semache, M., Bonnefond, A., Fontes, G., Philippe, J., Meur, G., Diraison, F., Sessions, R. B., Rutter, J., Poitout, V., Froguel, P., and Rutter, G. A. (2011) Human mutation within Per-Arnt-Sim (PAS) domain-containing protein kinase (PASK) causes basal insulin hypersecretion. *J Biol Chem* 286, 44005-44014
37. An, R., da Silva Xavier, G., Semplici, F., Vakhshouri, S., Hao, H. X., Rutter, J., Pagano, M. A., Meggio, F., Pinna, L. A., and Rutter, G. A. (2010) Pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) phosphorylation at serine-269 is HIPK2-dependent and affects PDX1 subnuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun* 399, 155-161

38. Rafiq, I., da Silva Xavier, G., Hooper, S., and Rutter, G. A. (2000) Glucose-stimulated preproinsulin gene expression and nuclear trans-location of pancreatic duodenum homeobox-1 require activation of phosphatidylinositol 3-kinase but not p38 MAPK/SAPK2. *J Biol Chem* 275, 15977-15984
39. Petersen, H. V., Peshavaria, M., Pedersen, A. A., Philippe, J., Stein, R., Madsen, O. D., and Serup, P. (1998) Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett* 431, 362-366
40. Meng, R., Al-Quobaili, F., Muller, I., Gotz, C., Thiel, G., and Montenarh, M. (2010) CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity. *Cell Mol Life Sci* 67, 2481-2489
41. Wu, H., MacFarlane, W. M., Tadayyon, M., Arch, J. R., James, R. F., and Docherty, K. (1999) Insulin stimulates pancreatic-duodenal homeobox factor-1 (PDX1) DNA-binding activity and insulin promoter activity in pancreatic beta cells. *Biochem J* 344 Pt 3, 813-818
42. Mosley, A. L., and Ozcan, S. (2004) The pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx-1) interacts with histone deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on low levels of glucose. *J Biol Chem* 279, 54241-54247
43. Kishi, A., Nakamura, T., Nishio, Y., Maegawa, H., and Kashiwagi, A. (2003) Sumoylation of Pdx1 is associated with its nuclear localization and insulin gene activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E830-840
44. Gao, Y., Miyazaki, J., and Hart, G. W. (2003) The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Arch Biochem Biophys* 415, 155-163
45. Kebede, M., Ferdaoussi, M., Mancini, A., Alquier, T., Kulkarni, R. N., Walker, M. D., and Poitout, V. (2012) Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 2376-2381
46. Mosley, A. L., Corbett, J. A., and Ozcan, S. (2004) Glucose Regulation of Insulin Gene Expression Requires the Recruitment of p300 by the Beta-cell Specific Transcription Factor Pdx-1. *Mol Endocrinol* 18 (9): 2279-2290

47. Tanabe, K., Liu, Z., Patel, S., Doble, B. W., Li, L., Cras-Meneur, C., Martinez, S. C., Welling, C. M., White, M. F., Bernal-Mizrachi, E., Woodgett, J. R., and Permutt, M. A. (2008) Genetic deficiency of glycogen synthase kinase-3beta corrects diabetes in mouse models of insulin resistance. *PLoS Biol* 6, e37

FOOTNOTES

Abbreviations used are: PASK, Per-ARNT-Sim domain-containing protein kinase; hPASK, human PASK; GSK3 β , glycogen synthase kinase beta; PDX-1, pancreatic duodenal homeobox-1; ERK; extracellular-regulated kinase; Akt, serine/threonine protein kinase Akt; EV, empty vector; WT; wild-type; KD, kinase-dead; Luc, luciferase; Ser, serine; Thr, threonine; IP, immunoprecipitation; IB, immunoblot.

This work was supported by the National Institutes of Health (R01 DK-58096 to VP and R01 DK-071962 to JR). VP holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic Beta-Cell Function. MS is a recipient of a doctoral studentship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec. BZ is supported by a postdoctoral fellowship from Eli Lilly. SF is supported by a Mentor-Based Postdoctoral Fellowship from the American Diabetes Association. CK is an American Heart Association Postdoctoral Fellow.

Dr. Guy Rutter for MIN6 cells, empty vector (EV), wild-type hPASK (WT) and kinase-dead hPASK (KD) plasmids and adenoviruses; and Dr. R. Paul Robertson for HIT-T15 cells. We also thank Dr. Mourad Ferdaoussi for fruitful discussions.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Glucose and WT hPASK reduce PDX-1 Ser phosphorylation. Control MIN6 cells (A, B) or MIN6 cells infected with adenoviruses encoding

for either luciferase or WT hPASK (WT) (C, D) were exposed to 2 or 11 mM glucose for 24h. Total protein extracts were immunoprecipitated (IP) with anti-PDX-1 antibody and A/G agarose beads. Pellet was subjected to Western blotting (Blot) using antiphosphoserine (p-Ser) antibody. An anti PDX-1 antibody was used to control for loading. Overexpression of hPASK was confirmed by Western blotting of total protein extracts (Lysate) with an anti hPASK antibody. An antibody against the p85 subunit of PI3K was used to control for loading. A, C: Representative immunoblots. B, D: Quantification of 3 - 5 replicate experiments. Results are expressed as mean \pm SEM. $**P \leq 0.05$.

Figure 2: PASK directly phosphorylate GSK3 β on Ser⁹ *in vitro*. A: Purified WT or KD PASK was incubated with recombinant GSK3 β and ³²P-ATP as described in RESULTS. The reaction product was run on a SDS-PAGE gel and stained with GelCode Blue for protein loading control (bottom panel) then subjected to autoradiography (upper panel). B: Quantification of GSK3 β phosphorylation. Bands were excised and ³²P incorporation was measured by liquid scintillation counting. Results are expressed as mean \pm SEM of 3 replicate experiments. $*P \leq 0.05$. The dashed bar represents the control condition, without WT PASK (-WT), corresponding to lane 2 in A. +hPASK.WT, -hPASK.KD and +hPASK.KD correspond to lanes 3, 5 and 6, respectively. C: Purified GSK3 β was incubated with increasing amount of PASK as described in METHODS. The reaction product was subjected to Western blotting using anti FLAG or p-Ser⁹GSK3 antibody. An anti total GSK3 β antibody was used to control for loading.

Figure 3: Inactivation of PASK blocks glucose-induced GSK3 β Ser⁹ phosphorylation in HIT-T15 cells, isolated rat islets and *pask*-null mice.

A and B: HIT-T15 cells were transfected with an empty vector (EV), WT hPASK or KD hPASK expressing plasmids and exposed to 0.1, 1.5 or 5 mM glucose for 24 h. C and D: Rat pancreases were infected by arterial delivery as described in EXPERIMENTAL PROCEDURES with adenoviruses encoding either luciferase (Luc) or KD hPASK. Islets were isolated and cultured at 2.8 or 16.7 mM glucose for 24 h. E and F: Islets were isolated from WT or *pask*-null mice and cultured at 16.7 mM glucose for 2h. A, C and E: Representative immunoblots. Total protein extracts were subjected to Western blotting for hPASK (for arterial delivery efficiency), p-Ser⁹GSK3 β or total GSK3 β to control for loading. Lanes 1 and 2 in E show representative samples from two out of four independent experiments. B, D and F: Quantification of 3-4 replicate experiments. Results are expressed as mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$.

Figure 4: PDX-1 protein stability is increased by overexpression of WT hPASK or KD GSK3 β in MIN6 cells and isolated rat islets.

MIN6 cells were transfected with plasmids encoding either empty vector (EV), WT hPASK, KD hPASK (A and B) or KD GSK3 β (E and F). Isolated rat islets were infected with adenoviruses encoding luciferase, WT PASK or KD PASK (C and D). MIN6 cells and isolated rat islets were exposed to 100 μ g/mL cycloheximide for 6 h. A, C and E: Representative immunoblots. Total protein extracts were subjected to Western blotting with antibodies against PDX-1, or the p85 subunit of PI3K as a loading control. B, D and F: Quantification of 3-6 replicate experiments. Results are expressed as mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$.

Figure 5: PASK enhances PDX-1 protein abundance. A: MIN6 cells were infected with adenoviruses encoding Luciferase, WT hPASK or KD hPASK and exposed to 0.5 or 16 mM glucose for 6h. PDX-1 (a, e, i, m, q and u) and PASK (c, g, k, o, s and w) were visualized by fluorescence microscopy (X40). Nuclei were stained using DAPI (b, f, j, n, r and v). B: Quantification of 3 replicate experiments. Results are expressed as mean \pm SEM. $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$.

Figure 6: A model for PASK regulation of PDX-1 protein stability through inactivation of GSK3 β . In pancreatic β cells, glucose increases PASK expression and activity. PASK phosphorylates and inactivates GSK3 β , alleviating PDX-1 serine phosphorylation and preventing its degradation.

Figure 1

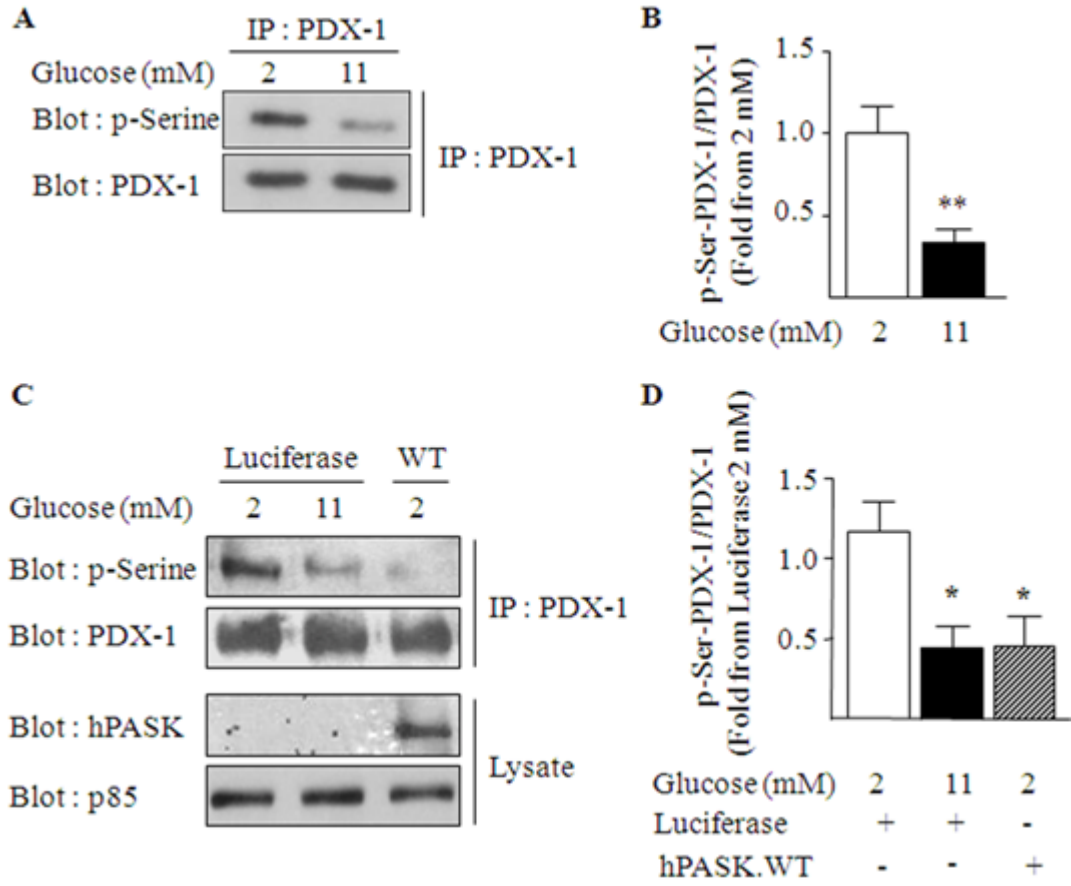


Figure 2

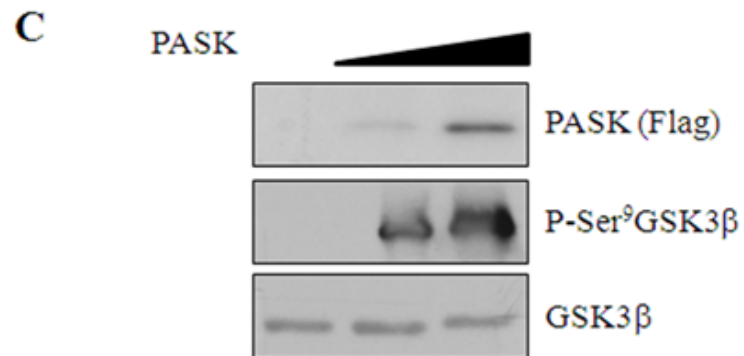
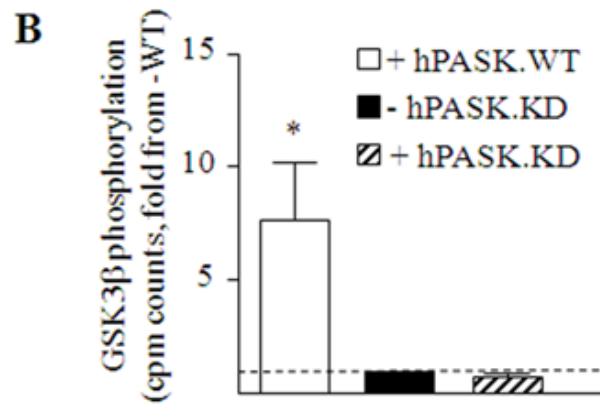
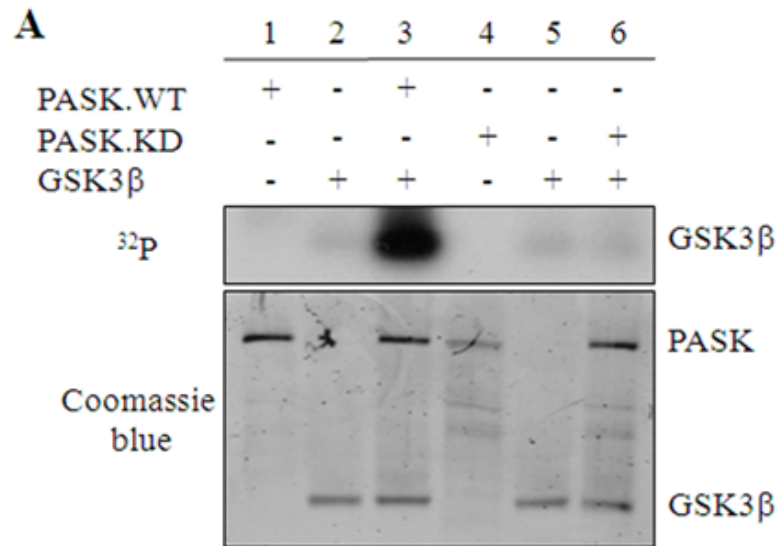


Figure 3

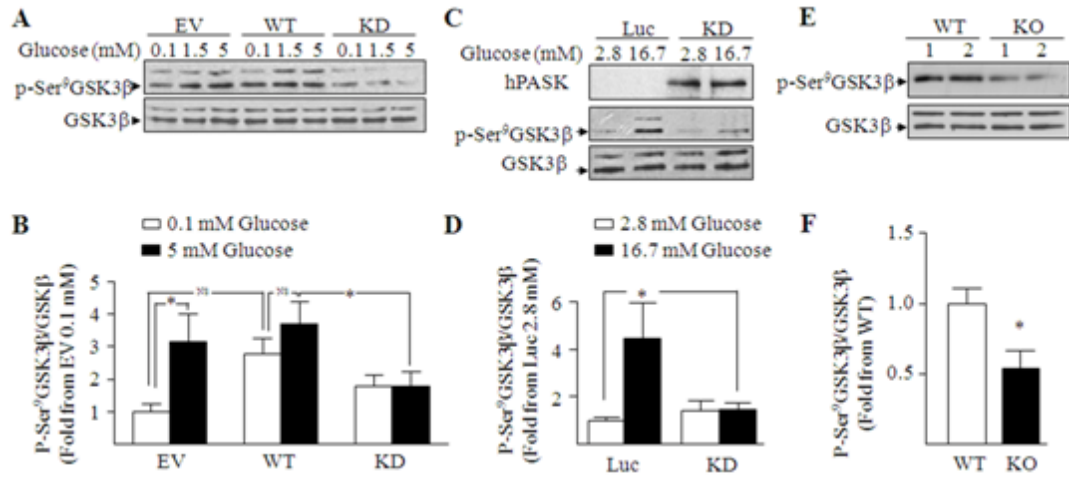


Figure 4

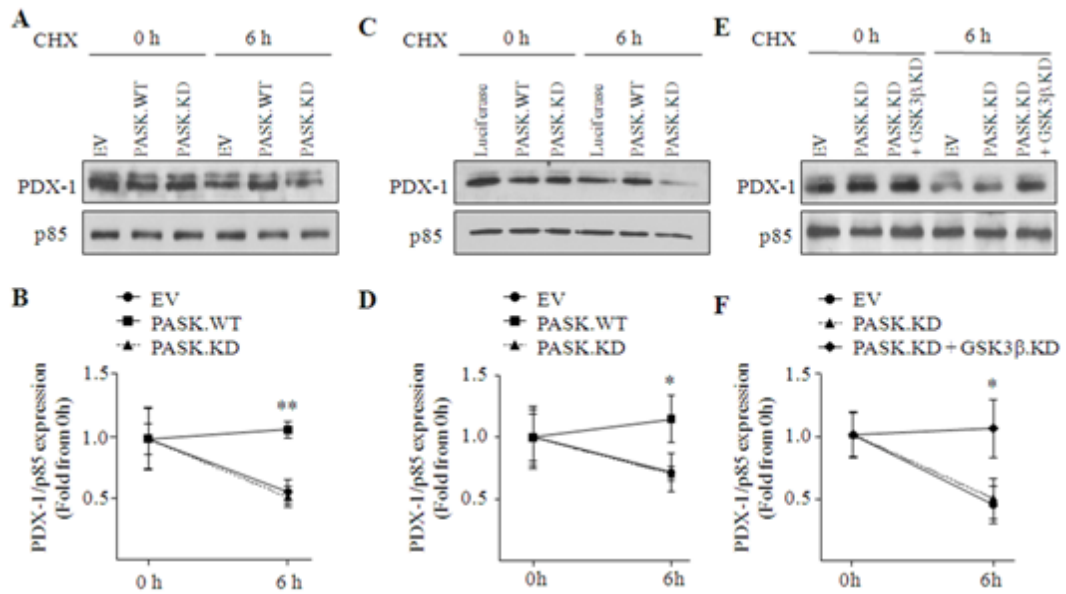


Figure 5

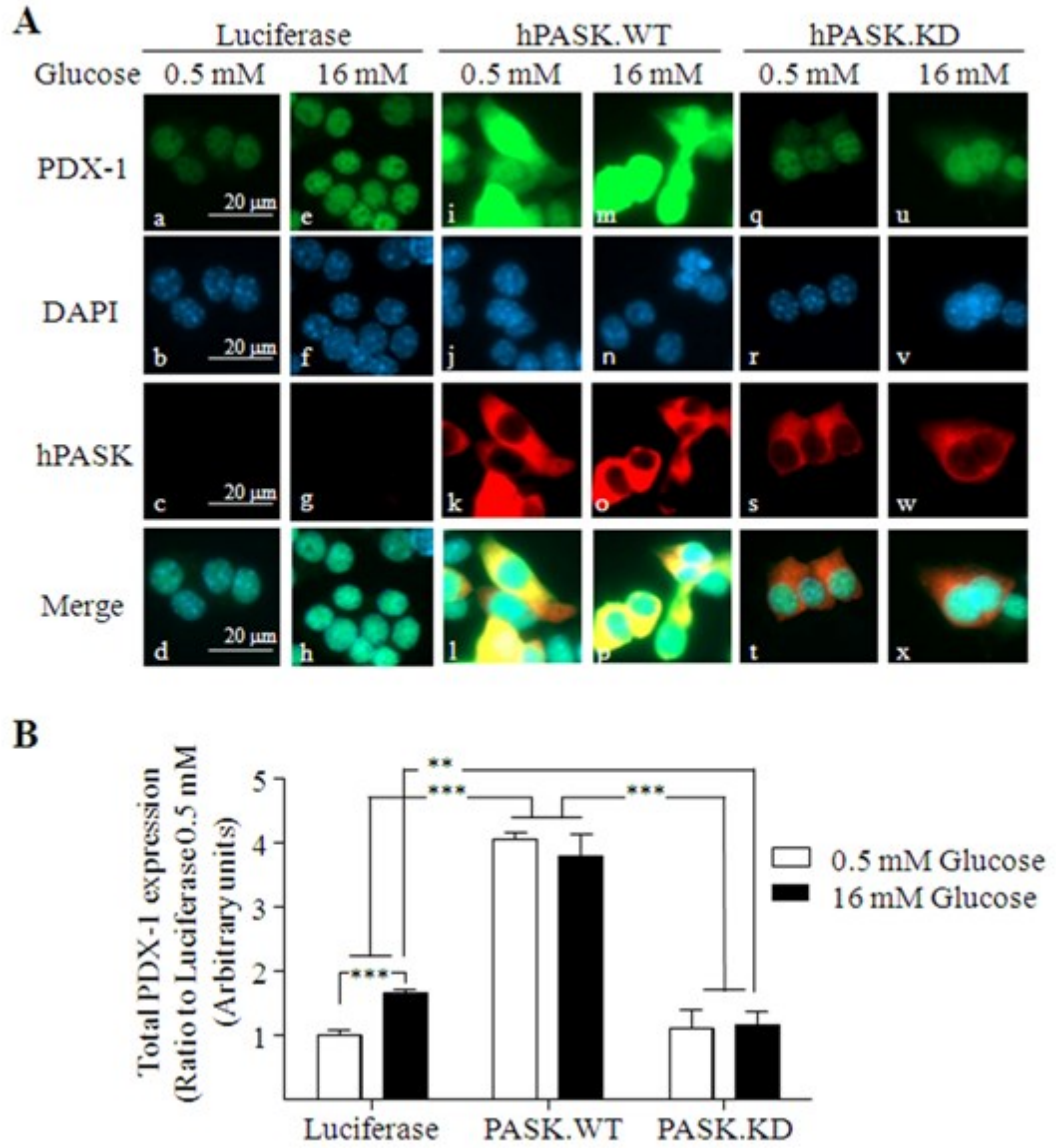
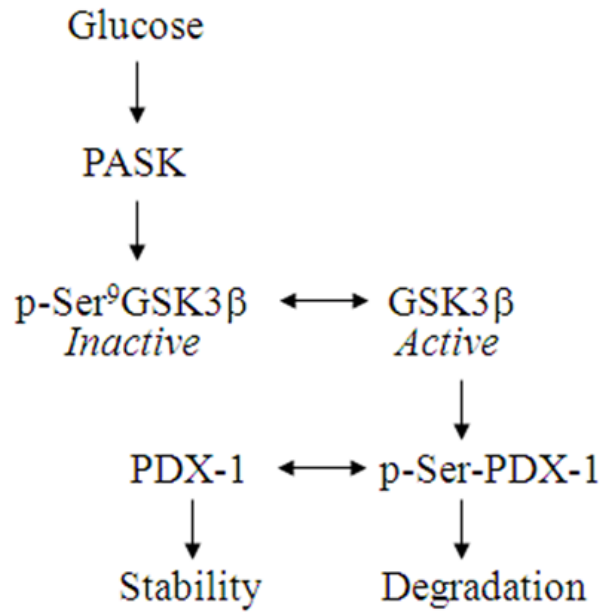


Figure 6



Article 3 Régulation de la localisation sub-cellulaire de PDX-1 par le glucose.

Mise en contexte :

Le facteur de transcription PDX-1 contient dans son motif homéodomaine une séquence de localisation nucléaire, RRMKWKK, nécessaire et suffisante à sa translocation dans le noyau en réponse à une stimulation au glucose (241). La régulation de la translocation nucléaire de PDX-1 est critique, car elle est affectée dans des conditions de stress métabolique. Chez l'humain, le diabète entraîne l'exclusion de PDX-1 du noyau des cellules bêta pancréatiques (282,370). Ceci est également observé dans plusieurs modèles animaux incluant les souris exposées à une diète riche en gras (282,371), les souris *db/db* (282) ainsi que les rats infusés avec du glucose et de l'Intralipide (180). L'exclusion nucléaire de PDX-1 a également été démontrée *in vitro* dans des conditions de glucolipotoxicité (179,274,372) ainsi qu'en réponse au stress oxydatif (268,370). Dans d'autres études, PDX-1 a été détecté à la périphérie nucléaire des cellules bêta pancréatiques. Dans ces cas, la translocation de PDX-1 est intranucléaire et se fait de la périphérie vers le nucléosome en réponse au glucose (218,247,251,262). Enfin, un troisième groupe d'observation suggère qu'au contraire, la localisation nucléaire de PDX-1 est indépendante du glucose (241,249). Ces données sont basées sur différents modèles expérimentaux, incluant la surexpression de formes exogènes de PDX-1. L'objectif de cette troisième partie de la thèse est d'examiner et de comparer la localisation sub-cellulaire de PDX-1 dans les îlots isolés de rats et les lignées de cellules bêta pancréatiques MIN6 et HIT-T15.

Titre: Pancreatic and duodenal homeobox-1 nuclear localization is regulated by glucose in dispersed rat islets but not in insulin-secreting cell lines.

Auteurs : Meriem Semache, Bader Zarrouki, Julien Ghislain et Vincent Poitout.

Soumis à Endocrinology.

Contribution des auteurs :

Meriem Semache : Auteure principale. A élaboré les hypothèses, conçu et réalisé toutes les expériences. A analysé toutes les données et rédigé le manuscrit.

Bader Zarrouki : Coauteur. A contribué à l'élaboration des hypothèses et à la conception des expériences. A participé aux isollements des îlots pancréatiques de rats et aux expériences d'immunohistochimie.

Julien Ghislain : Coauteur. A contribué à l'élaboration des hypothèses ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

Vincent Poitout: Directeur de thèse. A dirigé tout le projet et rédigé le manuscrit.

Pancreatic and duodenal homeobox-1 nuclear localization is regulated by glucose in dispersed rat islets but not in insulin-secreting cell lines.

Abbreviated title: Glucose effect on PDX-1 nuclear localization

Meriem Semache^{1,2}, Bader Zarrouki^{1,3}, Julien Ghislain¹ and Vincent Poitout^{1,2,3}

¹Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, Departments of

²Biochemistry and ³Medicine, University of Montreal, QC, Canada.

Keywords: PDX-1, glucose, pancreatic beta cells, nucleocytoplasmic shuttling.

Abstract

The transcription factor pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1) plays a major role in the development and function of pancreatic β -cells and its mutation results in Type 2 diabetes. In adult β -cells, glucose promotes insulin gene transcription, by regulating PDX-1 expression, stability and activity. Glucose is also thought to modulate PDX-1 nuclear translocation but in vitro studies using β -cell lines and endogenous or ectopically expressed PDX-1 have led to conflicting conclusions. In this study, we show that cytoplasmic to nuclear translocation of endogenous PDX-1 is increased in response to

glucose in dispersed rat islets but not in either of the pancreatic β -cell lines MIN6 or HIT-T15. Interestingly, however, we found that a PDX-1-GFP fusion protein can shuttle from the cytoplasm to the nucleus in response to glucose stimulation in HIT-T15 cells. Taken together with previous ex vivo and in vivo studies, our results suggest that the regulation of endogenous PDX-1 sub-cellular localization by glucose is physiologically important and that care should be taken when interpreting data from β -cell lines.

Introduction

Worldwide prevalence of type 2 diabetes (T2D) has reached epidemic proportions as a result of abundant nutrient supply along with reduced physical activity. T2D is characterized by fasting hyperglycemia which results from an insufficient supply of insulin from pancreatic β -cells to overcome peripheral insulin resistance. Pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1) [1-3] is a homeodomain transcription factor that activates insulin gene transcription as well as other pancreas-specific target genes and plays a critical role in both pancreatic development and adult β -cell function [4-9]. PDX-1 deficiency in mice results in pancreatic agenesis [10,11], whereas β -cell specific disruption or heterozygous mutations result in T2D [9]. In humans, mutations in *pdx-1* are associated with the development of maturity-onset diabetes of the young type 4 (MODY 4), a monogenic form of T2D characterized by impaired β -cell function [12-14]. Other mutations in human *pdx-1* were shown to be associated with the development of adult-onset forms of T2D [15-18].

In pancreatic β -cells, glucose modulates PDX-1 in part through post-translational modifications. These include O-GlcNAcylation [19,20],

SUMOylation [21] and phosphorylation [22-34] that regulate PDX-1 protein stability [27,28,35], its transactivation potential [36], its interaction with co-factors such as the histone acetyl transferase p300 [37], and its binding to the A boxes on the insulin gene promoter [19,20,38] to trigger insulin gene transcription. The PDX-1 homeodomain contains a basic amino acid sequence, RRMKWKK, that also serves as a nuclear localization signal for PDX-1 nuclear import [39]. The interest in the regulation of PDX-1 nucleocytoplasmic shuttling stems from the observation that β -cell dysfunction in T2D patients correlates with the exclusion of PDX-1 from the nucleus [40,41]. Similar results were obtained in rodent models of metabolic stress, such as in db/db mice [40,41], high fat diet in mice [40,42], nutrient infusion in rats and in vitro oxidative and gluco-lipotoxic stress [43-46]. Glucose was found to increase nuclear PDX-1 by promoting its translocation from the cytosol to the nucleus in cultured human islets [25]. In contrast, studies using insulin-secreting lines showed that PDX-1 is localized to the nuclear periphery [30,47,48], or restricted to the nucleus [35,39] independent of the glucose concentration. Since insulin-secreting cells are commonly used as in vitro models for studying the regulation of beta-cell gene expression, in this study we aimed to examine whether PDX-1 nucleocytoplasmic shuttling is differently regulated by glucose in primary rat islets vs. the insulin-secreting MIN6 and HIT-T15 cell lines.

Materials and methods

Generation of PDX-1-GFP expression plasmid

A pcDNA3.1-PDX-1-GFP plasmid was generated as previously described [46,47]. Briefly, after codon stop removal, the PDX-1-cMyc sequence was excised from the pcDNA3.1-PDX-1-cMyc plasmid (generously provided by

Dr. Guy Rutter, Imperial College London, London, United Kingdom) using HindIII and KpnI and re-inserted into the mammalian expression vector pcDNA3.1-GFP (generously provided by Dr. Marc Prentki, Montreal Diabetes Research Centre, CRCHUM, Montreal, QC, Canada).

Rat islet isolation, dispersion and glucose stimulation

All procedures using animals were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. 250-275 g male Wistar rats (Charles River, St.-Constant, QC) were housed on a 12-h light/dark cycle with free access to water and standard laboratory chow. Islets were isolated as previously described [43]. After overnight recovery, islets were dispersed 5 min in Trypsin – 0.05 EDTA (Invitrogen, Burlington, ON) and plated on poly-L-lysine-coated (Sigma, St. Louis, MO) coverslips. Dispersed islets were cultured in RPMI-1640 media (Invitrogen, Burlington, ON) supplemented with 10 % FBS (Invitrogen) and 5.5 mM glucose for 24 hours. Media was then changed to 0.5 % fatty acid-free BSA (Equitech-Bio, Kerrville, TX) and 2.8 mM glucose for 2 hours after which stimulation was then performed by varying glucose concentrations in the presence or absence of palmitate (sigma) or H₂O₂ (Invitrogen) as described in RESULTS.

MIN6 and HIT-t15 cell culture, transfection and glucose stimulation

MIN6 cells (passage 25–30) were maintained in Hyclone DMEM (ThermoFisher Scientific, Ontario, CA) containing 25 mM glucose and supplemented with 10 % FBS (fetal bovine serum) and 0.005 % β-mercaptoethanol. Medium was changed to 5.5 mM glucose overnight then to 2 mM glucose and 0.5 % BSA for an additional 2hours after which cells were

exposed to varying glucose concentrations in the presence or absence of palmitate as described in RESULTS. HIT-T15 cells (passages 74–86; generously provided by Dr. R. Paul Robertson, Pacific Northwest Diabetes Research Institute, Seattle, WA, USA) were maintained in RPMI-1640 (Invitrogen) containing 11.1 mM glucose and supplemented with 10 % FBS (fetal bovine serum, Invitrogen). Medium was changed to 1mM glucose for 24 hours then to 0.1 mM glucose 0.5 % BSA for an additional 2 hours prior to the experiment. Glucose stimulation was then performed by varying glucose concentrations in the presence or absence of palmitate as described in RESULTS. Transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as per manufacturer's instructions.

Immunohistochemistry

PDX-1 immunostaining was performed as previously described [35]. Cells were incubated with anti rabbit anti PDX-1 (Abcam, Toronto, ON) and anti guinea pig anti insulin (Burlington, ON) antibodies followed by Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) and Rhodamine (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) fluophore-conjugated secondary antibodies. Coverslips were then mounted using VectaShield mounting media containing DAPI for nuclei staining (VectorLab, Burlington, ON). Images were acquired and quantified using a fluorescence microscope (×20) and Zen Imaging Software (Carl Zeiss, ON, CA). For exogenous PDX-1 immunostaining, GFP signal was visualized using Leica confocal microscope (×40).

Statistics

Results are expressed as mean ± SEM and significance was tested using Student's paired t test or a two-way ANOVA with Bonferroni post hoc

adjustment for multiple comparisons as appropriate using GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA). A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results and discussion

Glucose promotes the translocation of PDX-1 from the cytoplasm to the nucleus in dispersed rat islets.

To address the effect of glucose on PDX-1 nucleo-cytoplasmic shuttling, we performed immunocytochemistry on dispersed rat islets exposed for 1, 6 and 24 hours to increasing glucose concentrations (0.5 to 16.7 mM). After 1 hour of treatment at 0.5 or 2.8 mM glucose, PDX-1 abundance was similar in the cytoplasmic and nuclear compartments (Fig. 1A and D). This distribution did not change after 6 and 24 hours of low glucose exposure (Fig. 1B, C and D). Although not significant, there was a tendency for an increase in nuclear PDX-1 in the presence of 5 mM glucose in most cells as shown in Figure 1. After 1-h exposure to 16.7 mM glucose, however, PDX-1 was located predominantly in the nucleus (Fig. 1A – C and D $p \leq 0.05$ 16.7 mM vs 0.5 mM at all time points). PDX-1 cellular distribution profile in response to glucose was similar at 6 and 24 hours of stimulation (Fig. 1B and C). These results demonstrate that in dispersed rat islets, PDX-1 undergoes a cytoplasmic to nuclear shift in response to increasing glucose concentrations. Similar results were obtained using human islets ex vivo [25] and in glucose-infused rats in vivo [43].

PDX-1 subcellular localization is not regulated by glucose in MIN6 cells

To determine whether insulin-secreting cells respond similarly to glucose as dispersed rat islets, the murine insulinoma MIN6 cell line was exposed for 1,

6 and 24 hours to increasing glucose concentrations (0.5 to 16.7 mM) and endogenous PDX-1 sub-cellular localization was assessed as described above. PDX-1 immunostaining was already predominantly detected in the nucleus at 0.5 and 2 mM glucose and this pattern was maintained at 5, 11 and 16 mM glucose at all time points examined (Fig. 2A – D). Even after 24 hours of exposure to a low glucose concentration (0.5 mM) which started to trigger cell death (as shown by the presence of pyknotic nuclei (Fig. 2C), PDX-1 was largely nuclear. Our results are consistent with our previous observation [35] and in accordance with another reported study using an exogenous PDX-1-GFP fusion protein [39]. However, other studies using MIN6 cells reported a nuclear periphery/cytosolic localization of endogenous PDX-1 at low glucose levels which shifts to the nucleoplasm in the presence of high glucose [24,25,49]. In some cases the discrepancy with our data can be explained by differences in experimental approaches. For example, Macfarlane et al. measured the expression of specific PDX-1 isoforms by Western blotting [25]. Rafiq et al., found that increasing glucose levels from 3 to 30 mM led to an increase in the nuclear localization of endogenous PDX-1 in MIN6 cells [23]. Although this differs from our results we did not test glucose concentrations above the physiological range.

Glucose regulates exogenous but not endogenous PDX-1 nuclear translocation in HIT-T15 cells

To investigate the nucleocytoplasmic shuttling of PDX-1 in another rodent insulin-secreting cell line, hamster HIT-T15 cells were exposed for 1, 6 and 24 hours to increasing glucose concentrations (0.1 to 11 mM). Similar to our results in MIN6 cells, PDX-1 was predominantly localized in the nucleus of HIT-T15 cells following exposure to low glucose at all time points, and

increasing the glucose concentration had no detectable effect on PDX-1 localization (Fig. 3A – D).

As numerous studies have described the shuttling of ectopically expressed PDX-1 fusion proteins from the cytoplasmic/nuclear periphery to the nucleoplasm in response to increasing glucose concentrations [23,30,47,49], we tested whether this could be detected in HIT-T15 cells under conditions in which we cannot detect nuclear import of endogenous PDX-1. Similar to our previous results [46], and unlike the endogenous protein (Fig. 3A-D), exogenous PDX-1 was predominantly expressed at the nuclear periphery and in the cytoplasm of HIT-T15 at low glucose and translocated to the nucleus at high glucose (Fig. 3E and F). This indicates that the mechanisms of regulation of PDX-1 nuclear translocation are functional in HIT-T15 cells but are not operative with the endogenous protein. We speculate that nuclear import/export or retention signals, such as HDAC1 and HDAC2 [34] and Importin beta 1 [49], may become saturated by endogenous PDX-1 resulting in accumulation of the exogenous PDX-1 in the cytoplasm/nuclear periphery.

PDX-1 is excluded from the nucleus under oxidative stress in dispersed islets and MIN6 cells but not in HIT-T15 cells

Oxidative stress has been shown to trigger PDX-1 nuclear exclusion in HIT cells (Kawamori Diabetes 2003). Similarly, PDX-1 is excluded from the nucleus of β cells in islets exposed in vitro to palmitate [44] and in islets isolated from rats infused with glucose + Intralipid [43] or from mice fed a high fat – high sucrose diet [40] and in ZDF rats [50]. To verify our ability to detect changes in endogenous PDX-1 subcellular localization in MIN6 cells and HIT-T15 cells in which we saw no effect of glucose, we exposed

dispersed rat islets, MIN6 cells and HIT-T15 cells to 50 μM H_2O_2 for 1 hour and examined PDX-1 localization (Fig. 4). Consistent with previous findings [45], H_2O_2 led to PDX-1 nuclear exclusion in dispersed rat islets (Fig. 4A) and MIN6 cells (Fig. 4B). In contrast, H_2O_2 exposure did not affect PDX-1 localization in HIT-T15 cells (Fig. 4C) in contradiction with a previously reported study [45]. This discrepancy may be due to the difference in the passage number of HIT-T15 which may affect their resistance to oxidative stress. While ours did not exceed 86 passages, cells used by Kawamori et al. were much older and had a passage number between 80 to 100. Moreover, the lack of observed effects of glucose and H_2O_2 on PDX-1 subcellular localization in HIT-T15 was not due to our inability to detect nucleocytoplasmic shuttling of endogenous transcription factors in this cell line, since FOXO1 was excluded from the nucleus in response to high glucose (Fig. 4D) as previously reported [51].

Conclusion

In this report we show that PDX-1 nuclear localization is regulated by glucose in dispersed rat islets, consistent previous *ex vivo* [25] and *in vivo* studies [43]. However, using the same experimental conditions we found endogenous PDX-1 localization to be independent of glucose in the insulin-secreting MIN6 and HIT-T15 cells. Interestingly, and unlike the endogenous protein, exogenously expressed PDX-1 underwent nuclear translocation in response to glucose in HIT-T15 cells. These results raise a note of caution regarding the use of transformed cell lines to examine the regulation of PDX-1 nucleocytoplasmic shuttling.

Acknowledgements

This study was supported by the U.S. National Institutes of Health (R01DK58096 to V.P.) and the Canadian Institutes of Health Research (MOP 77686 to V.P.). M.S. is the recipient of a doctoral studentship from the Fonds de Recherche Québec - Santé. B.Z. is supported by a postdoctoral fellowship from Eli Lilly. V.P. holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic Beta cell Function. We thank Dr Guy Rutter for the pcDNA3.1-PDX-1-cMyc plasmid, Dr. Marc Prentki for the pcDNA3.1-GFP plasmid, Dr. Jun-ichi Miyazaki for the MIN6 cells and Dr. R. Paul Robertson for the HIT-T15 cells.

Figure legends

Figure 1: Glucose induces PDX-1 nuclear translocation in dispersed rat islets. PDX-1 (green), insulin (red) and nuclei (DAPI, blue) were visualized by fluorescence microscopy ($\times 20$). Dispersed rat islets were exposed 1 h (A), 6 h (B) and 24 h (C) to increasing glucose concentrations as indicated. D) Quantification of nuclear/cytosolic ratio of 4 replicate experiments. Results are expressed as mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$: 16.7 vs 0.5 mM glucose at all time points.

Figure 2: PDX-1 is predominantly localized in the nucleus in MIN6 pancreatic β -cells independent of glucose concentration. PDX-1 (green), insulin (red) and nuclei (DAPI, blue) were visualized by fluorescence microscopy ($\times 20$). A – C) MIN6 cells were exposed 1 h (A), 6 h (B) and 24 h (C) to increasing glucose concentrations as indicated. Arrows indicate pyknotic nuclei. D) Quantification of nuclear/cytosolic ratio of 3 replicate experiments. Results are expressed as mean \pm SEM.

Figure 3: In HIT-T15 pancreatic β -cells, endogenous PDX-1 is localized to the nucleus independent of glucose concentration, whereas ectopically expressed PDX-1 shuttles from the cytoplasm to the nucleus in a glucose-dependent manner. PDX-1 (green), insulin (red) and nuclei (DAPI, blue) were visualized by fluorescence microscopy ($\times 20$). A) HIT-T15 cells were exposed 1 h (A), 6 h (B) and 24 h (C) to increasing glucose concentrations as indicated. D) Quantification of nuclear/cytosolic ratio of 3 replicate experiments. Results are expressed as mean \pm SEM. E) HIT-T15 cells were transfected with pcDNA3.1-PDX-1-GFP plasmid and exposed for 24 h to 0.1 or 5 mM glucose. PDX-1 (GFP, green) and nuclei (DAPI, blue) were visualized by confocal microscopy. F) Quantification of nuclear/cytosolic ratio of 3 replicate experiments. Results are expressed as mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$.

Figure 4: PDX-1 is excluded from the nucleus in response to glucolipotoxic and/or oxidative stress in dispersed rat islets and MIN6 cells but not in HIT-T15 cells. PDX-1 (green in A - C), FOXO1 (green in D), insulin (red) and nuclei (DAPI, blue) were visualized by fluorescence microscopy ($\times 20$). A) Dispersed rat islets were exposed to 16.7 mM glucose in the presence of 50 μ M H_2O_2 or 0.5 mM palmitate (PA) for 24 h. B) MIN6 cells exposed to 16.7 mM glucose in the presence of 50 μ M H_2O_2 for 1 h. C) HIT-T15 cells exposed to 16.7 mM glucose in the presence of 50 μ M H_2O_2 24 h. D) HIT-T15 cells were exposed to 0.1 or 11 mM glucose for 1h.

Figure 1

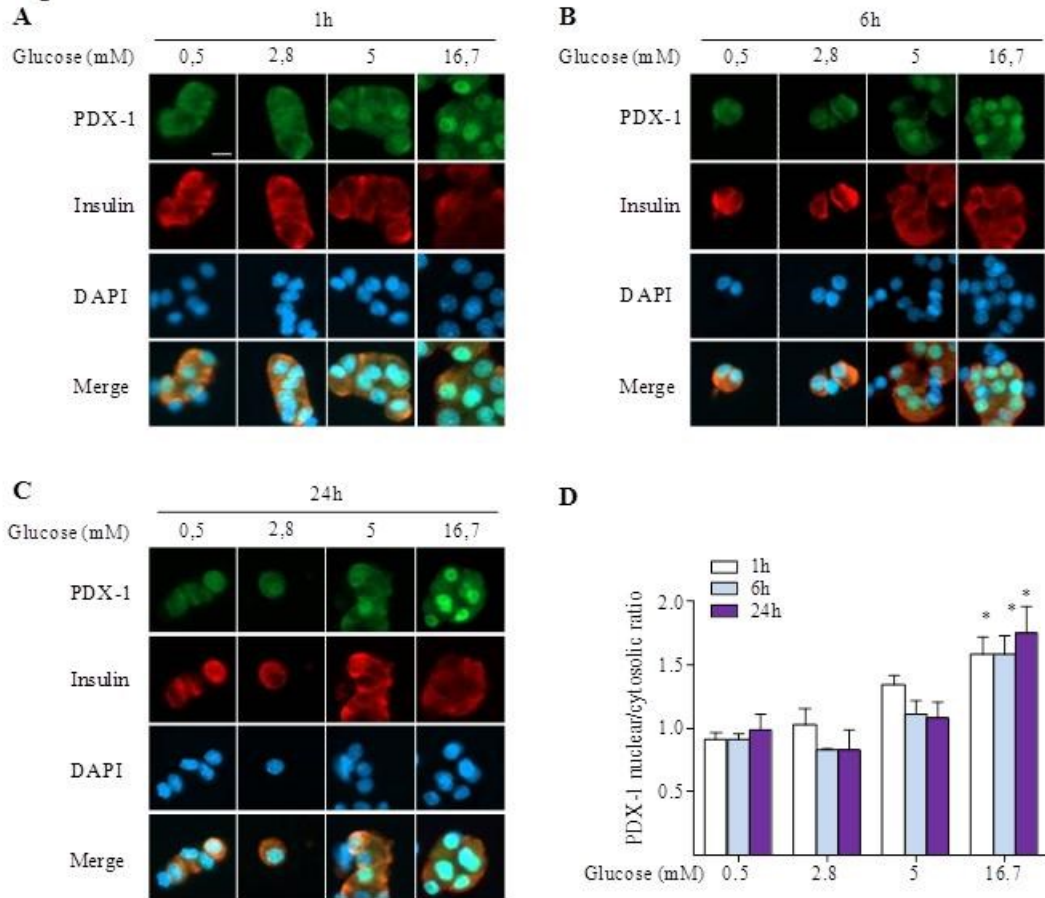


Figure 2

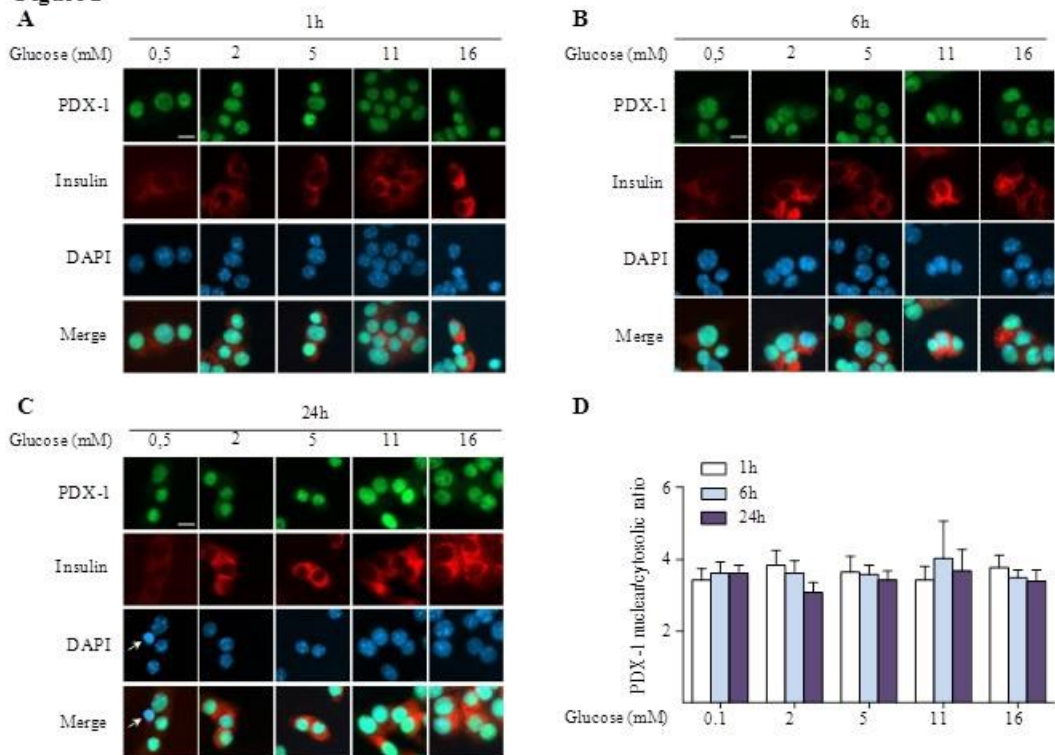


Figure 3

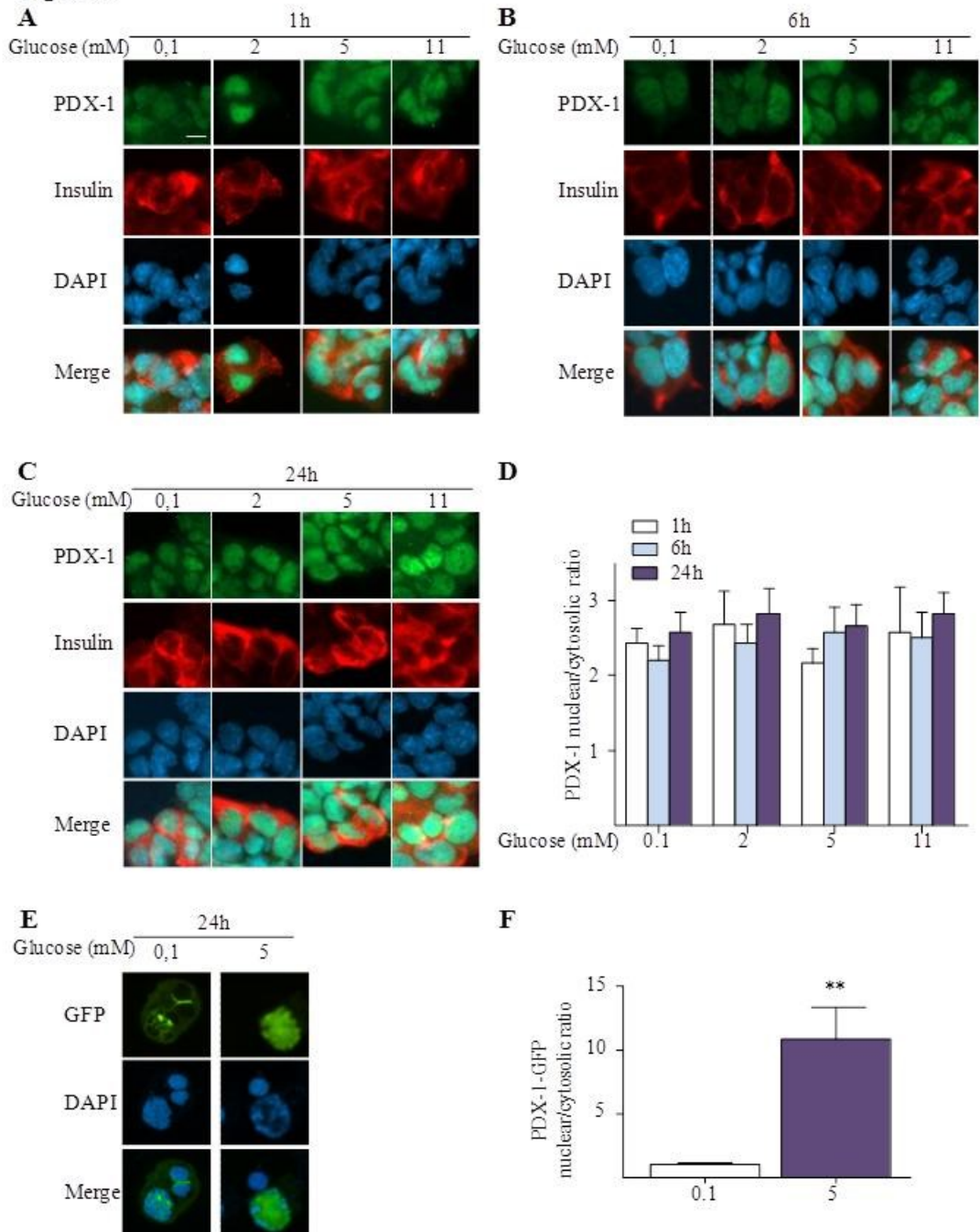
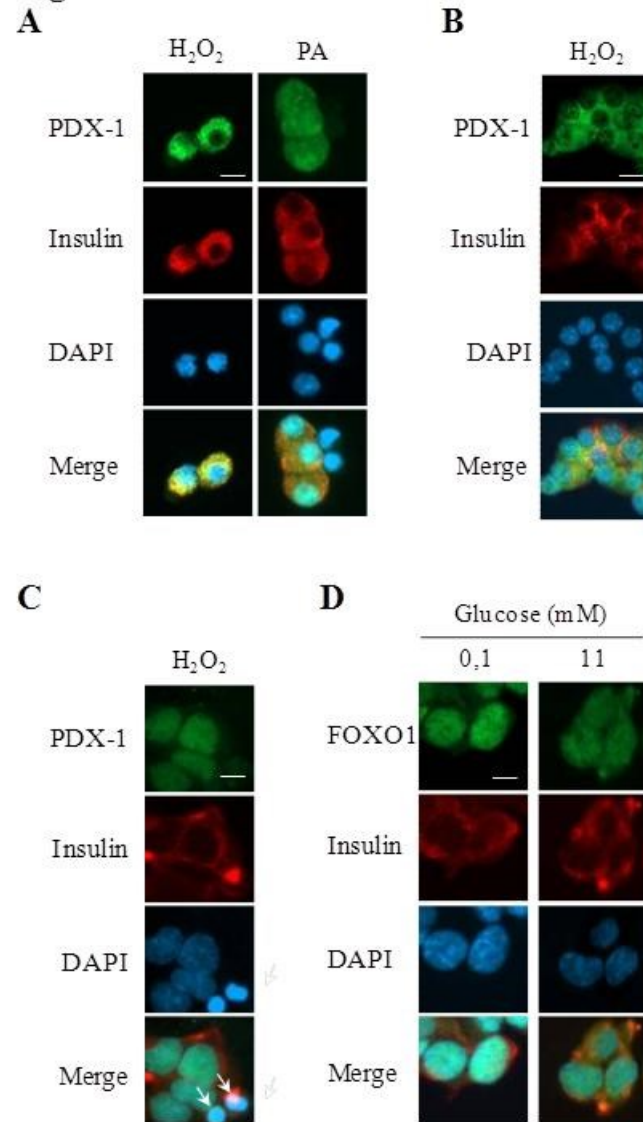


Figure 4



References

- [1] Andrali SS, Sampley ML, Vanderford NL, Ozcan S. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochem J.* 2008;415(1):1-10.
- [2] Melloul D. Transcription factors in islet development and physiology: role of PDX-1 in beta-cell function. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004;1014:28-37.
- [3] Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology.* 2005;146(3):1025-1034.
- [4] Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C. Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Molecular endocrinology.* 1996;10(11):1327-1334.
- [5] Watada H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Hanafusa T, Hamaguchi K, Matsuoka T, Yamamoto K, Matsuzawa Y, Kawamori R, Yamasaki Y. PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in alphaTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes.* 1996;45(12):1826-1831.
- [6] Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S, Montminy MR. Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Molecular endocrinology.* 1993;7(10):1275-1283.
- [7] Serup P, Jensen J, Andersen FG, Jorgensen MC, Blume N, Holst JJ, Madsen OD. Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996;93(17):9015-9020.

- [8] Raum JC, Gerrish K, Artner I, Henderson E, Guo M, Sussel L, Schisler JC, Newgard CB, Stein R. FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 regulate islet beta-cell-specific mafA expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site. *Mol Cell Biol.* 2006;26(15):5735-5743.
- [9] Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes & development.* 1998;12(12):1763-1768.
- [10] Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in *IPF1/PDX1*-deficient mice. *Development.* 1996;122(5):1409-1416.
- [11] Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV. *PDX-1* is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development.* 1996;122(3):983-995.
- [12] Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human *IPF1* gene coding sequence. *Nat Genet.* 1997;15(1):106-110.
- [13] Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to *IPF1*. *Nat Genet.* 1997;17(2):138-139.
- [14] Weng J, Macfarlane WM, Lehto M, Gu HF, Shepherd LM, Ivarsson SA, Wibell L, Smith T, Groop LC. Functional consequences of mutations in the *MODY4* gene (*IPF1*) and coexistence with *MODY3* mutations. *Diabetologia.* 2001;44(2):249-258.

- [15] Cockburn BN, Bermano G, Boodram LL, Teelucksingh S, Tsuchiya T, Mahabir D, Allan AB, Stein R, Docherty K, Bell GI. Insulin promoter factor-1 mutations and diabetes in Trinidad: identification of a novel diabetes-associated mutation (E224K) in an Indo-Trinidadian family. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(2):971-978.
- [16] Hani EH, Stoffers DA, Chevre JC, Durand E, Stanojevic V, Dina C, Habener JF, Froguel P. Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1999;104(9):R41-48.
- [17] Elbein SC, Karim MA. Does the aspartic acid to asparagine substitution at position 76 in the pancreas duodenum homeobox gene (PDX1) cause late-onset type 2 diabetes? *Diabetes care.* 2004;27(8):1968-1973.
- [18] Hansen L, Urioste S, Petersen HV, Jensen JN, Eiberg H, Barbetti F, Serup P, Hansen T, Pedersen O. Missense mutations in the human insulin promoter factor-1 gene and their relation to maturity-onset diabetes of the young and late-onset type 2 diabetes mellitus in caucasians. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2000;85(3):1323-1326.
- [19] Gao Y, Miyazaki J, Hart GW. The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Arch Biochem Biophys.* 2003;415(2):155-163.
- [20] Kebede M, Ferdaoussi M, Mancini A, Alquier T, Kulkarni RN, Walker MD, Poitout V. Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109(7):2376- 2381.

[21] Kishi A, Nakamura T, Nishio Y, Maegawa H, Kashiwagi A. Sumoylation of Pdx1 is associated with its nuclear localization and insulin gene activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(4):E830-840.

[22] An R, da Silva Xavier G, Semplici F, Vakhshouri S, Hao HX, Rutter J, Pagano MA, Meggio F, Pinna LA, Rutter GA. Pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) phosphorylation at serine-269 is HIPK2-dependent and affects PDX1 subnuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010.

[23] Rafiq I, da Silva Xavier G, Hooper S, Rutter GA. Glucose-stimulated preproinsulin gene expression and nuclear trans-location of pancreatic duodenum homeobox-1 require activation of phosphatidylinositol 3-kinase but not p38 MAPK/SAPK2. *J Biol Chem.* 2000;275(21):15977-15984.

[24] Elrick LJ, Docherty K. Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes.* 2001;50(10):2244-2252.

[25] Macfarlane WM, McKinnon CM, Felton-Edkins ZA, Cragg H, James RF, Docherty K. Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 1999;274(2):1011-1016.

[26] Petersen HV, Peshavaria M, Pedersen AA, Philippe J, Stein R, Madsen OD, Serup P. Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett.* 1998;431(3):362-366.

- [27] Boucher MJ, Selander L, Carlsson L, Edlund H. Phosphorylation marks IPF1/PDX1 protein for degradation by glycogen synthase kinase 3-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 2006;281(10):6395-6403.
- [28] Humphrey RK, Yu SM, Flores LE, Jhala US. Glucose regulates steady-state levels of PDX1 via the reciprocal actions of GSK3 and AKT kinases. *J Biol Chem.* 2010;285(5):3406-3416.
- [29] Khoo S, Griffen SC, Xia Y, Baer RJ, German MS, Cobb MH. Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 2003;278(35):32969-32977.
- [30] An R, da Silva Xavier G, Hao HX, Semplici F, Rutter J, Rutter GA. Regulation by Per-Arnt-Sim (PAS) kinase of pancreatic duodenal homeobox-1 nuclear import in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 5):791-793.
- [31] Lebrun P, Montminy MR, Van Obberghen E. Regulation of the pancreatic duodenal homeobox-1 protein by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2005;280(46):38203-38210.
- [32] Meng R, Al-Quobaili F, Muller I, Gotz C, Thiel G, Montenarh M. CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(14):2481-2489.
- [33] Wu H, MacFarlane WM, Tadayyon M, Arch JR, James RF, Docherty K. Insulin stimulates pancreatic-duodenal homeobox factor-1 (PDX1) DNA-binding activity and insulin promoter activity in pancreatic beta cells. *Biochem J.* 1999;344 Pt 3:813-818.
- [34] Mosley AL, Ozcan S. The pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx-1) interacts with histone deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on low levels of glucose. *J Biol Chem.* 2004;279(52):54241-54247.

- [35] Semache M, Zarrouki B, Fontes G, Fogarty S, Kikani C, Chawki MB, Rutter J, Poitout V. Per-Arnt-Sim Kinase Regulates Pancreatic Duodenal Homeobox-1 Protein Stability via Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3 Beta in Pancreatic Beta Cells. *J Biol Chem.* 2013.
- [36] Shushan EB, Cerasi E, Melloul D. Regulation of the insulin gene by glucose: stimulation of trans-activation potency of human PDX-1 N-terminal domain. *DNA Cell Biol.* 1999;18(6):471-479.
- [37] Ohneda K, Mirmira RG, Wang J, Johnson JD, German MS. The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol Cell Biol.* 2000;20(3):900-911.
- [38] Melloul D, Ben-Neriah Y, Cerasi E. Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(9):3865-3869.
- [39] Moede T, Leibiger B, Pour HG, Berggren P, Leibiger IB. Identification of a nuclear localization signal, RRMKWKK, in the homeodomain transcription factor PDX-1. *FEBS Lett.* 1999;461(3):229-234.
- [40] Ardestani A, Sauter NS, Paroni F, Dharmadhikari G, Cho JH, Lupi R, Marchetti P, Oberholzer J, Conte JK, Maedler K. Neutralizing interleukin-1beta (IL-1beta) induces beta-cell survival by maintaining PDX1 protein nuclear localization. *J Biol Chem.* 2011;286(19):17144-17155.
- [41] Guo S, Dai C, Guo M, Taylor B, Harmon JS, Sander M, Robertson RP, Powers AC, Stein R. Inactivation of specific beta cell transcription factors in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2013.

- [42] Reimer MK, Ahren B. Altered beta-cell distribution of pdx-1 and GLUT-2 after a short-term challenge with a high-fat diet in C57BL/6J mice. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 1:S138-143.
- [43] Hagman DK, Latour MG, Chakrabarti SK, Fontes G, Amyot J, Tremblay C, Semache M, Lausier JA, Roskens V, Mirmira RG, Jetton TL, Poitout V. Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets. *Diabetes*. 2008;57(2):424-431.
- [44] Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem*. 2005;280(37):32413-32418.
- [45] Kawamori D, Kajimoto Y, Kaneto H, Umayahara Y, Fujitani Y, Miyatsuka T, Watada H, Leibiger IB, Yamasaki Y, Hori M. Oxidative stress induces nucleo-cytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor PDX-1 through activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Diabetes*. 2003;52(12):2896-2904.
- [46] Amyot J, Semache M, Ferdaoussi M, Fontes G, Poitout V. Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF- κ B signalling. *PLoS One*. 2012;7(4):e36200.
- [47] Rafiq I, Kennedy HJ, Rutter GA. Glucose-dependent translocation of insulin promoter factor-1 (IPF-1) between the nuclear periphery and the nucleoplasm of single MIN6 beta-cells. *J Biol Chem*. 1998;273(36):23241-23247.

- [48] Mosley AL, Corbett JA, Ozcan S. Glucose regulation of insulin gene expression requires the recruitment of p300 by the beta-cell-specific transcription factor Pdx-1. *Mol Endocrinol.* 2004;18(9):2279-2290.
- [49] Guillemain G, Da Silva Xavier G, Rafiq I, Leturque A, Rutter GA. Importin beta1 mediates the glucose-stimulated nuclear import of pancreatic and duodenal homeobox-1 in pancreatic islet beta-cells (MIN6). *Biochem J.* 2004;378(Pt 1):219-227.
- [50] Mahadevan J, Parazzoli S, Oseid E, Hertzell AV, Bernlohr DA, Vallerie SN, Liu CQ, Lopez M, Harmon JS, Robertson RP. Ebselen treatment prevents islet apoptosis, maintains intranuclear Pdx-1 and MafA levels, and preserves beta-cell mass and function in ZDF rats. *Diabetes.* 2013;62(10):3582-3588.
- [51] Meur G, Qian Q, da Silva Xavier G, Pullen TJ, Tsuboi T, McKinnon C, Fletcher L, Tavares JM, Hughes S, Johnson P, Rutter GA. Nucleo-cytosolic shuttling of FoxO1 directly regulates mouse Ins2 but not Ins1 gene expression in pancreatic beta cells (MIN6). *J Biol Chem.* 2011;286(15):13647-13656.

DISCUSSION

L'insuline est sécrétée exclusivement par la cellule bêta pancréatique. Elle est essentielle à la survie et sa production est étroitement régulée pour le maintien de l'homéostasie du glucose. À court terme, la régulation de la sécrétion de l'insuline se fait via les mécanismes d'exocytose (373). Dans ce cas, un premier pool préassemblé de vésicules contenant l'insuline est rapidement relâché en réponse à une prise alimentaire. Toutefois, le maintien constant des réserves intracellulaires d'insuline est dépendant de la transcription du gène de l'insuline ainsi que de sa biosynthèse. Durant les deux premières heures suivant une stimulation au glucose, la traduction de la protéine se fait uniquement à partir d'ARNm préexistants (374-376). Une heure de stimulation suffit pour induire une augmentation de 20 à 30 fois la biosynthèse de la proinsuline, mais les niveaux d'ARNm de la préproinsuline restent à ce moment encore inchangés (375-379). Dans des cas de stimulation chronique au glucose, la biosynthèse de l'insuline est sous contrôle de la transcription et la stabilité de l'ARNm de son gène (380-382).

Le glucose et les acides gras sont les deux nutriments majeurs auxquels est exposée la cellule bêta pancréatique et qui jouent un rôle déterminant dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline, que ça soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques. La transcription du gène de l'insuline est sous haute régulation. Elle est principalement orchestrée par les facteurs de transcription PDX-1, MafA et BETA2. PDX-1 est un élément clé dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline et donc de la fonction de la cellule bêta pancréatique ainsi que dans le maintien de son identité. Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse ont permis d'évaluer l'implication des principales voies de signalisations connues dans la cellule bêta pancréatique, soit ERK1/2 et PKB. Nos résultats démontrent

que la protéine PKB, bien qu'ayant été montrée comme être activée par le glucose en absence comme en présence du palmitate, n'est pas impliquée dans les mécanismes de régulation de la transcription du gène de l'insuline dans les cellules bêta pancréatiques MIN6 ainsi que dans les îlots isolés de rats. ERK1/2 est également activée par le glucose en absence comme en présence du palmitate et des céramides. Nos résultats montrent que cette voie est quant à elle impliquée dans les mécanismes d'inhibition de la transcription du gène de l'insuline par les acides gras. Nos travaux ont également permis d'identifier un rôle important de PASK dans la régulation du gène de l'insuline et d'identifier un nouveau mécanisme par lequel elle régule la stabilité du facteur de transcription PDX-1. Nous avons pour la première fois démontré que la protéine GSK3 β est un substrat de l'enzyme PASK dans la cellule bêta pancréatique. Enfin, nous avons mis en évidence l'importance de l'utilisation des îlots isolés lors de l'étude de la translocation nucléaire de PDX-1, étant donné que ce mode de régulation n'a pas été observé dans les cellules insulino-sécrétrices MIN6 et HIT-T15.

1. Implication des protéines PKB, ERK1/2 et PASK dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline.

Rappel des principaux résultats

L'objectif de cette première partie de l'étude était d'évaluer la contribution des voies de signalisation des protéines PKB, ERK1/2 et PASK dans la régulation de l'expression du gène de l'insuline en réponse au glucose en absence ou en présence du palmitate. Nous avons montré que l'exposition prolongée des cellules bêta pancréatiques MIN6 ainsi que des îlots isolés à partir de pancréas de rats à de hautes concentrations de glucose augmente la phosphorylation de la protéine ERK1/2 et que le palmitate rehausse cet effet. Toutefois, le palmitate bloque l'induction de l'expression de l'ARNm ainsi que de l'expression de la protéine PASK, induites par le glucose. L'inhibition de la voie de signalisation PKB par approche pharmacologique (par l'inhibiteur LY294002) n'avait pas d'effet sur la transcription du gène de l'insuline induite par le glucose, ni sur l'inhibition par le palmitate, ce qui suggère que cette voie n'est pas impliquée dans ces mécanismes. L'inhibition de la voie ERK1/2 (par l'inhibiteur U0126) affecte, quant à elle, partiellement ces mécanismes. Enfin, par approche de gain et de perte de fonction (surexpression de la forme sauvage de PASK humaine et surexpression de la forme mutée, inactive, respectivement), nous avons démontré que PASK mime les effets du glucose sur l'expression du gène de l'insuline et l'expression de PDX-1 et bloque les effets délétères du palmitate. Ces observations ont permis de mettre en évidence le rôle important des protéines ERK1/2 et PASK dans la régulation de l'expression du gène de l'insuline.

La transcription du gène de l'insuline

Le glucose augmente la demi-vie de la forme mature de l'ARNm de l'insuline. Il est donc difficile de détecter les variations précoces dans les niveaux de son expression (175). Pour contourner cette limite nous mesurons l'expression de la forme prémature de l'ARNm de l'insuline qui elle, possède une demi-vie beaucoup plus courte, de l'ordre de quelques minutes (221,383). Nous avons en effet détecté une diminution significative de l'expression du pré-messager de l'insuline (identifié comme ARNm du gène de l'insuline pour le reste de la thèse) en réponse à 24 h d'exposition à de hautes concentrations de glucose en présence du palmitate contrairement à l'ARNm de la forme mature. Dans ces conditions, la transcription des gènes GLUT2, glucokinase ainsi que la forme prémature de IAPP est également réprimée. Ces gènes sont tous sous le contrôle de la transcription par PDX-1, ce qui pourrait être une conséquence de l'exclusion nucléaire de PDX-1 par le palmitate (179,274).

PKB/Akt

Régulation par le glucose

La liaison de l'insuline (ou du facteur de croissance IGF-1) à son récepteur induit la phosphorylation des protéines IRS-1 et IRS-2 sur résidus tyrosine qui active la protéine PI3K. L'augmentation des niveaux de PIP3 par PI3K permet la translocation de la protéine kinase PKB à la membrane cytoplasmique. Elle est alors phosphorylée sur résidu Thr³⁰⁸ par la protéine PDK1. PKB est également phosphorylée par le complexe mTORC2 sur résidu Ser⁴⁷³ ce qui permet l'activation complète de la protéine. Dans la cellule bêta pancréatique, PKB exerce des effets anti-apoptotiques en modulant l'activité

de plusieurs protéines cibles (384). Par exemple, PKB phosphoryle les facteurs de transcription de la famille FoxO (de l'anglais pour *forkead box*), FoxO1, FoxO3a et FoxO4, ce qui empêche leur translocation nucléaire et la transcription de facteurs pro-apoptotiques (359). PKB phosphoryle et inactive également la protéine kinase GSK3 β , ce qui inhibe la voie Wnt responsable d'activer l'apoptose, et stimule le métabolisme énergétique (384). Ainsi, de par son effet bénéfique sur la croissance et la survie des cellules β pancréatiques, le glucose augmente la phosphorylation et donc l'activation de la protéine PKB (385). Plusieurs études ont rapporté ces observations (355-359,385,386). Nous avons détecté une augmentation (bien que statistiquement non significative) de la phosphorylation de PKB en réponse au glucose dans les cellules insulinosécrétrices MIN6, mais ceci n'a pas été observé dans les îlots isolés de pancréas de rats. Bien que la phosphorylation de PKB est généralement observée suivant 20 à 120 minutes de stimulation au glucose, elle semble toutefois être biphasique et dépend donc de la durée d'exposition (360). Il aurait été donc intéressant de tester l'effet du glucose sur la phosphorylation de PKB à différents temps dans lesquels le glucose stimule également l'expression du gène de l'insuline, soit de 6 à 24h.

Régulation par les acides gras

Nos résultats montrent que l'exposition des cellules MIN6 ainsi que des îlots de rats au palmitate, en présence de hautes concentrations de glucose, induit une augmentation de la phosphorylation de PKB sur le même résidu, Ser⁴⁷³. Il a été montré que le palmitate augmente la phosphorylation de PKB dans les cellules β pancréatiques INS-1 de manière dose-dépendante où PKB exerce des effets anti-apoptotiques dans des conditions de lipotoxicité (362).

D'autres études ont montré, qu'au contraire, les acides gras bloquent l'activation de PKB (355,357,360). Il est à noter toutefois que ces études ont été faites dans un contexte d'apoptose contrairement à notre modèle expérimental. De plus, plusieurs données sont en faveur d'une régulation biphasique de PKB. En effet, dans les cellules MIN6, une exposition de quatre heures au palmitate entraîne une augmentation significative de la phosphorylation de PKB sur résidu Ser⁴⁷³ tandis qu'une exposition plus prolongée, 24 h, la diminue (360). L'oléate semble moduler la phosphorylation de PKB de la même manière, ce qui met en évidence, du moins en partie, une régulation indépendante des céramides (360). Néanmoins, nos observations suggèrent que la voie de signalisation PI3K/PKB n'est pas impliquée dans les mécanismes d'inhibition de la transcription du gène de l'insuline par le palmitate.

ERK1/2

Régulation par le glucose

Dans les cellules bêta pancréatiques, l'activation de ERK1/2 est dépendante du calcium. Le glucose augmente le flux de calcium intracellulaire, ce qui active la voie Calmoduline /calcineurine (387), puis la cascade d'activation Ras/Raf/MEK1/2 (339). ERK1 et ERK2 sont phosphorylées sur résidus Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴, respectivement par les protéines ERK1/2 kinases (MEK1/2), elles-mêmes phosphorylées par ERK1/2 kinases kinases (ou Raf) (388). La phosphorylation de ERK1/2 en réponse à une stimulation au glucose a été montrée dans les lignées cellulaires (110,261,338,389), les îlots isolés de pancréas derangeurs (339,343) ainsi que dans les îlots humains (339,390) et nos résultats confirment ces données. Toutefois, tout comme PKB, ERK1/2

semble avoir une régulation biphasique en réponse au glucose. Les travaux de *Lawrence et al.* (217) sont concordants avec l'activation de ERK1/2 par le glucose, mais l'exposition prolongée des cellules bêta pancréatiques au glucose entraîne une diminution de la phosphorylation de ERK1/2, ce qui suggère une modulation différente de la protéine en réponse à des conditions de stress métabolique.

Régulation par le palmitate

Les céramides activent ERK1/2 dans les hépatocytes (391) ainsi que dans les cellules musculaires (392). Le palmitate active ERK1/2 dans les myocytes cardiaques et induit leur apoptose (393). L'exposition prolongée (48 h) des cellules alpha pancréatiques au palmitate augmente également la phosphorylation de ERK1/2, ce qui a pour effet d'augmenter la sécrétion du glucagon (394). La régulation de l'activité des protéines ERK1/2 par les acides gras dans la cellule bêta pancréatique est, quant à elle, très peu connue. *Graciano et al.* (395) ont montré que l'activation aigüe de ERK1/2 dans les îlots isolés de pancréas de rats amplifie la signalisation induite par le récepteur de l'insuline et que le palmitate permet de maintenir leur phosphorylation. En réponse à une exposition plus prolongée, de 48 h, le palmitate inhibe la phosphorylation de ERK1/2 en réponse au glucose dans les cellules MIN6 (386). Nos résultats montrent que le palmitate, tout comme les céramides, rehausse la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules bêta pancréatiques MIN6 ainsi que dans les îlots de rats. La différence entre nos observations et les données rapportées par *Watson et al.* (386) est probablement due à la durée d'exposition au palmitate et son effet sur la toxicité des cellules. En effet, cette dernière étude a été faite dans un contexte de lipotoxicité, dans lequel les

auteurs rapportent une augmentation du marqueur d'apoptose, caspase 3/7, ce qui n'est pas observé dans nos conditions expérimentales. Par ailleurs, ces observations suggèrent une fois de plus que, ERK1/2 pourrait avoir une régulation biphasique et adapter ainsi sa fonction aux conditions de lipotoxicité.

Régulation de la transcription du gène de l'insuline

Nos observations antérieures ont démontré que l'inhibition de la transcription du gène de l'insuline par le palmitate se fait via la synthèse *de novo* des céramides (175). Or, l'inhibition de ERK1/2 par U0126 prévient totalement l'effet inhibiteur des céramides sur l'expression du gène de l'insuline dans les cellules MIN6. Bien que ces résultats doivent être confirmés dans les îlots isolés, ceci suggère que l'inhibition de l'expression du gène par les céramides se fait via la protéine ERK1/2.

En plus de sa phosphorylation, la translocation nucléaire de ERK1/2 est nécessaire à la phosphorylation et l'activation de protéines nucléaires dans la cellule bêta pancréatique (110,396) comme dans d'autres types cellulaires (397,398). Le rôle de la fraction cytoplasmique n'est pas très clair. Des études ont montré que son activation par le glucose est partiellement impliquée dans la phosphorylation de protéines ayant un rôle dans les mécanismes d'exocytose des granules de sécrétion d'insuline, telle la synapsine I (343). Bien que l'activation de ERK1/2 ne semble tout de même pas essentielle à l'induction de la sécrétion de l'insuline par le glucose (339), son inactivation bloque la stimulation de la transcription du gène (110). L'inactivation de ERK1/2 par la surexpression d'un dominant négatif de la protéine entraîne une

réduction significative des niveaux d'expression de la préproinsuline ainsi que de l'activité du promoteur malgré 24 h de stimulation au glucose (110). Dans notre étude, nous avons montré que l'inhibition de ERK1/2 par l'inhibiteur pharmacologique U0126 augmente l'expression de l'ARNm de l'insuline induite par le glucose dans les cellules MIN6, mais d'autre part prévient l'inhibition par le palmitate et les céramides dans ces cellules ainsi que dans les îlots isolés de rats. L'implication de ERK1/2 dans les mécanismes de régulation de la transcription du gène de l'insuline par le glucose concorde avec les résultats obtenus par *Lawrence et al.* (217). En effet, ces auteurs ont montré que l'inhibition de ERK1/2 par U0126 prévient la diminution de l'activité du promoteur du gène de l'insuline causé par des conditions de glucotoxicité. De même, U0126 améliore l'induction de l'activité du promoteur du gène de l'insuline par le glucose dans les îlots isolés de pancréas de rats obèse et diabétiques ZDF (de l'anglais pour *Zucker diabetic fatty*) (217).

D'autre part, ERK1/2 semble avoir un double rôle dans la cellule bêta pancréatique étant donné que son inactivation prévient l'inhibition de la transcription du gène de l'insuline par le palmitate et les céramides dans les cellules MIN6 ainsi que les îlots isolés de rats. Bien qu'elle n'a pas été explorée dans le cadre de cette thèse, cette différence de régulation de ERK1/2 peut être liée à une différence dans la cinétique de son activation (339). En effet, ERK1/2 est activée, via la calcineurine, suite à une élévation des niveaux de calcium intracellulaire, alors que la cinétique en aval de la signalisation du calcium est spécifique aux différents stimuli, tel le chlorure de potassium et les sulfonurées (389,399). L'activation de ERK1/2 peut également enclencher des mécanismes de signalisations distincts, selon l'agent stimulant

ou selon le contexte physio- ou physiopathologique. Par exemple, dans différents types cellulaires, l'insuline active ERK1/2 via au moins deux mécanismes distincts (400-405). Dans les cellules adipocytaires 3T3-L1, l'insuline active ERK1/2 via la voie PI3K, mais également via une voie PI3K-indépendante, qui reste à identifier (403). La régulation différentielle de la transcription du gène de l'insuline par ERK1/2 dans les cellules bêta pancréatique reste toutefois à déterminer.

La transcription du gène de l'insuline est régulée par plusieurs facteurs de transcription qui se lient à leurs séquences respectives sur le promoteur et l'activent de manière synergique. En plus de PDX-1, MafA et BETA2, NFAT (de l'anglais pour *nuclear factor of activated T cells*) est un autre facteur de transcription clé dans l'activation du promoteur du gène de l'insuline. NFAT est régulé par la calcineurine en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire et il est phosphorylé par ERK1/2 (406). L'inhibition de la calcineurine à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques empêche l'activation de NFAT et de ERK1/2 par le glucose et bloque l'induction de la transcription du gène de l'insuline (217). D'autre part, les facteurs de transcription Jun et C/EBP- β , qui sont des répresseurs de la transcription du gène de l'insuline, sont également phosphorylés par ERK1/2 (110,407,408). L'activité de liaison des facteurs de transcription MafA, NFAT au promoteur du gène de l'insuline est d'ailleurs dépendante de ERK1/2 (217). L'activité de liaison du répresseur C/EBP- β est également sous contrôle de ERK1/2, ce qui est consistant avec la double fonction de ERK1/2 dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline (217). En réponse au glucose, ERK1/2 est elle-même recrutée au promoteur du gène de l'insuline où elle forme un complexe avec d'autres facteurs de transcription et co-facteurs (396).

Bien que le glucose augmente significativement la transcription du gène de PDX-1, nous n'avons pas observé une diminution significative de ses niveaux d'ARNm en réponse au palmitate, ni suivant l'inhibition de ERK1/2 par U0126. Ceci indique que la régulation de la transcription du gène de PDX-1 ou de la stabilité de son ARNm par le glucose est indépendante de ERK1/2. Ces données n'excluent toutefois pas une possible implication de ERK1/2 dans la régulation post-traductionnelle de PDX-1, telle sa phosphorylation ou sa translocation nucléaire. D'ailleurs, il a été montré que la phosphorylation de PDX-1 sur résidus Ser⁶² et Ser⁶⁶ par ERK1/2 augmente son potentiel d'activation (110). Nos résultats indiquent également que la régulation par le palmitate est plutôt post-traductionnelle, ce qui est reflété par la diminution de son expression et/ou sa stabilité protéique (176) ainsi que son exclusion nucléaire (179,180). Notons que puisque PDX-1 régule sa propre transcription, la diminution de sa localisation nucléaire par le palmitate régulerait indirectement son expression également (409).

L'induction de l'expression du gène de MafA par le glucose est quant à elle réprimée par le palmitate, ce qui concorde avec nos observations faites sur les îlots isolés de rats (179). Toutefois, les mécanismes de régulation de la transcription du gène de MafA semblent être indépendants de l'activation de ERK1/2, ce qui une fois de plus, n'exclut pas une possible régulation post-traductionnelle de ce facteur de transcription. D'autre part, bien que la phosphorylation de MafA par ERK1/2 ait été rapportée dans quelques types cellulaires incluant les cellules HeLa transfectées pour exprimer MafA (340,410,411), cette régulation n'a toutefois pas été observée dans la cellule bêta pancréatique, ou du moins, n'est pas significative (412). Ceci suggère une

implication indirecte de ERK1/2 dans la régulation de l'activité de liaison de MafA au promoteur du gène de l'insuline (217). La phosphorylation d'un facteur ou cofacteur tel PDX-1 ou p300 par ERK1/2 pourrait permettre le recrutement de MafA au promoteur du gène de l'insuline et avoir un effet synergique sur la transcription (108).

Le facteur de transcription C/EBP β est un répresseur du gène de l'insuline (150,217) ce qui est consistant avec la réduction de son expression en réponse à la stimulation des cellules MIN6 au glucose (176). C/EBP β est activé dans des conditions d'exposition prolongée au palmitate (149) ou au glucose (150,217,413), réprimant la transcription du gène de l'insuline et induisant l'apoptose (217). D'ailleurs, la surexpression de C/EBP β dans les cellules MIN6 mime les effets délétères du palmitate sur l'activité du promoteur du gène de l'insuline et l'apoptose (149). De plus, dans les modèles animaux de diabète de type 2, l'expression de l'ARNm et de la protéine C/EBP β sont significativement augmentées, à l'opposé de PDX-1 (413). Or, dans notre étude, nous n'avons pas observé de changement des niveaux d'ARNm de C/EBP β en réponse au palmitate ni en réponse à l'inhibition de ERK1/2, bien que les niveaux d'expression de la protéine restent à être examinés. Cette divergence peut être due au fait que nos conditions expérimentales n'induisent pas l'apoptose, comme démontré par l'absence du clivage de la caspase 3, d'autant plus que l'induction de C/EBP β ne semble avoir lieu que dans des conditions extrêmes d'hyperglycémie et d'hyperlipidémie. Dans ce sens, *Plaisance et al.* (149) ont montré que la régulation de l'expression de C/EBP β par le palmitate se fait via la voie ERK1/2 tandis que *Hanlon et al.* (407) ont montré que l'isoforme ERK2 phosphoryle directement C/EBP β *in vitro*.

Une stimulation aigüe au glucose induit la liaison du complexe de facteurs de transcription MafA-NFAT au promoteur du gène de l'insuline et son activation de manière ERK1/2-dépendante (217). Dans des conditions d'hyperglycémie chronique, C/EBP β se lie à NFAT par compétition et empêche alors la formation du complexe MafA-NFAT, ce qui réduit la transcription du gène de l'insuline. Enfin, l'inhibition de la voie ERK1/2 affecte la formation des deux complexes MafA-NFAT et C/EBP β -NFAT (217). Ainsi, ces observations sont un argument de plus en faveur de la double fonction de ERK1/2 dans la régulation de l'expression du gène de l'insuline.

PAS kinase

Régulation par le glucose

PAS kinase répond aux variations dans la disponibilité des nutriments pour réguler l'homéostasie énergétique. En absence de stimulation, le domaine PAS de PASK se lie au domaine kinase de la protéine et l'inactive (319). Les mécanismes exacts d'activation de PASK ne sont pas tout à fait connus. Le modèle proposé stipule qu'une petite molécule dérivée du métabolisme du glucose se lie au domaine PAS, ce qui empêche ce dernier d'interagir avec le domaine kinase, libérant ainsi l'accès aux substrats (317,414,415).

Une première étude caractérisant les souris déficientes en PASK a été rapportée et selon laquelle PASK n'est pas impliquée dans la régulation de l'expression ni de la sécrétion de l'insuline (332). Un autre groupe a toutefois caractérisé ce même modèle et a au contraire observé un défaut de sécrétion d'insuline induite par le glucose (309). L'expression du gène de l'insuline dans les cellules MIN6 est également dépendante de PASK (100).

Dans la cellule bêta pancréatique, l'activité ainsi que l'expression de l'ARNm et de la protéine PASK sont rapidement activés par le glucose (100,309,310,330). Dans notre étude, nous avons montré que les niveaux d'expression de l'enzyme sont maintenus durant au moins 24 heures suivant la stimulation dans les cellules MIN6 et les îlots isolés de rats et que cet effet est inhibé par le palmitate. Le glucose n'induit pas la translocation nucléaire de PASK (100), qui reste cytosolique après 24 heures de stimulation au glucose dans les MIN6 ((176), données non publiées;(249)) ainsi que dans les îlots isolés de rats ((249), données non publiées).

Régulation par le palmitate

Hao et al. (309) ont observé que la déficience en PASK confère une protection contre l'obésité et la résistance à l'insuline induites par une diète riche en gras. Toutefois, cet effet semble être la conséquence d'une augmentation du métabolisme mitochondrial du muscle squelettique qui résulte en une augmentation de la production d'ATP et ainsi une protection contre l'accumulation ectopique des lipides issus de la diète riche en gras (309). Dans notre étude, nous avons démontré que l'expression de l'ARNm ainsi que la protéine PASK est inhibée par le palmitate, ce qui concorde avec la diminution observée dans les îlots de patients diabétiques de type 2 (333) ainsi que dans les îlots isolés de rats infusés pendant 72 h avec du glucose et de l'Intralipide (177). Les mécanismes à la base de cette régulation restent toutefois à déterminer. Une première hypothèse est que le palmitate régule l'expression de PASK, via l'inhibition de l'activité de facteurs de transcription. Le palmitate inhibe l'expression de PDX-1, MafA et dans des conditions

toxiques, stimule C/EBP β . Il ne semble pas y avoir de séquence de liaison spécifique à PDX-1 ni celles spécifiques aux autres facteurs de transcription sur le promoteur du gène de PASK. Toutefois, ceci n'exclut pas la possibilité d'une régulation indirecte, par exemple, via l'inhibition de la formation des complexes protéiques sur le promoteur du gène de PASK, comme dans le cas du complexe MafA-NFAT. Le palmitate pourrait également affecter l'activité d'histones acétylases ou autres protéines régulant l'expression du gène. La seconde hypothèse probable est que le palmitate réduit la stabilité de l'ARNm de PASK. Le promoteur du gène de PASK contient dans sa séquence un motif de liaison conservé du facteur de transcription HNF1- α . Le glucose induit la translocation nucléaire de ce facteur alors que le palmitate bloque cet effet, ce qui pourrait être un mécanisme possible d'inhibition de l'expression de PASK. Enfin, l'effet du palmitate sur l'activité de PASK n'a pas été examiné et pourrait également être un mode indirecte de dérégulation de l'expression de PASK. Bref, les mécanismes de régulation de l'expression de PASK ainsi que ceux responsables de son activation n'ont pas encore été identifiés.

Régulation de l'expression du gène de l'insuline

La surexpression de la forme sauvage de PASK (WT-hPASK, pour *wild-type human PASK*) dans les cellules bêta pancréatiques MIN6 mime l'effet du glucose sur l'expression du gène de l'insuline ainsi que sur l'expression de PDX-1 et prévient l'inhibition par le palmitate. Au contraire, l'inactivation de PASK par la surexpression de la forme mutante, un dominant négatif (100), KD-hPASK (pour *kinase-dead human PASK*) bloque l'induction de la transcription du gène de l'insuline et l'induction de l'expression de PDX-1 par le glucose. La mutation des séquences de liaison de PDX-1, et MafA sur le

promoteur du gène de l'insuline affecte l'induction de son activation par le glucose ainsi que par la surexpression de WT-PASK. Il est de même pour la mutation de la séquence de liaison de Beta2, mais l'effet sur la transcription du gène de l'insuline est moindre. Ces données indiquent que PASK régule la transcription du gène de l'insuline au moins via ces facteurs de transcription d'autant plus que PASK kinase stimule l'expression de PDX-1 et que ce dernier régule la transcription de son propre gène (409) ainsi que celui de MafA (209). D'autre part, l'inactivation de PASK induit significativement l'expression de l'ARNm de C/EBP β dans les cellules exposées à de fortes concentrations de glucose en présence du palmitate. Ainsi, PASK pourrait également promouvoir la transcription du gène de l'insuline via l'inhibition de ce facteur de transcription.

Nous avons montré que l'inactivation de PASK par la surexpression de KD-hPASK réduit le contenu en insuline des cellules MIN6, ce qui est probablement une conséquence de la diminution de la transcription de son gène. À l'opposé, une augmentation artificielle de l'activation basale de PASK résulte en un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose. En effet, dans le cadre d'une collaboration avec le groupe du Pr. G. Rutter à Imperial College London, nous avons publié une étude dans laquelle nous avons caractérisé l'effet fonctionnel de deux mutations rares dans le gène *pask* humain (334). Ces deux mutations p.L1051V et p.G1117E sont associées à des formes cliniques de diabète ayant des caractéristiques de type MODY. La protéine ayant la mutation p.G1117E possède une activité enzymatique deux fois plus élevée que la protéine sauvage. L'acide aminé Gly1117 se trouve dans l'hélice α de la région opposant le site actif de PASK. Il pourrait induire un changement de conformation activant le domaine kinase ou réduire

son interaction avec le domaine PAS. Cette augmentation de l'activité basale de PASK résulte en une augmentation du niveau basal de sécrétion d'insuline de 4,5 fois, soit en absence de stimulation au glucose (334). La mutation augmente également le niveau basal de l'expression du gène de l'insuline et de PDX-1. Cette augmentation, avec celle de la sécrétion de l'insuline sont telles que la réponse au glucose n'est plus observée. Une régulation appropriée de l'activité de PASK est donc essentielle pour assurer sa fonction.

2. Régulation de la stabilité de PDX-1 par PASK et GSK3 β

Rappel des principaux résultats

Dans la première partie de cette thèse, nous avons montré que PASK mime les effets du glucose sur l'expression du gène de l'insuline ainsi que sur l'expression de PDX-1. L'objectif de ce second volet de la thèse était d'identifier les mécanismes de régulation de l'expression de PDX-1 par PASK. Étant donné que PASK est une sérine/thréonine kinase, la première hypothèse probable est que PASK phosphoryle PDX-1 sur un ou plusieurs résidus sérine et/ou thréonine et que cette phosphorylation permet d'induire son expression ainsi que son activité de liaison au promoteur du gène de l'insuline. La seconde hypothèse est que PASK phosphoryle et inactive une protéine intermédiaire. Dans la cellule bêta pancréatique, la protéine GSK3 β phosphoryle PDX-1 sur résidu Ser²⁶⁸ ce qui entraîne sa dégradation par le complexe du protéasome (246). Le glucose inactive GSK3 β en induisant sa phosphorylation sur résidu Ser⁹ via la protéine Akt et rétabli l'expression de PDX-1 (246). Ainsi, GSK3 β est une protéine candidate dont l'activité pourrait être modulée par PASK. Dans ce second article, nous avons montré que la phosphorylation globale de PDX-1 sur résidus sérine est diminuée par le glucose ainsi que par PASK. Par des essais *in vitro*, nous avons démontré que PASK phosphoryle GSK3 β sur son résidu inactivant Ser⁹, ce que nous avons confirmé dans les cellules bêta pancréatiques HIT-T15 et dans les îlots isolés de rats. L'effet du glucose sur la phosphorylation de GSK3 β est atténué dans les îlots des souris déficientes en PASK. Enfin, ce mécanisme permet d'augmenter la stabilité du facteur de transcription PDX-1, mais ne semble pas affecter sa localisation nucléaire.

Régulation de la phosphorylation de PDX-1

La phosphorylation de PDX-1 est une modification post-traductionnelle majeure qui joue un rôle clé dans la régulation du facteur de transcription. Une augmentation de la phosphorylation de PDX-1 est associée à sa translocation nucléaire (237,242-244,251), à l'induction de son activité de liaison au promoteur de gène de l'insuline ainsi qu'à sa transactivation (110,133,146,244,247,248,252). Au contraire, la diminution de la phosphorylation de PDX-1 est associée à une augmentation de son expression et de sa stabilité protéique (245,246,248).

Tout comme *Humphrey et al.*(246), nous avons observé une diminution significative de la phosphorylation globale de PDX-1 sur résidus sérine en réponse au glucose. Ces auteurs ont identifié le résidu Ser²⁶⁸ comme cible de phosphorylation par GSK3 β qui entraîne la dégradation de PDX-1 par le complexe du protéasome. Ce même résidu (correspondant à Ser²⁶⁹ chez le rat) a été identifié par *An et al.* (247). Sa phosphorylation est diminuée par le glucose, mais sa régulation par l'enzyme HIPK-2 ne semble pas affecter la stabilité de PDX-1 (247). Ces études suggèrent que GSK3 β et/ou HIPK-2 phosphoryle plus d'un résidu à la fois et mettent en évidence la complexité de ce mode de régulation dans la cellule bêta pancréatique. En plus de GSK3 β , de nombreuses autres protéines kinase ont été identifiées pour avoir un rôle important dans la phosphorylation de PDX-1 incluant ERK1/2 (217), HIPK-2 (247) ainsi que la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) (248). Ces protéines induisent la phosphorylation de PDX-1 sur différents résidus, ce qui peut avoir différents effets sur sa fonction.

Une troisième étude ayant montré une corrélation négative entre la phosphorylation de PDX-1 et son expression est celle effectuée par *Le brun et al.* (248). Toutefois, il s'agit cette fois-ci, de sa phosphorylation sur résidus thréonine. Ces auteurs ont en effet montré que DNA-PK phosphoryle PDX-1 sur le résidu Thr¹¹ et entraîne sa dégradation par le complexe du protéasome. Cependant, le rôle de la phosphorylation de ce résidu en réponse au glucose reste à être examiné. Il y a très peu d'études ayant rapporté une régulation de PDX-1 par sa phosphorylation sur résidus thréonine. Nous n'avons pas observé de variations significatives des niveaux de phosphorylation de PDX-1 sur résidus thréonine en réponse au glucose dans les cellules MIN6 (figure 10). Ceci suggère que la phosphorylation de PDX-1 en thréonine en réponse au glucose n'est pas sous régulation majeure. Cependant, étant donné que l'intensité du signal détecté était généralement très faible, nous ne pouvons pas exclure l'implication possible d'un ou de quelques résidus thréonines spécifiques et dont la phosphorylation ne peut être détectée par un simple immunobuvardage de type Western. Pour la même raison, nous ne pouvons pas exclure la phosphorylation possible de PDX-1 sur résidus thréonine par GSK3 β ou par PASK.

GSK3 β est une cible connue de la protéine kinase Akt (265). Un modèle a été proposé par *Humphrey et al.* (246). Il stipule que le glucose active le récepteur de l'insuline via une régulation autocrine de la sécrétion d'insuline. Ceci permet l'activation de la voie PI3K. Akt phosphoryle alors la protéine GSK3 β sur Ser⁹ et l'inactive. Ceci prévient la phosphorylation de PDX-1 sur résidu Ser²⁶⁸, ce qui a pour conséquence d'augmenter son expression. GSK3 β phosphoryle diverses protéines incluant la cycline D1(416), c-Jun et β -caténine (417). GSK3 β phosphoryle également le facteur de transcription

MafA sur le résidu Ser⁶⁵, ce qui entraîne entre autres sa dégradation par le complexe du protéasome (123). Nos résultats n'excluent pas l'implication de cette voie dans la régulation de la stabilité de PDX-1. Toutefois, étant donné que la signalisation par Akt ne semble pas être impliquée dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline (176), sa contribution dans l'augmentation de l'expression de PDX-1 et de sa stabilité doit être évaluée.

3. Régulation de la translocation nucléaire de PDX-1.

Rappel des principaux résultats

L'objectif de ce dernier volet de la thèse est de caractériser la régulation de la translocation sub-cellulaire de PDX-1 en réponse au glucose dans les différents modèles expérimentaux: les lignées cellulaires sécrétrices d'insuline MIN6, HIT-T15 ainsi que les îlots dispersés de rats. Nos résultats mettent en évidence l'importance de l'utilisation des îlots dispersés pour l'étude de la translocation nucléaire de PDX-1, puisque ce mécanisme n'est observé que dans des îlots isolés primaires.

Les modèles expérimentaux

Les lignées cellulaires permettent d'étudier des mécanismes physiologiques et physiopathologiques dans des conditions homogènes et contrôlées. Contrairement aux modèles animaux et cellules primaires, la quantité de matériel disponible n'est pas limitée et les résultats sont en général plus consistants et reproductibles (418). Toutefois, les principaux inconvénients associés à l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées est la perte de leurs caractéristiques avec le temps et selon leur manipulation. Elles peuvent avoir de nouvelles mutations génétiques, un métabolisme différent et peuvent même se différencier. Les cellules MIN6 sont dérivées d'une souris transgénique exprimant l'antigène T de SV40 (*simian virus-40*) dans les cellules bêta pancréatiques (419). Les caractéristiques fonctionnelles des MIN6, telle la sécrétion de l'insuline ainsi que le métabolisme du glucose, sont similaires à celles des îlots isolés, ce qui justifie leur utilisation dans l'étude de la fonction bêta pancréatique (420). Elles sont d'ailleurs connues

pour leur capacité à former des agrégats cellulaires, ce qui est important pour le maintien d'une réponse adéquate au glucose (421,422). Les cellules HIT-T15 sont, quant à elles, dérivées d'un insulinome de hamster exprimant également l'antigène T de SV40 (423). Ces cellules sont toutefois sensibles à de hautes concentrations de glucose (11.1 mM) et doivent donc être cultivées en faibles concentrations de glucose (0.8 mM) quelques jours avant l'expérimentation. Sinon, l'expression du gène de l'insuline et sa sécrétion de l'hormone peuvent être paradoxalement diminuées par des mécanismes de glucotoxicité (424). Enfin, les îlots isolés de pancréas d'animaux peuvent être laissés en suspension ou dispersés et mis en culture. Les îlots dispersés ont également tendance à former des agrégats (425). Malgré ses limites, ce système reste sans doute le modèle *in vitro* le plus proche du contexte physiologique.

Régulation de la translocation nucléaire de PDX-1

Les facteurs de transcription sont régulés par translocation nucléaire qui leur permet de lier leur séquence respective sur le promoteur de leurs gènes cibles (426). Le mécanisme est habituellement enclenché par la reconnaissance de la séquence de localisation nucléaire (SLN) du facteur de transcription et sa liaison aux récepteurs importines dans le cytoplasme. Le complexe est reconnu par la protéine Ran (de l'anglais pour *ras-related nuclear protein*) qui, une fois dans le noyau, permet un changement de conformation des importines, causant sa dissociation du facteur de transcription et le relâche de ce dernier dans le noyau (426). Une étude ayant rapporté une translocation nucléaire de PDX-1 en réponse au glucose dans les cellules MIN6 a également montré que ce mécanisme était régulé par l'importine 1 β (281).

La séquence SLN de PDX-1a été identifiéeet caractérisée (241), mais la mutation de chacun des résidus qui sont un site possible de phosphorylation n'avait pas d'effet sur la localisation nucléaire de PDX-1 (241). Cependant, ceci n'exclut pas une possible régulation via une combinaison de la phosphorylation de plus d'un résidu à la fois.

Dans des conditions stimulantes de glucose, PDX-1 a été détecté dans le noyau des cellules bêta pancréatiques MIN6 (241,242,244,247,251), HIT-T15 (268,274) ainsi que dans la lignée de cellules humaine NES2Y (242). Ceci a également été montré dans les îlots isolés de pancréas humains (243). Notre laboratoire a reproduit l'effet du glucose sur la localisation sub-cellulaire de PDX-1 dans le noyau des îlots isolés de pancréas de rats (179). La séquence SLN ne semble toutefois pas être affectée dans les mécanismes d'exclusion nucléaire de PDX-1 en réponse au stress oxydatif. Dans ce cas, ce mode de régulation semble plutôt impliquer une séquence d'exclusion nucléaire (SEN) (268).

Des conditions de glucotoxicité ont également été associées à une exclusion de PDX-1 du noyau (282) de même que des conditions de glucolipotoxicité (179). Ceci a également été observé dans les îlots de rats perfusés avec du glucose simultanément avec de l'Intralipide (180) ou nourris avec une diète riche en gras (282). De même, PDX-1 est exclu du noyau des îlots isolés de pancréas de souris diabétiques *db/db* (282) ainsi que dans les îlots de patients diabétiques de type 2 (282). Ainsi, la localisation sub-cellulaire de PDX-1 est déterminante pour le maintien de la fonction bêta pancréatique et elle est sensible au stress métabolique. Dans cette étude, nous avons reproduit ces

observations dans les îlots isolés de pancréas de rats et dispersés, puis exposés au palmitate ainsi qu'au H₂O₂, ce qui non seulement confirme ce mode de régulation, mais valide de plus l'utilisation de ce modèle expérimental. L'absence de translocation de PDX-1 endogène dans les cellules MIN6 et HIT-T15 met en évidence la divergence des mécanismes moléculaires entre ces modèles.

PERSPECTIVES

1. La régulation par le palmitate et les céramides

Nous avons montré que l'induction de l'expression de l'ARNm ainsi que l'expression des protéines PASK et PDX-1 par le glucose est inhibée en présence du palmitate dans les cellules MIN6 et dans les îlots isolés de rats (176). D'autre part, la surexpression de la forme sauvage de PASK prévient l'effet inhibiteur du palmitate sur l'expression du gène de l'insuline et sur l'expression et la stabilité de PDX-1 (176,249). Il est donc probable que la stabilité du facteur de transcription soit également régulée négativement par les acides gras.

GSK3 β est activée par les céramides via la phosphatase PP2A (de l'anglais pour *protein phosphatase 2 A*) pour induire l'apoptose (427). PP2A est activée par les céramides via des mécanismes encore inconnus. Elle ne semble pas agir directement sur GSK3 β , mais pourrait déphosphoryler et inactiver la protéine Akt ou agir en amont, sur la protéine PI3K (427). GSK3 β étant un substrat de la protéine Akt, notre hypothèse est que ces mécanismes permettent son activation, ce qui lui permet alors de phosphoryler PDX-1 sur résidus sérine et entraîner sa dégradation. Nous avons testé la phosphorylation de PDX-1 sur résidu sérine et thréonine dans les extraits de cellules MIN6 exposées 24h à des concentrations stimulantes de glucose en absence ou en présence du palmitate. Comme présenté à la figure 10, le palmitate empêche la diminution de la phosphorylation de PDX-1 sur résidus sérine par le glucose. Ces résultats sont en faveur de notre hypothèse et indiquent que l'inhibition de l'induction de l'expression de PDX-1 par le glucose en présence du palmitate pourrait être due à une diminution de sa stabilité. Par ailleurs, nous n'avons pas détecté de variations significatives des niveaux de phosphorylation de PDX-1 sur résidu thréonine en présence du palmitate.

Il serait intéressant d'examiner la contribution de PASK dans ces mécanismes. Notre hypothèse est que la surexpression de la forme sauvage de PASK dans les cellules ou îlots exposés à de hautes concentrations de glucose en présence du palmitate empêche l'augmentation de la phosphorylation de PDX-1 en sérine. Enfin, bien qu'il serait également intéressant d'évaluer la contribution de ERK1/2 dans ces mécanismes étant donné son activation par le palmitate et les céramides (176), la régulation de GSK3 β semble être indépendante de ERK1/2 (427).

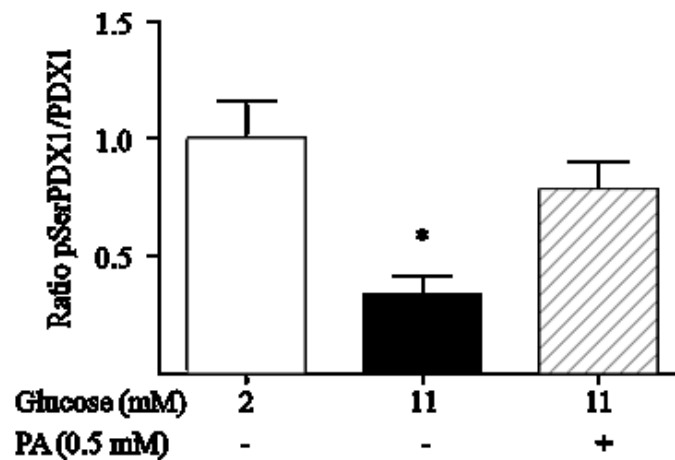


Figure 10 : Le palmitate bloque la réduction de la phosphorylation de PDX-1 sur résidus sérine. Les cellules MIN6 ont été exposées à 2 ou 11 mM glucose en présence ou en absence de palmitate (PA) pendant 24 heures. PDX-1 a été immunoprécipité à partir des lysats protéiques totaux avec un anticorps anti-PDX-1. Un immunobuvardage de type Western a été ensuite effectué à l'aide des anticorps anti-PDX-1 et antiphosphosérine. * $p < 0.05$.

La phosphorylation de PDX-1

Selon nos données, la stabilité protéique de PDX-1 est un mécanisme important dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline et le rôle de PASK semble être central. L'augmentation de la phosphorylation de PDX-1 sur résidus sérine est associée à la dégradation du facteur de transcription par le complexe du protéasome (245,246,249). Nous n'avons pas identifié le ou les résidus sérines spécifiques à cette régulation, mais deux autres études ont identifié les sites Ser⁶¹, Ser⁶⁵ (245) et Ser²⁶⁸ (246). Le résidu Ser²⁷² a également été proposé, mais son rôle n'a pas été démontré (246). Il serait intéressant de caractériser le profil de phosphorylation de PDX-1 dans des concentrations faibles et fortes de glucose en présence ou en absence de palmitate. Les sites d'intérêt pourraient être mutés dans le but de comprendre leur rôle fonctionnel. L'effet de leur mutation serait testé sur : 1) l'expression et la stabilité de PDX-1; 2) sa translocation nucléaire; 3) son activité de liaison au promoteur du gène de l'insuline et 4) la transcription du gène de l'insuline. La même approche pourrait être utilisée pour évaluer l'implication de PASK ainsi que pour déterminer le rôle potentiel des résidus thréonine.

La stabilité de PDX-1 et implication de Pcf1

La protéine Pcf1 se lie au domaine C-terminal de PDX-1 et le dirige vers le complexe du protéasome via les protéines d'échafaudage Cul3. Le complexe est ensuite ubiquitiné et dégradé (275,276). La liaison de Pcf1 à PDX-1 est inhibée par le glucose (279) ce qui porterait à croire qu'elle soit également régulée par la voie PASK-GSK3 β que nous avons identifiée. Plusieurs questions se posent alors. La liaison Pcf1-PDX-1 est-elle également modulée par PASK/GSK3 β ? Serait-elle initiée par la phosphorylation en sérine de

PDX-1? Quels seraient les résidus impliqués dans cette liaison ? Pcif1 serait-il également cible de PASK/GSK3 β ? Comme son nom l'indique, Pcif1 se lie au domaine C-terminal de PDX-1. Le résidu Ser²⁶⁸ identifié par *Humphrey et al.* (246) serait-il alors impliqué ?

2. MafA et C/EBP β

Les mécanismes de régulation des facteurs de transcriptions MafA et C/EBP β restent à élucider. L'expression de l'ARNm de MafA est diminuée dans des conditions de haut glucose en présence du palmitate, mais n'est pas affectée par l'inhibition de ERK1/2 ni par l'inactivation de PASK (176). MafA est toutefois phosphorylé par GSK3 β , ce qui entraîne sa dégradation par le complexe du protéasome (123). Quant à C/EBP β , son expression est augmentée par le palmitate (dans des conditions d'apoptose) (149,372), mais pas par l'oléate (428) et il se lie au promoteur du gène de l'insuline par compétition avec les facteurs de transcription PDX-1 et MafA (150,413). Son expression est stimulée lorsque PASK est inactivée (183). Pour identifier les mécanismes de régulation de MafA et C/EBP β par les acides gras, particulièrement le palmitate et les céramides, il sera nécessaire d'examiner leur expression protéique ainsi que d'autres niveaux de régulation post-traductionnelles, telle la phosphorylation.

3. PAS kinase et GSK3 β : cibles thérapeutiques

Depuis les dernières années, de plus en plus de groupes de recherche et compagnies pharmaceutiques portent un intérêt particulier à la protéine GSK3 β en tant que cible thérapeutique contre le diabète. L'élucidation de sa structure protéique ainsi que de son mode d'interaction avec différents ligands a permis le développement d'une multitude de composés ayant la capacité d'inhiber la protéine. Certains d'entre eux ont même été testés *in vivo* et leur effet anti-diabétique a été confirmé (431-433). Toutefois, GSK3 β est impliquée dans plusieurs fonctions physiologiques (croissance et prolifération, métabolisme énergétique, développement neuronal, etc.) et ces composés ne sont malheureusement pas encore spécifiques. Par exemple, une exposition prolongée à ces drogues pourrait entraîner des effets oncogéniques (434). Les travaux de cette thèse ont permis d'identifier pour la première fois un nouveau mécanisme d'inactivation de GSK3 β , soit par phosphorylation directe de son site Ser⁹ par PASK. Il serait intéressant de tester si ce mécanisme est spécifique à la cellule bêta pancréatique puisque dans le foie, PASK et GSK3 β phosphorylent toutes deux la glycogène synthase et ont donc plutôt un rôle similaire dans la fonction hépatique (22).

De par les caractéristiques de son domaine PAS, PASK semble être activée par une petite molécule dérivée du métabolisme du glucose (ex: hème, ATP, O₂), ce qui fait d'elle une candidate idéale pour le développement de composés pharmaceutiques. De plus, PASK est la seule protéine kinase, du moins connue à ce jour, à avoir un domaine PAS chez l'humain, ce qui la distingue des autres protéines kinases.

CONCLUSION

Dans la première partie de la thèse, nous avons identifié deux mécanismes par lesquels est régulée l'expression du gène de l'insuline. Dans le premier, la synthèse *de novo* des céramides en présence de palmitate inhibe la transcription du gène de l'insuline via l'activation de ERK1/2. Le second mécanisme proposé est que le palmitate inhibe l'expression de PASK induite par le glucose, ce qui a pour conséquence la diminution de l'expression de PDX-1. Enfin, nous avons également mis en évidence l'existence d'un troisième mode de régulation, encore inconnu, par lequel le palmitate inhibe l'expression du facteur de transcription MafA et qui est indépendant des protéines ERK1/2 et PASK (figure 11).

En second lieu, nous avons identifié le mécanisme par lequel PASK régule l'expression du gène de l'insuline via PDX-1. Nous avons identifié GSK3 β comme nouveau substrat de PASK dans la cellule β pancréatique et démontré un nouveau mécanisme, qui semble majeur, dans la régulation de la stabilité de PDX-1 (figure 11).

Enfin, la translocation nucléaire de PDX-1 endogène, et qui semble être indépendante de PASK, est sensible au contexte expérimental, puisque sa régulation est absente dans les lignées cellulaires MIN6 et HIT-T15, mais est préservée dans les îlots dispersés de pancréas de rats.

Le palmitate inhibe l'expression et la localisation nucléaire de PDX-1 ainsi que l'expression de PASK, mais, en contrepartie, active GSK3 β et augmente la phosphorylation de PDX-1. Notre hypothèse est que le palmitate inhibe l'expression et/ou la stabilité protéique de PDX-1 via l'inhibition de l'expression de PASK et l'activation de GSK3 β . L'identification des

mécanismes par lesquels le palmitate exerce ses effets inhibiteurs sur la fonction bêta pancréatiques, complèterait nos études, et pourrait permettre une avancée significative dans la compréhension des mécanismes des effets délétères des acides gras sur la cellule bêta pancréatique, et leur implication dans le développement du diabète de type 2.

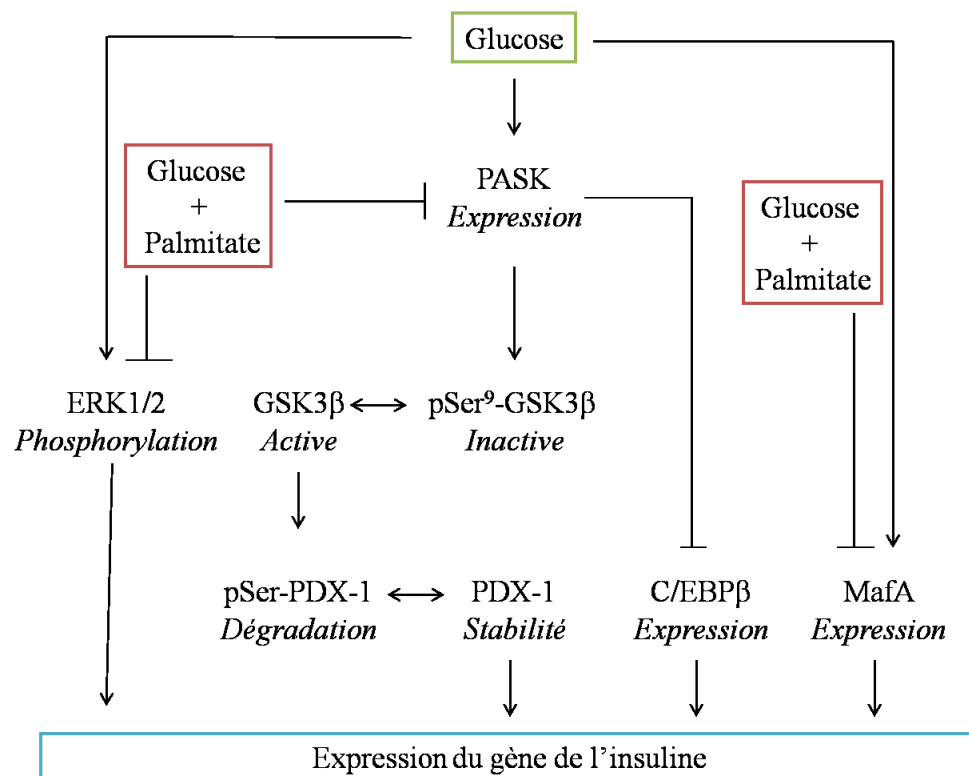


Figure 11: Résumé des principaux résultats de cette thèse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cunha, F. (1949) The Ebers papyrus. *American journal of surgery* **77**, 134-136
2. Bryan, C. P. (1974) Ancient Egyptian Medicine: The Papyrus Ebers.
3. Frank, L. L. (1957) Diabetes mellitus in the texts of old Hindu medicine (Charaka, Susruta, Vagbhata). *Am J Gastroenterol* **27**, 76-95
4. Henschen, F. (1969) On the term diabetes in the works of Aretaeus and Galen. *Medical history* **13**, 190-192
5. J, R. (1798) *Causes of the Diabetes Mellitus*, C. Dilly, London
6. Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R., and Fletcher, A. A. (1962) Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus: Preliminary Report. *Canadian Medical Association journal* **87**, 1062-1067
7. Roth, J., Qureshi, S., Whitford, I., Vranic, M., Kahn, C. R., Fantus, I. G., and Dirks, J. H. Insulin's discovery: new insights on its ninetieth birthday. *Diabetes Metab Res Rev* **28**, 293-304
8. OMS, O. M. d. I. S. Diabetes fact sheet No 312. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/index.html>. Octobre 2013.
9. Diabète Québec. Portrait du diabète au Québec. http://www.diabete.qc.ca/html/vivre_avec_diabete/portrait.html. Octobre 2013.
10. Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert Committee of the Canadian Diabetes Advisory Board, C. (2013) Canadian Diabetes Association 2013 Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada. *Can J Diabetes*
11. Devendra, D., Liu, E., and Eisenbarth, G. S. (2004) Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ* **328**, 750-754
12. Daneman, D. (2006) Type 1 diabetes. *Lancet* **367**, 847-858
13. Noble, J. A., and Valdes, A. M. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* **11**, 533-542
14. Fairweather, D., and Rose, N. R. (2002) Type 1 diabetes: virus infection or autoimmune disease? *Nat Immunol* **3**, 338-340
15. Filippi, C. M., and von Herrath, M. G. (2008) Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes* **57**, 2863-2871
16. Eriksson, J. G., Osmond, C., Kajantie, E., Forsen, T. J., and Barker, D. J. (2006) Patterns of growth among children who later develop type 2 diabetes or its risk factors. *Diabetologia* **49**, 2853-2858
17. Prentki, M., and Nolan, C. J. (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* **116**, 1802-1812
18. Kahn, S. E. (2003) The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* **46**, 3-19

19. Martin, B. C., Warram, J. H., Krolewski, A. S., Bergman, R. N., Soeldner, J. S., and Kahn, C. R. (1992) Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* **340**, 925-929
20. Porte, D., Jr. (2001) Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Diabetes Metab Res Rev* **17**, 181-188
21. Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W., and Roduit, R. (2002) Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* **51 Suppl 3**, S405-413
22. Leahy, J. L. (2005) Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* **36**, 197-209
23. Poitout, V., and Robertson, R. P. (2002) Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* **143**, 339-342
24. (1995) U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* **44**, 1249-1258
25. Godsland, I. F., Jeffs, J. A., and Johnston, D. G. (2004) Loss of beta cell function as fasting glucose increases in the non-diabetic range. *Diabetologia* **47**, 1157-1166
26. Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., and Butler, P. C. (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 102-110
27. Melloul, D., Marshak, S., and Cerasi, E. (2002) Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* **45**, 309-326
28. Minn, A. H., Lan, H., Rabaglia, M. E., Harlan, D. M., Peculis, B. A., Attie, A. D., and Shalev, A. (2005) Increased insulin translation from an insulin splice-variant overexpressed in diabetes, obesity, and insulin resistance. *Mol Endocrinol* **19**, 794-803
29. Zarrouki, B., Benterki, I., Fontes, G., Peyot, M. L., Seda, O., Prentki, M., and Poitout, V. (2013) Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Promotes Pancreatic beta-Cell Proliferation in Response to Nutrient Excess in Rats through mTOR and FOXM1. *Diabetes*
30. Hussain, M. A., and Habener, J. F. (2000) Glucagon-like peptide 1 increases glucose-dependent activity of the homeoprotein IDX-1 transactivating domain in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 616-619
31. Buteau, J., Roduit, R., Susini, S., and Prentki, M. (1999) Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1

- (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia* **42**, 856-864
32. Wang, X., Cahill, C. M., Pineyro, M. A., Zhou, J., Doyle, M. E., and Egan, J. M. (1999) Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology* **140**, 4904-4907
 33. Wang, H., Iezzi, M., Theander, S., Antinozzi, P. A., Gauthier, B. R., Halban, P. A., and Wollheim, C. B. (2005) Suppression of Pdx-1 perturbs proinsulin processing, insulin secretion and GLP-1 signalling in INS-1 cells. *Diabetologia* **48**, 720-731
 34. Pierce, M., Keen, H., and Bradley, C. (1995) Risk of diabetes in offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med* **12**, 6-13
 35. Tattersal, R. B., and Fajans, S. S. (1975) Prevalence of diabetes and glucose intolerance in 199 offspring of thirty-seven conjugal diabetic parents. *Diabetes* **24**, 452-462
 36. Poulsen, P., Kyvik, K. O., Vaag, A., and Beck-Nielsen, H. (1999) Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia* **42**, 139-145
 37. Barnett, A. H., Eff, C., Leslie, R. D., and Pyke, D. A. (1981) Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* **20**, 87-93
 38. Diamond, J. (2003) The double puzzle of diabetes. *Nature* **423**, 599-602
 39. Barroso, I., Luan, J., Middelberg, R. P., Harding, A. H., Franks, P. W., Jakes, R. W., Clayton, D., Schafer, A. J., O'Rahilly, S., and Wareham, N. J. (2003) Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *PLoS Biol* **1**, E20
 40. Grant, S. F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadottir, A., Styrkarsdottir, U., Magnusson, K. P., Walters, G. B., Palsdottir, E., Jonsdottir, T., Gudmundsdottir, T., Gylfason, A., Saemundsdottir, J., Wilensky, R. L., Reilly, M. P., Rader, D. J., Bagger, Y., Christiansen, C., Gudnason, V., Sigurdsson, G., Thorsteinsdottir, U., Gulcher, J. R., Kong, A., and Stefansson, K. (2006) Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* **38**, 320-323
 41. Jin, T., and Liu, L. (2008) The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. *Mol Endocrinol* **22**, 2383-2392
 42. Shu, L., Sauter, N. S., Schulthess, F. T., Matveyenko, A. V., Oberholzer, J., and Maedler, K. (2008) Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets. *Diabetes* **57**, 645-653
 43. da Silva Xavier, G., Loder, M. K., McDonald, A., Tarasov, A. I., Carzaniga, R., Kronenberger, K., Barg, S., and Rutter, G. A. (2009) TCF7L2 regulates late events in insulin secretion from pancreatic islet beta-cells. *Diabetes* **58**, 894-905

44. Altshuler, D., Hirschhorn, J. N., Klannemark, M., Lindgren, C. M., Vohl, M. C., Nemesh, J., Lane, C. R., Schaffner, S. F., Bolk, S., Brewer, C., Tuomi, T., Gaudet, D., Hudson, T. J., Daly, M., Groop, L., and Lander, E. S. (2000) The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* **26**, 76-80
45. Baier, L. J., Permana, P. A., Yang, X., Pratley, R. E., Hanson, R. L., Shen, G. Q., Mott, D., Knowler, W. C., Cox, N. J., Horikawa, Y., Oda, N., Bell, G. I., and Bogardus, C. (2000) A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest* **106**, R69-73
46. Saxena, R., Voight, B. F., Lyssenko, V., Burt, N. P., de Bakker, P. I., Chen, H., Roix, J. J., Kathiresan, S., Hirschhorn, J. N., Daly, M. J., Hughes, T. E., Groop, L., Altshuler, D., Almgren, P., Florez, J. C., Meyer, J., Ardlie, K., Bengtsson Bostrom, K., Isomaa, B., Lettre, G., Lindblad, U., Lyon, H. N., Melander, O., Newton-Cheh, C., Nilsson, P., Orho-Melander, M., Rastam, L., Speliotes, E. K., Taskinen, M. R., Tuomi, T., Guiducci, C., Berglund, A., Carlson, J., Gianniny, L., Hackett, R., Hall, L., Holmkvist, J., Laurila, E., Sjogren, M., Sterner, M., Surti, A., Svensson, M., Tewhey, R., Blumenstiel, B., Parkin, M., Defelice, M., Barry, R., Brodeur, W., Camarata, J., Chia, N., Fava, M., Gibbons, J., Handsaker, B., Healy, C., Nguyen, K., Gates, C., Sougnez, C., Gage, D., Nizzari, M., Gabriel, S. B., Chirn, G. W., Ma, Q., Parikh, H., Richardson, D., Riche, D., and Purcell, S. (2007) Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* **316**, 1331-1336
47. Lyssenko, V., Jonsson, A., Almgren, P., Pulizzi, N., Isomaa, B., Tuomi, T., Berglund, G., Altshuler, D., Nilsson, P., and Groop, L. (2008) Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med* **359**, 2220-2232
48. Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C. G., and Willett, W. C. (2001) Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* **345**, 790-797
49. O'Dea, K. (1984) Marked improvement in carbohydrate and lipid metabolism in diabetic Australian aborigines after temporary reversion to traditional lifestyle. *Diabetes* **33**, 596-603
50. Jin, W., and Patti, M. E. (2009) Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* **116**, 99-111
51. Pinney, S. E., and Simmons, R. A. Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* **21**, 223-229
52. Slomko, H., Heo, H. J., and Einstein, F. H. Minireview: Epigenetics of obesity and diabetes in humans. *Endocrinology* **153**, 1025-1030

53. Canadian Diabetes Association, C. Gestational diabetes. <http://www.diabetes.ca/diabetes-and-you/what/gestational/>. Consulté le 14 octobre 2013.
54. Bellamy, L., Casas, J. P., Hingorani, A. D., and Williams, D. (2009) Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **373**, 1773-1779
55. Feig, D. S., Zinman, B., Wang, X., and Hux, J. E. (2008) Risk of development of diabetes mellitus after diagnosis of gestational diabetes. *CMAJ* **179**, 229-234
56. Dabelea, D., Hanson, R. L., Lindsay, R. S., Pettitt, D. J., Imperatore, G., Gabir, M. M., Roumain, J., Bennett, P. H., and Knowler, W. C. (2000) Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes* **49**, 2208-2211
57. Dabelea, D., Knowler, W. C., and Pettitt, D. J. (2000) Effect of diabetes in pregnancy on offspring: follow-up research in the Pima Indians. *J Matern Fetal Med* **9**, 83-88
58. Malcolm, J. C., Lawson, M. L., Gaboury, I., Lough, G., and Keely, E. (2006) Glucose tolerance of offspring of mother with gestational diabetes mellitus in a low-risk population. *Diabet Med* **23**, 565-570
59. Boney, C. M., Verma, A., Tucker, R., and Vohr, B. R. (2005) Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* **115**, e290-296
60. OMS, O. M. d. l. S. Diabète gestationnel. http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/fr/index1.html. Consulté le 14 octobre 2013.
61. Di Cianni, G., Miccoli, R., Volpe, L., Lencioni, C., and Del Prato, S. (2003) Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* **19**, 259-270
62. Lapolla, A., Dalfra, M. G., and Fedele, D. (2005) Insulin therapy in pregnancy complicated by diabetes: are insulin analogs a new tool? *Diabetes Metab Res Rev* **21**, 241-252
63. Buchanan, T. A., and Xiang, A. H. (2005) Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* **115**, 485-491
64. Malecki, M. T., and Mlynarski, W. (2008) Monogenic diabetes: implications for therapy of rare types of disease. *Diabetes Obes Metab* **10**, 607-616
65. Tattersall, R. B. (1974) Mild familial diabetes with dominant inheritance. *The Quarterly journal of medicine* **43**, 339-357
66. Fajans, S. S., Bell, G. I., and Polonsky, K. S. (2001) Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* **345**, 971-980

67. Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Cox, N. J., Fajans, S. S., Signorini, S., Stoffel, M., and Bell, G. I. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* **384**, 458-460
68. Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R. D., Lathrop, G. M., Boriraj, V. V., Chen, X., Cox, N. J., Oda, Y., Yano, H., Le Beau, M. M., Yamada, S., Nishigori, H., Takeda, J., Fajans, S. S., Hattersley, A. T., Iwasaki, N., Hansen, T., Pedersen, O., Polonsky, K. S., Bell, G. I., and et al. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* **384**, 455-458
69. Stoffers, D. A., Ferrer, J., Clarke, W. L., and Habener, J. F. (1997) Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* **17**, 138-139
70. Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B. N., Lindner, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., Kuroki, H., Kasahara, T., Iwamoto, Y., and Bell, G. I. (1997) Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* **17**, 384-385
71. Froguel, P., Zouali, H., Vionnet, N., Velho, G., Vaxillaire, M., Sun, F., Lesage, S., Stoffel, M., Takeda, J., Passa, P., and et al. (1993) Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* **328**, 697-702
72. Coriati, A., Elisha, B., Virassamynaik, S., Phaneuf, M., Ziai, S., Gauthier, M. S., and Rabasa-Lhoret, R. Diagnosis of cystic fibrosis-related glucose abnormalities: Can we shorten the standard oral glucose tolerance test? *Appl Physiol Nutr Metab* **38**, 1254-1259
73. Lewis, T. D. (1974) Complications of chronic pancreatitis. *Aust N Z J Med* **4**, 518-521
74. Burra, P. Liver abnormalities and endocrine diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **27**, 553-563
75. Hart, P. A., and Chari, S. T. Diabetes mellitus and pancreatic cancer: why the association matters? *Pancreas* **42**, 1207-1209
76. OMS, O. M. d. I. S. W. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. http://www.staff.ncl.ac.uk/philip.home/who_dmc.htm. 14 octobre 2013.
77. Brunicardi, F. C., Shavelle, D. M., and Andersen, D. K. (1995) Neural regulation of the endocrine pancreas. *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology* **18**, 177-195

78. Havel, P. J., and Taborsky, G. J., Jr. (1989) The contribution of the autonomic nervous system to changes of glucagon and insulin secretion during hypoglycemic stress. *Endocr Rev* **10**, 332-350
79. Woods, S. C., Lutz, T. A., Geary, N., and Langhans, W. (2006) Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **361**, 1219-1235
80. Strowski, M. Z., Parmar, R. M., Blake, A. D., and Schaeffer, J. M. (2000) Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology* **141**, 111-117
81. Batterham, R. L., Le Roux, C. W., Cohen, M. A., Park, A. J., Ellis, S. M., Patterson, M., Frost, G. S., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2003) Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 3989-3992
82. Wierup, N., Sundler, F., and Heller, S. (2013) The islet ghrelin cell. *J Mol Endocrinol*
83. Servier Medical Art. <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.
84. Devaskar, S. U., Giddings, S. J., Rajakumar, P. A., Carnaghi, L. R., Menon, R. K., and Zahm, D. S. (1994) Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem* **269**, 8445-8454
85. Smith, K. M., Olson, D. C., Hirose, R., and Hanahan, D. (1997) Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int Immunol* **9**, 1355-1365
86. Cunha, D. A., Carneiro, E. M., Alves Mde, C., Jorge, A. G., de Sousa, S. M., Boschero, A. C., Saad, M. J., Velloso, L. A., and Rocha, E. M. (2005) Insulin secretion by rat lacrimal glands: effects of systemic and local variables. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**, E768-775
87. Vallejo, G., Mead, P. M., Gaynor, D. H., Devlin, J. T., and Robbins, D. C. (1984) Characterization of immunoreactive insulin in human saliva: evidence against production in situ. *Diabetologia* **27**, 437-440
88. Porte, D., Jr., Baskin, D. G., and Schwartz, M. W. (2005) Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* **54**, 1264-1276
89. Schwartz, M. W., and Porte, D., Jr. (2005) Diabetes, obesity, and the brain. *Science* **307**, 375-379
90. Pugliese, A. (1998) Insulin expression in the thymus, tolerance, and type 1 diabetes. *Diabetes Metab Rev* **14**, 325-327
91. Poitout, V., Stein, R., and Rhodes, C. J. (2004) Insulin gene expression and biosynthesis. in *International Textbook of Diabetes Mellitus*. (sons., J. W. a. ed.), Third Edition. Ed., DeFronzo, R.A. Ferraninni, E. Zimmet, P. pp 97-123.

92. Harper, M. E., Ullrich, A., and Saunders, G. F. (1981) Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4458-4460
93. Soares, M. B., Schon, E., Henderson, A., Karathanasis, S. K., Cate, R., Zeitlin, S., Chirgwin, J., and Efstratiadis, A. (1985) RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol Cell Biol* **5**, 2090-2103
94. Davies, P. O., Poirier, C., Deltour, L., and Montagnetelli, X. (1994) Genetic reassignment of the insulin-1 (Ins1) gene to distal mouse chromosome 19. *Genomics* **21**, 665-667
95. Duvillie, B., Bucchini, D., Tang, T., Jami, J., and Paldi, A. (1998) Imprinting at the mouse Ins2 locus: evidence for cis- and trans-allelic interactions. *Genomics* **47**, 52-57
96. Crowe, D. T., and Tsai, M. J. (1989) Mutagenesis of the rat insulin II 5'-flanking region defines sequences important for expression in HIT cells. *Mol Cell Biol* **9**, 1784-1789
97. Odagiri, H., Wang, J., and German, M. S. (1996) Function of the human insulin promoter in primary cultured islet cells. *J Biol Chem* **271**, 1909-1915
98. Boam, D. S., Clark, A. R., and Docherty, K. (1990) Positive and negative regulation of the human insulin gene by multiple trans-acting factors. *J Biol Chem* **265**, 8285-8296
99. Docherty, H. M., Hay, C. W., Ferguson, L. A., Barrow, J., Durward, E., and Docherty, K. (2005) Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter. *Biochem J* **389**, 813-820
100. da Silva Xavier, G., Rutter, J., and Rutter, G. A. (2004) Involvement of Per-Arnt-Sim (PAS) kinase in the stimulation of preproinsulin and pancreatic duodenum homeobox 1 gene expression by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8319-8324
101. Boam, D. S., and Docherty, K. (1989) A tissue-specific nuclear factor binds to multiple sites in the human insulin-gene enhancer. *Biochem J* **264**, 233-239
102. Karlsson, O., Edlund, T., Moss, J. B., Rutter, W. J., and Walker, M. D. (1987) A mutational analysis of the insulin gene transcription control region: expression in beta cells is dependent on two related sequences within the enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8819-8823
103. Rudnick, A., Ling, T. Y., Odagiri, H., Rutter, W. J., and German, M. S. (1994) Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12203-12207
104. Marshak, S., Totary, H., Cerasi, E., and Melloul, D. (1996) Purification of the beta-cell glucose-sensitive factor that transactivates the insulin gene differentially in normal and transformed islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15057-15062

105. Petersen, H. V., Serup, P., Leonard, J., Michelsen, B. K., and Madsen, O. D. (1994) Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10465-10469
106. German, M. S., and Wang, J. (1994) The insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucose. *Mol Cell Biol* **14**, 4067-4075
107. Hay, C. W., and Docherty, K. (2006) Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research. *Diabetes* **55**, 3201-3213
108. Qiu, Y., Guo, M., Huang, S., and Stein, R. (2002) Insulin gene transcription is mediated by interactions between the p300 coactivator and PDX-1, BETA2, and E47. *Mol Cell Biol* **22**, 412-420
109. Kim, J. Y., Chu, K., Kim, H. J., Seong, H. A., Park, K. C., Sanyal, S., Takeda, J., Ha, H., Shong, M., Tsai, M. J., and Choi, H. S. (2004) Orphan nuclear receptor small heterodimer partner, a novel corepressor for a basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/neuroD. *Mol Endocrinol* **18**, 776-790
110. Khoo, S., Griffen, S. C., Xia, Y., Baer, R. J., German, M. S., and Cobb, M. H. (2003) Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* **278**, 32969-32977
111. Qiu, Y., Sharma, A., and Stein, R. (1998) p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. *Mol Cell Biol* **18**, 2957-2964
112. Qiu, Y., Guo, M., Huang, S., and Stein, R. (2004) Acetylation of the BETA2 transcription factor by p300-associated factor is important in insulin gene expression. *J Biol Chem* **279**, 9796-9802
113. Andrali, S. S., Qian, Q., and Ozcan, S. (2007) Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation. *J Biol Chem* **282**, 15589-15596
114. Naya, F. J., Stellrecht, C. M., and Tsai, M. J. (1995) Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes & development* **9**, 1009-1019
115. Kim, W. Y., Fritzscht, B., Serls, A., Bakel, L. A., Huang, E. J., Reichardt, L. F., Barth, D. S., and Lee, J. E. (2001) NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development* **128**, 417-426
116. Chae, J. H., Stein, G. H., and Lee, J. E. (2004) NeuroD: the predicted and the surprising. *Molecules and cells* **18**, 271-288
117. Nishizawa, M., Kataoka, K., Goto, N., Fujiwara, K. T., and Kawai, S. (1989) v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7711-7715
118. Hang, Y., and Stein, R. (2011) MafA and MafB activity in pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* **22**, 364-373

119. Ogino, H., and Yasuda, K. (1998) Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. *Science* **280**, 115-118
120. Wang, H., Brun, T., Kataoka, K., Sharma, A. J., and Wollheim, C. B. (2007) MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia* **50**, 348-358
121. Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H., Oishi, H., Hamada, M., Morito, N., Hasegawa, K., Kudo, T., Engel, J. D., Yamamoto, M., and Takahashi, S. (2005) MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* **25**, 4969-4976
122. Rocques, N., Abou Zeid, N., Sii-Felice, K., Lecoin, L., Felder-Schmittbuhl, M. P., Eychene, A., and Pouponnot, C. (2007) GSK-3-mediated phosphorylation enhances Maf-transforming activity. *Mol Cell* **28**, 584-597
123. Guo, S., Burnette, R., Zhao, L., Vanderford, N. L., Poitout, V., Hagman, D. K., Henderson, E., Ozcan, S., Wadzinski, B. E., and Stein, R. (2009) The stability and transactivation potential of the mammalian MafA transcription factor are regulated by serine 65 phosphorylation. *J Biol Chem* **284**, 759-765
124. Abel, J. J. (1926) Crystalline Insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **12**, 132-136
125. Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin, D. C., and Mercola, D. A. (1972) Three-dimensional atomic structure of insulin and its relationship to activity. *Diabetes* **21**, 492-505
126. Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin, D. C., and Mercola, D. A. (1972) The crystal structure of rhombohedral 2 zinc insulin. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **36**, 233-241
127. Egea, P. F., Stroud, R. M., and Walter, P. (2005) Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Current opinion in structural biology* **15**, 213-220
128. Chan, S. J., Keim, P., and Steiner, D. F. (1976) Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 1964-1968
129. Munjaal, R. P., and Saunders, G. F. (1979) Isolation and characterization of preproinsulin mRNA from fetal bovine pancreatic islets. *Molecular and cellular endocrinology* **15**, 51-60
130. Lomedico, P. T., Chan, S. J., Steiner, D. F., and Saunders, G. F. (1977) Immunological and chemical characterization of bovine preproinsulin. *J Biol Chem* **252**, 7971-7978
131. JP, C. (2005) Insulin - From secretion to action. Beta Cell Biology Consortium.
132. Clouaire, T., and Stancheva, I. (2008) Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol Life Sci* **65**, 1509-1522

133. Mosley, A. L., and Ozcan, S. (2004) The pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx-1) interacts with histone deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on low levels of glucose. *J Biol Chem* **279**, 54241-54247
134. Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2005) Reversing histone methylation. *Nature* **436**, 1103-1106
135. Chakrabarti, S. K., Francis, J., Ziesmann, S. M., Garmey, J. C., and Mirmira, R. G. (2003) Covalent histone modifications underlie the developmental regulation of insulin gene transcription in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* **278**, 23617-23623
136. Francis, J., Babu, D. A., Deering, T. G., Chakrabarti, S. K., Garmey, J. C., Evans-Molina, C., Taylor, D. G., and Mirmira, R. G. (2006) Role of chromatin accessibility in the occupancy and transcription of the insulin gene by the pancreatic and duodenal homeobox factor 1. *Mol Endocrinol* **20**, 3133-3145
137. Deering, T. G., Ogihara, T., Trace, A. P., Maier, B., and Mirmira, R. G. (2009) Methyltransferase Set7/9 maintains transcription and euchromatin structure at islet-enriched genes. *Diabetes* **58**, 185-193
138. Andrali, S. S., Sampley, M. L., Vanderford, N. L., and Ozcan, S. (2008) Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochem J* **415**, 1-10
139. Wang, J., Shen, L., Najafi, H., Kolberg, J., Matschinsky, F. M., Urdea, M., and German, M. (1997) Regulation of insulin preRNA splicing by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4360-4365
140. Welsh, M., Nielsen, D. A., MacKrell, A. J., and Steiner, D. F. (1985) Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. II. Regulation of insulin mRNA stability. *J Biol Chem* **260**, 13590-13594
141. Wicksteed, B., Herbert, T. P., Alarcon, C., Lingohr, M. K., Moss, L. G., and Rhodes, C. J. (2001) Cooperativity between the preproinsulin mRNA untranslated regions is necessary for glucose-stimulated translation. *J Biol Chem* **276**, 22553-22558
142. Tillmar, L., Carlsson, C., and Welsh, N. (2002) Control of insulin mRNA stability in rat pancreatic islets. Regulatory role of a 3'-untranslated region pyrimidine-rich sequence. *J Biol Chem* **277**, 1099-1106
143. Ashcroft, S. J., Bunce, J., Lowry, M., Hansen, S. E., and Hedekov, C. J. (1978) The effect of sugars on (pro)insulin biosynthesis. *Biochem J* **174**, 517-526
144. Straub, S. G., and Sharp, G. W. (2002) Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* **18**, 451-463
145. Leibiger, I. B., Leibiger, B., Moede, T., and Berggren, P. O. (1998) Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin

- receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways. *Mol Cell* **1**, 933-938
146. Wu, H., MacFarlane, W. M., Tadayyon, M., Arch, J. R., James, R. F., and Docherty, K. (1999) Insulin stimulates pancreatic-duodenal homoeobox factor-1 (PDX1) DNA-binding activity and insulin promoter activity in pancreatic beta cells. *Biochem J* **344 Pt 3**, 813-818
 147. da Silva Xavier, G., Varadi, A., Ainscow, E. K., and Rutter, G. A. (2000) Regulation of gene expression by glucose in pancreatic beta -cells (MIN6) via insulin secretion and activation of phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Biol Chem* **275**, 36269-36277
 148. Galsgaard, E. D., Gouilleux, F., Groner, B., Serup, P., Nielsen, J. H., and Billestrup, N. (1996) Identification of a growth hormone-responsive STAT5-binding element in the rat insulin 1 gene. *Mol Endocrinol* **10**, 652-660
 149. Plaisance, V., Perret, V., Favre, D., Abderrahmani, A., Yang, J. Y., Widmann, C., and Regazzi, R. (2009) Role of the transcriptional factor C/EBPbeta in free fatty acid-elicited beta-cell failure. *Molecular and cellular endocrinology* **305**, 47-55
 150. Lu, M., Seufert, J., and Habener, J. F. (1997) Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding protein beta. Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47. *J Biol Chem* **272**, 28349-28359
 151. Robertson, R. P., Olson, L. K., and Zhang, H. J. (1994) Differentiating glucose toxicity from glucose desensitization: a new message from the insulin gene. *Diabetes* **43**, 1085-1089
 152. Sempoux, C., Guiot, Y., Dubois, D., Moulin, P., and Rahier, J. (2001) Human type 2 diabetes: morphological evidence for abnormal beta-cell function. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S172-177
 153. Yang, B. T., Dayeh, T. A., Kirkpatrick, C. L., Taneera, J., Kumar, R., Groop, L., Wollheim, C. B., Nitert, M. D., and Ling, C. (2011) Insulin promoter DNA methylation correlates negatively with insulin gene expression and positively with HbA(1c) levels in human pancreatic islets. *Diabetologia* **54**, 360-367
 154. Orland, M. J., and Permutt, M. A. (1987) Quantitative analysis of pancreatic proinsulin mRNA in genetically diabetic (db/db) mice. *Diabetes* **36**, 341-347
 155. Tokuyama, Y., Sturis, J., DePaoli, A. M., Takeda, J., Stoffel, M., Tang, J., Sun, X., Polonsky, K. S., and Bell, G. I. (1995) Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* **44**, 1447-1457
 156. Briaud, I., Rouault, C., Bailbe, D., Portha, B., Reach, G., and Poitout, V. (2000) Glucose-induced insulin mRNA accumulation is impaired in islets from neonatal streptozotocin-treated rats. *Horm Metab Res* **32**, 53-56
 157. Leibowitz, G., Uckaya, G., Oprescu, A. I., Cerasi, E., Gross, D. J., and Kaiser, N. (2002) Glucose-regulated proinsulin gene expression is required for

- adequate insulin production during chronic glucose exposure. *Endocrinology* **143**, 3214-3220
158. Robertson, R. P. (2004) Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* **279**, 42351-42354
 159. Donath, M. Y., Ehses, J. A., Maedler, K., Schumann, D. M., Ellingsgaard, H., Eppler, E., and Reinecke, M. (2005) Mechanisms of beta-cell death in type 2 diabetes. *Diabetes* **54 Suppl 2**, S108-113
 160. Shi, Y., Taylor, S. I., Tan, S. L., and Sonenberg, N. (2003) When translation meets metabolism: multiple links to diabetes. *Endocr Rev* **24**, 91-101
 161. O'Brien, T. D., Butler, P. C., Westermark, P., and Johnson, K. H. (1993) Islet amyloid polypeptide: a review of its biology and potential roles in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Veterinary pathology* **30**, 317-332
 162. Huang, C. J., Lin, C. Y., Haataja, L., Gurlo, T., Butler, A. E., Rizza, R. A., and Butler, P. C. (2007) High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes* **56**, 2016-2027
 163. Valent, P. Mast cell activation syndromes: definition and classification. *Allergy* **68**, 417-424
 164. Poitout, V. (2008) Glucolipotoxicity of the pancreatic beta-cell: myth or reality? *Biochem Soc Trans* **36**, 901-904
 165. Gremlich, S., Bonny, C., Waeber, G., and Thorens, B. (1997) Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem* **272**, 30261-30269
 166. Jacqueminet, S., Briaud, I., Rouault, C., Reach, G., and Poitout, V. (2000) Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism* **49**, 532-536
 167. Briaud, I., Harmon, J. S., Kelpe, C. L., Segu, V. B., and Poitout, V. (2001) Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* **50**, 315-321
 168. El-Assaad, W., Buteau, J., Peyot, M. L., Nolan, C., Roduit, R., Hardy, S., Joly, E., Dbaibo, G., Rosenberg, L., and Prentki, M. (2003) Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* **144**, 4154-4163
 169. Briaud, I., Kelpe, C. L., Johnson, L. M., Tran, P. O., and Poitout, V. (2002) Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* **51**, 662-668

170. Harmon, J. S., Gleason, C. E., Tanaka, Y., Poitout, V., and Robertson, R. P. (2001) Antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content and decreased insulin gene mRNA level in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* **50**, 2481-2486
171. Elks, M. L. (1993) Chronic perfusion of rat islets with palmitate suppresses glucose-stimulated insulin release. *Endocrinology* **133**, 208-214
172. Zhou, Y. P., and Grill, V. E. (1994) Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* **93**, 870-876
173. Zhou, Y. P., and Grill, V. (1995) Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 1584-1590
174. Sako, Y., and Grill, V. E. (1990) A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* **127**, 1580-1589
175. Kelpe, C. L., Moore, P. C., Parazzoli, S. D., Wicksteed, B., Rhodes, C. J., and Poitout, V. (2003) Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *J Biol Chem* **278**, 30015-30021
176. Fontes, G., Semache, M., Hagman, D. K., Tremblay, C., Shah, R., Rhodes, C. J., Rutter, J., and Poitout, V. (2009) Involvement of Per-Arnt-Sim Kinase and extracellular-regulated kinases-1/2 in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **58**, 2048-2058
177. Fontes, G., Zarrouki, B., Hagman, D. K., Latour, M. G., Semache, M., Roskens, V., Moore, P. C., Prentki, M., Rhodes, C. J., Jetton, T. L., and Poitout, V. Glucolipotoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia* **53**, 2369-2379
178. Carpentier, A., Mittelman, S. D., Lamarche, B., Bergman, R. N., Giacca, A., and Lewis, G. F. (1999) Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *The American journal of physiology* **276**, E1055-1066
179. Hagman, D. K., Hays, L. B., Parazzoli, S. D., and Poitout, V. (2005) Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* **280**, 32413-32418
180. Hagman, D. K., Latour, M. G., Chakrabarti, S. K., Fontes, G., Amyot, J., Tremblay, C., Semache, M., Lausier, J. A., Roskens, V., Mirmira, R. G., Jetton, T. L., and Poitout, V. (2008) Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets. *Diabetes* **57**, 424-431

181. Ritz-Laser, B., Meda, P., Constant, I., Klages, N., Charollais, A., Morales, A., Magnan, C., Ktorza, A., and Philippe, J. (1999) Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free fatty acid palmitate. *Endocrinology* **140**, 4005-4014
182. Amyot, J., Benterki, I., Fontes, G., Hagman, D. K., Ferdaoussi, M., Teodoro, T., Volchuk, A., Joly, E., and Poitout, V. Binding of activating transcription factor 6 to the A5/Core of the rat insulin II gene promoter does not mediate its transcriptional repression. *J Mol Endocrinol* **47**, 273-283
183. Fontes, G., Hagman, D. K., Latour, M. G., Semache, M., and Poitout, V. Lack of preservation of insulin gene expression by a glucagon-like peptide 1 agonist or a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor in an in vivo model of glucolipotoxicity. *Diabetes Res Clin Pract* **87**, 322-328
184. Melloul, D. (2004) Transcription factors in islet development and physiology: role of PDX-1 in beta-cell function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1014**, 28-37
185. Habener, J. F., Kemp, D. M., and Thomas, M. K. (2005) Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* **146**, 1025-1034
186. Melloul, D., Marshak, S., and Cerasi, E. (2002) Regulation of pdx-1 gene expression. *Diabetes* **51 Suppl 3**, S320-325
187. Kaneto, H., Miyatsuka, T., Kawamori, D., and Matsuoka, T. A. (2007) Pleiotropic Roles of PDX-1 in the Pancreas. *The review of diabetic studies : RDS* **4**, 209-225
188. Ohlsson, H., Karlsson, K., and Edlund, T. (1993) IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *The EMBO journal* **12**, 4251-4259
189. Guz, Y., Montminy, M. R., Stein, R., Leonard, J., Gamer, L. W., Wright, C. V., and Teitelman, G. (1995) Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* **121**, 11-18
190. Gu, G., Dubauskaite, J., and Melton, D. A. (2002) Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* **129**, 2447-2457
191. Ashizawa, S., Brunnicardi, F. C., and Wang, X. P. (2004) PDX-1 and the pancreas. *Pancreas* **28**, 109-120
192. McKinnon, C. M., and Docherty, K. (2001) Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* **44**, 1203-1214
193. Leibowitz, G., Melloul, D., Yuli, M., Gross, D. J., Apelqvist, A., Edlund, H., Cerasi, E., and Kaiser, N. (2001) Defective glucose-regulated insulin gene

- expression associated with PDX-1 deficiency in the *Psammomys obesus* model of type 2 diabetes. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S138-139
194. Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**, 606-609
 195. Brissova, M., Shiota, M., Nicholson, W. E., Gannon, M., Knobel, S. M., Piston, D. W., Wright, C. V., and Powers, A. C. (2002) Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* **277**, 11225-11232
 196. Dutta, S., Bonner-Weir, S., Montminy, M., and Wright, C. (1998) Regulatory factor linked to late-onset diabetes? *Nature* **392**, 560
 197. Johnson, J. D., Ahmed, N. T., Luciani, D. S., Han, Z., Tran, H., Fujita, J., Mislser, S., Edlund, H., and Polonsky, K. S. (2003) Increased islet apoptosis in Pdx1^{+/-} mice. *J Clin Invest* **111**, 1147-1160
 198. Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K., and Edlund, H. (1998) beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes & development* **12**, 1763-1768
 199. Cockburn, B. N., Bermanno, G., Boodram, L. L., Teelucksingh, S., Tsuchiya, T., Mahabir, D., Allan, A. B., Stein, R., Docherty, K., and Bell, G. I. (2004) Insulin promoter factor-1 mutations and diabetes in Trinidad: identification of a novel diabetes-associated mutation (E224K) in an Indo-Trinidadian family. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 971-978
 200. Stoffers, D. A., Zinkin, N. T., Stanojevic, V., Clarke, W. L., and Habener, J. F. (1997) Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* **15**, 106-110
 201. Habener, J. F. (2002) The Role of Pancreatic Duodenum Homeobox Protein-1 in the Development of Diabetes Mellitus. *Drug News Perspect* **15**, 491-497
 202. Schwitzgebel, V. M., Mamin, A., Brun, T., Ritz-Laser, B., Zaiko, M., Maret, A., Jornayvaz, F. R., Theintz, G. E., Michielin, O., Melloul, D., and Philippe, J. (2003) Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 4398-4406
 203. Hani, E. H., Stoffers, D. A., Chevre, J. C., Durand, E., Stanojevic, V., Dina, C., Habener, J. F., and Froguel, P. (1999) Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* **104**, R41-48
 204. Macfarlane, W. M., Frayling, T. M., Ellard, S., Evans, J. C., Allen, L. I., Bulman, M. P., Ayres, S., Shepherd, M., Clark, P., Millward, A., Demaine, A., Wilkin, T., Docherty, K., and Hattersley, A. T. (1999) Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J Clin Invest* **104**, R33-39

205. Weng, J., Macfarlane, W. M., Lehto, M., Gu, H. F., Shepherd, L. M., Ivarsson, S. A., Wibell, L., Smith, T., and Groop, L. C. (2001) Functional consequences of mutations in the MODY4 gene (IPF1) and coexistence with MODY3 mutations. *Diabetologia* **44**, 249-258
206. Serup, P., Jensen, J., Andersen, F. G., Jorgensen, M. C., Blume, N., Holst, J. J., and Madsen, O. D. (1996) Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9015-9020
207. Waeber, G., Thompson, N., Nicod, P., and Bonny, C. (1996) Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* **10**, 1327-1334
208. Watada, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Hanafusa, T., Hamaguchi, K., Matsuoka, T., Yamamoto, K., Matsuzawa, Y., Kawamori, R., and Yamasaki, Y. (1996) PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in alphaTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes* **45**, 1826-1831
209. Raum, J. C., Gerrish, K., Artner, I., Henderson, E., Guo, M., Sussel, L., Schisler, J. C., Newgard, C. B., and Stein, R. (2006) FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 regulate islet beta-cell-specific mafA expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site. *Mol Cell Biol* **26**, 5735-5743
210. Marshak, S., Benshushan, E., Shoshkes, M., Havin, L., Cerasi, E., and Melloul, D. (2000) Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol* **20**, 7583-7590
211. Leonard, J., Peers, B., Johnson, T., Ferreri, K., Lee, S., and Montminy, M. R. (1993) Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol* **7**, 1275-1283
212. Deramautd, T. B., Sachdeva, M. M., Wescott, M. P., Chen, Y., Stoffers, D. A., and Rustgi, A. K. (2006) The PDX1 homeodomain transcription factor negatively regulates the pancreatic ductal cell-specific keratin 19 promoter. *The Journal of biological chemistry* **281**, 38385-38395
213. Kataoka, K., Han, S. I., Shioda, S., Hirai, M., Nishizawa, M., and Handa, H. (2002) MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *The Journal of biological chemistry* **277**, 49903-49910
214. Leibiger, B., Moede, T., Schwarz, T., Brown, G. R., Kohler, M., Leibiger, I. B., and Berggren, P. O. (1998) Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9307-9312

215. Glick, E., Leshkowitz, D., and Walker, M. D. (2000) Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter. *The Journal of biological chemistry* **275**, 2199-2204
216. Aramata, S., Han, S. I., Yasuda, K., and Kataoka, K. (2005) Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1. *Biochimica et biophysica acta* **1730**, 41-46
217. Lawrence, M. C., McGlynn, K., Park, B. H., and Cobb, M. H. (2005) ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter. *J Biol Chem* **280**, 26751-26759
218. Mosley, A. L., Corbett, J. A., and Ozcan, S. (2004) Glucose regulation of insulin gene expression requires the recruitment of p300 by the beta-cell-specific transcription factor Pdx-1. *Mol Endocrinol* **18**, 2279-2290
219. Mosley, A. L., and Ozcan, S. (2003) Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone h4. *J Biol Chem* **278**, 19660-19666
220. Francis, J., Chakrabarti, S. K., Garmey, J. C., and Mirmira, R. G. (2005) Pdx-1 links histone H3-Lys-4 methylation to RNA polymerase II elongation during activation of insulin transcription. *J Biol Chem* **280**, 36244-36253
221. Iype, T., Francis, J., Garmey, J. C., Schisler, J. C., Nesher, R., Weir, G. C., Becker, T. C., Newgard, C. B., Griffen, S. C., and Mirmira, R. G. (2005) Mechanism of insulin gene regulation by the pancreatic transcription factor Pdx-1: application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess formation of functional transcriptional complexes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 16798-16807
222. Stanojevic, V., Yao, K. M., and Thomas, M. K. (2005) The coactivator Bridge-1 increases transcriptional activation by pancreas duodenum homeobox-1 (PDX-1). *Molecular and cellular endocrinology* **237**, 67-74
223. Lee, J. H., Volinic, J. L., Banz, C., Yao, K. M., and Thomas, M. K. (2005) Interactions with p300 enhance transcriptional activation by the PDZ-domain coactivator Bridge-1. *The Journal of endocrinology* **187**, 283-292
224. Habener, J. (2000) Insulinotropic glucagon-like peptides. in *Diabetes Mellitus: A fundamental and Clinical Text*. (LeRoith D, T. S., Olefsky JM ed., Second edition Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
225. Stoffers, D. A., Kieffer, T. J., Hussain, M. A., Drucker, D. J., Bonner-Weir, S., Habener, J. F., and Egan, J. M. (2000) Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* **49**, 741-748
226. Inoue, H., Riggs, A. C., Tanizawa, Y., Ueda, K., Kuwano, A., Liu, L., Donis-Keller, H., and Permutt, M. A. (1996) Isolation, characterization, and

- chromosomal mapping of the human insulin promoter factor 1 (IPF-1) gene. *Diabetes* **45**, 789-794
227. Fiedorek, F. T., Jr., and Kay, E. S. (1995) Mapping of the insulin promoter factor 1 gene (Ipfl) to distal mouse chromosome 5. *Genomics* **28**, 581-584
 228. Yokoi, N., Serikawa, T., and Walther, R. (1997) Pdx1, a homeodomain transcription factor required for pancreas development, maps to rat chromosome 12. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* **46**, 323-324
 229. Sharma, S., Leonard, J., Lee, S., Chapman, H. D., Leiter, E. H., and Montminy, M. R. (1996) Pancreatic islet expression of the homeobox factor STF-1 relies on an E-box motif that binds USF. *J Biol Chem* **271**, 2294-2299
 230. Wu, K. L., Gannon, M., Peshavaria, M., Offield, M. F., Henderson, E., Ray, M., Marks, A., Gamer, L. W., Wright, C. V., and Stein, R. (1997) Hepatocyte nuclear factor 3beta is involved in pancreatic beta-cell-specific transcription of the pdx-1 gene. *Mol Cell Biol* **17**, 6002-6013
 231. Sharma, S., Jhala, U. S., Johnson, T., Ferreri, K., Leonard, J., and Montminy, M. (1997) Hormonal regulation of an islet-specific enhancer in the pancreatic homeobox gene STF-1. *Mol Cell Biol* **17**, 2598-2604
 232. Gerrish, K., Gannon, M., Shih, D., Henderson, E., Stoffel, M., Wright, C. V., and Stein, R. (2000) Pancreatic beta cell-specific transcription of the pdx-1 gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites. *J Biol Chem* **275**, 3485-3492
 233. Perfetti, R., Zhou, J., Doyle, M. E., and Egan, J. M. (2000) Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology* **141**, 4600-4605
 234. Sayo, Y., Hosokawa, H., Imachi, H., Murao, K., Sato, M., Wong, N. C., Ishida, T., and Takahara, J. (2000) Transforming growth factor beta induction of insulin gene expression is mediated by pancreatic and duodenal homeobox gene-1 in rat insulinoma cells. *Eur J Biochem* **267**, 971-978
 235. Shinozuka, Y., Okada, M., Oki, T., Sagane, K., Mizui, Y., Tanaka, I., Katayama, K., and Murakami-Murofushi, K. (2001) Altered expression of HES-1, BETA2/NeuroD, and PDX-1 is involved in impaired insulin synthesis induced by glucocorticoids in HIT-T15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 229-235
 236. Lee, C. S., Sund, N. J., Vatamaniuk, M. Z., Matschinsky, F. M., Stoffers, D. A., and Kaestner, K. H. (2002) Foxa2 controls Pdx1 gene expression in pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes* **51**, 2546-2551
 237. Rafiq, I., da Silva Xavier, G., Hooper, S., and Rutter, G. A. (2000) Glucose-stimulated preproinsulin gene expression and nuclear trans-location of

- pancreatic duodenum homeobox-1 require activation of phosphatidylinositol 3-kinase but not p38 MAPK/SAPK2. *J Biol Chem* **275**, 15977-15984
238. Kishi, A., Nakamura, T., Nishio, Y., Maegawa, H., and Kashiwagi, A. (2003) Sumoylation of Pdx1 is associated with its nuclear localization and insulin gene activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E830-840
239. Carlotti, F., Zaldumbide, A., Charif, H., de Koning, E. J., Luidier, T. M., and Hoeben, R. C. (2008) The 45-kDa form of Pdx-1 does not result from post-translational modifications. *Biochem Biophys Res Commun* **370**, 225-229
240. Hessabi, B., Ziegler, P., Schmidt, I., Hessabi, C., and Walther, R. (1999) The nuclear localization signal (NLS) of PDX-1 is part of the homeodomain and represents a novel type of NLS. *European journal of biochemistry / FEBS* **263**, 170-177
241. Moede, T., Leibiger, B., Pour, H. G., Berggren, P., and Leibiger, I. B. (1999) Identification of a nuclear localization signal, RRMKWKK, in the homeodomain transcription factor PDX-1. *FEBS Lett* **461**, 229-234
242. Elrick, L. J., and Docherty, K. (2001) Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes* **50**, 2244-2252
243. Macfarlane, W. M., McKinnon, C. M., Felton-Edkins, Z. A., Cragg, H., James, R. F., and Docherty, K. (1999) Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **274**, 1011-1016
244. Petersen, H. V., Peshavaria, M., Pedersen, A. A., Philippe, J., Stein, R., Madsen, O. D., and Serup, P. (1998) Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett* **431**, 362-366
245. Boucher, M. J., Selander, L., Carlsson, L., and Edlund, H. (2006) Phosphorylation marks IPF1/PDX1 protein for degradation by glycogen synthase kinase 3-dependent mechanisms. *J Biol Chem* **281**, 6395-6403
246. Humphrey, R. K., Yu, S. M., Flores, L. E., and Jhala, U. S. (2010) Glucose regulates steady-state levels of PDX1 via the reciprocal actions of GSK3 and AKT kinases. *J Biol Chem* **285**, 3406-3416
247. An, R., da Silva Xavier, G., Semplici, F., Vakhshouri, S., Hao, H. X., Rutter, J., Pagano, M. A., Meggio, F., Pinna, L. A., and Rutter, G. A. (2010) Pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) phosphorylation at serine-269 is HIPK2-dependent and affects PDX1 subnuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun* **399**, 155-161
248. Lebrun, P., Montminy, M. R., and Van Obberghen, E. (2005) Regulation of the pancreatic duodenal homeobox-1 protein by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **280**, 38203-38210

249. Semache, M., Zarrouki, B., Fontes, G., Fogarty, S., Kikani, C., Chawki, M. B., Rutter, J., and Poitout, V. (2013) Per-Arnt-Sim Kinase Regulates Pancreatic Duodenal Homeobox-1 Protein Stability via Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3 Beta in Pancreatic Beta Cells. *J Biol Chem*
250. Fernandez-Alvarez, J., Barbera, A., Nadal, B., Barcelo-Batlloiri, S., Piquer, S., Claret, M., Guinovart, J. J., and Gomis, R. (2004) Stable and functional regeneration of pancreatic beta-cell population in nSTZ-rats treated with tungstate. *Diabetologia* **47**, 470-477
251. An, R., da Silva Xavier, G., Hao, H. X., Semplici, F., Rutter, J., and Rutter, G. A. (2006) Regulation by Per-Arnt-Sim (PAS) kinase of pancreatic duodenal homeobox-1 nuclear import in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans* **34**, 791-793
252. Meng, R., Al-Quobaili, F., Muller, I., Gotz, C., Thiel, G., and Montenarh, M. (2010) CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity. *Cell Mol Life Sci* **67**, 2481-2489
253. An, R., da Silva Xavier, G., Semplici, F., Vakhshouri, S., Hao, H. X., Rutter, J., Pagano, M. A., Meggio, F., Pinna, L. A., and Rutter, G. A. (2010) Pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) phosphorylation at serine-269 is HIPK2-dependent and affects PDX1 subnuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun*
254. Acosta, D., Affolder, T., Akimoto, H., Albrow, M. G., Ambrose, D., Amidei, D., Anikeev, K., Antos, J., Apollinari, G., Arisawa, T., Artikov, A., Asakawa, T., Ashmanskas, W., Azfar, F., Azzi-Bacchetta, P., Bacchetta, N., Bachacou, H., Badgett, W., Bailey, S., De Barbaro, P., Barbaro-Galtieri, A., Barnes, V. E., Barnett, B. A., Baroiant, S., Barone, M., Bauer, G., Bedeschi, F., Behari, S., Belforte, S., Bell, W. H., Bellettini, G., Bellinger, J., Benjamin, D., Bensinger, J., Beretvas, A., Berryhill, J., Bhatti, A., Binkley, M., Bisello, D., Bishai, M., Blair, R. E., Blocker, C., Bloom, K., Blumenfeld, B., Blusk, S. R., Bocci, A., Bodek, A., Bolla, G., Bolshov, A., Bonushkin, Y., Bortoletto, D., Boudreau, J., Brandl, A., Bromberg, C., Brozovic, M., Brubaker, E., Bruner, N., Budagov, J., Budd, H. S., Burkett, K., Busetto, G., Byrum, K. L., Cabrera, S., Calafiura, P., Campbell, M., Carithers, W., Carlson, J., Carlsmith, D., Caskey, W., Castro, A., Cauz, D., Cerri, A., Cerrito, L., Chan, A. W., Chang, P. S., Chang, P. T., Chapman, J., Chen, C., Chen, Y. C., Cheng, M. T., Chertok, M., Chiarelli, G., Chirikov-Zorin, I., Chlachidze, G., Chlebana, F., Christofek, L., Chu, M. L., Chung, J. Y., Chung, W. H., Chung, Y. S., Ciobanu, C. I., Clark, A. G., Coca, M., Colijn, A. P., Connolly, A., Convery, M., Conway, J., Cordelli, M., Cranshaw, J., Culbertson, R., Dagenhart, D., D'Auria, S., Cecco, S. D., DeJongh, F., Dell'Agnello, S., Dell'Orso, M., Demers, S., Demortier, L., Deninno, M., Pedis, D. D., Derwent, P. F., Devlin, T., Dionisi, C., Dittmann, J. R., Dominguez, A., Donati, S., D'Onofrio, M.,

Dorigo, T., Eddy, N., Einsweiler, K., Engels, E., Jr., Erbacher, R., Errede, D., Errede, S., Eusebi, R., Fan, Q., Fang, H. C., Farrington, S., Feild, R. G., Fernandez, J. P., Ferretti, C., Field, R. D., Fiori, I., Flaughner, B., Flores-Castillo, L. R., Foster, G. W., Franklin, M., Freeman, J., Friedman, J., Fukui, Y., Furic, I., Galeotti, S., Gallas, A., Gallinaro, M., Gao, T., Garcia-Sciveres, M., Garfinkel, A. F., Gatti, P., Gay, C., Gerdes, D. W., Gerstein, E., Giagu, S., Giannetti, P., Giolo, K., Giordani, M., Glagolev, V., Glenzinski, D., Gold, M., Goldschmidt, N., Goldstein, J., Gomez, G., Goncharov, M., Gorelov, I., Goshaw, A. T., Gotra, Y., Goulianos, K., Green, C., Gresele, A., Grim, G., Grosso-Pilcher, C., Guenther, M., Guillian, G., Da Costa, J. G., Haas, R. M., Haber, C., Hahn, S. R., Halkiadakis, E., Hall, C., Handa, T., Handler, R., Happacher, F., Hara, K., Hardman, A. D., Harris, R. M., Hartmann, F., Hatakeyama, K., Hauser, J., Heinrich, J., Heiss, A., Hennecke, M., Herndon, M., Hill, C., Hocker, A., Hoffman, K. D., Hollebeek, R., Holloway, L., Hou, S., Huffman, B. T., Hughes, R., Huston, J., Huth, J., Ikeda, H., Issever, C., Incandela, J., Introzzi, G., Iori, M., Ivanov, A., Iwai, J., Iwata, Y., Iyutin, B., James, E., Jones, M., Joshi, U., Kambara, H., Kamon, T., Kaneko, T., Kang, J., Unel, M. K., Karr, K., Kartal, S., Kasha, H., Kato, Y., Keaffaber, T. A., Kelley, K., Kelly, M., Kennedy, R. D., Kephart, R., Khazins, D., Kikuchi, T., Kilminster, B., Kim, B. J., Kim, D. H., Kim, H. S., Kim, M. J., Kim, S. B., Kim, S. H., Kim, T. H., Kim, Y. K., Kirby, M., Kirk, M., Kirsch, L., Klimentko, S., Koehn, P., Kondo, K., Konigsberg, J., Korn, A., Korytov, A., Kotelnikov, K., Kovacs, E., Kroll, J., Kruse, M., Krutelyov, V., Kuhlmann, S. E., Kurino, K., Kuwabara, T., Kuznetsova, N., Laasanen, A. T., Lai, N., Lami, S., Lammel, S., Lancaster, J., Lannon, K., Lancaster, M., Lander, R., Lath, A., Latino, G., LeCompte, T., Le, Y., Lee, J., Lee, S. W., Leonardo, N., Leone, S., Lewis, J. D., Li, K., Lin, C. S., Lindgren, M., Liss, T. M., Liu, J. B., Liu, T., Liu, Y. C., Litvintsev, D. O., Lobban, O., Lockyer, N. S., Loginov, A., Loken, J., Loreti, M., Lucchesi, D., Lukens, P., Lusin, S., Lyons, L., Lys, J., Madrak, R., Maeshima, K., Maksimovic, P., Malferrari, L., Mangano, M., Manca, G., Mariotti, M., Martignon, G., Martin, M., Martin, A., Martin, V., Martinez, M., Matthews, J. A., Mazzanti, P., McFarland, K. S., McIntyre, P., Menguzzato, M., Menzione, A., Merkel, P., Mesropian, C., Meyer, A., Miao, T., Miller, R., Miller, J. S., Minato, H., Miscetti, S., Mishina, M., Mitselmakher, G., Miyazaki, Y., Moggi, N., Moore, E., Moore, R., Morita, Y., Moulrik, T., Mulhearn, M., Mukherjee, A., Muller, T., Munar, A., Murat, P., Murgia, S., Nachtman, J., Nagaslaev, V., Nahn, S., Nakada, H., Nakano, I., Nاپora, R., Niell, F., Nelson, C., Nelson, T., Neu, C., Neubauer, M. S., Neuberger, D., Newman-Holmes, C., Ngan, C. Y., Nigmanov, T., Niu, H., Nodulman, L., Nomerotski, A., Oh, S. H., Oh, Y. D., Ohmoto, T., Ohsugi, T., Oishi, R., Okusawa, T., Olsen, J., Orejudos, W., Pagliarone, C., Palmonari,

- F., Paoletti, R., Papadimitriou, V., Partos, D., Patrick, J., Pauletta, G., Paulini, M., Pauly, T., Paus, C., Pellett, D., Penzo, A., Pescara, L., Phillips, T. J., Piacentino, G., Piedra, J., Pitts, K. T., Pompos, A., Pondrom, L., Pope, G., Pratt, T., Prokoshin, F., Proudfoot, J., Ptohos, F., Pukhov, O., Punzi, G., Rademacker, J., Rakitine, A., Ratnikov, F., Ray, H., Reher, D., Reichold, A., Renton, P., Rescigno, M., Ribon, A., Riegler, W., Rimondi, F., Ristori, L., Robertson, W. J., Rodrigo, T., Rolli, S., Rosenson, L., Roser, R., Rossin, R., Rott, C., Roy, A., Ruiz, A., Ryan, D., Safonov, A., Denis, R. S., Sakumoto, W. K., Saltzberg, D., Sanchez, C., Sansoni, A., Santi, L., Sarkar, S., Sato, H., Savoy-Navarro, A., Schlabach, P., Schmidt, E. E., Schmidt, M. P., Schmitt, M., Scodellaro, L., Scott, A., Scribano, A., Sedov, A., Seidel, S., Seiya, Y., Semenov, A., Semeria, F., Shah, T., Shapiro, M. D., Shepard, P. F., Shibayama, T., Shimojima, M., Shochet, M., Sidoti, A., Siegrist, J., Sill, A., Singh, P., Slaughter, A. J., Sliwa, K., Snider, F. D., Snihur, R., Solodsky, A., Spalding, J., Speer, T., Spezziga, M., Sphicas, P., Spinella, F., Spiropulu, M., Spiegel, L., Steele, J., Stefanini, A., Strologas, J., Strumia, F., Stuart, D., Sukhanov, A., Sumorok, K., Suzuki, T., Takano, T., Takashima, R., Takikawa, K., Tamburello, P., Tanaka, M., Tannenbaum, B., Tecchio, M., Tesarek, R. J., Teng, P. K., Terashi, K., Tether, S., Thom, J., Thompson, A. S., Thomson, E., Thurman-Keup, R., Tipton, P., Tkaczyk, S., Toback, D., Tollefson, K., Tonelli, D., Tonnesmann, M., Toyoda, H., De Troconiz, J. F., Tseng, J., Tsybychev, D., Turini, N., Ukegawa, F., Unverhau, T., Vaiciulis, T., Valls, J., Varganov, A., Vataga, E., Vejcik, S., 3rd, Velez, G., Veramendi, G., Vidal, R., Vila, I., Vilar, R., Volobouev, I., Von Der Mey, M., Vucinic, D., Wagner, R. G., Wagner, R. L., Wagner, W., Wallace, N. B., Wan, Z., Wang, C., Wang, M. J., Wang, S. M., Ward, B., Waschke, S., Watanabe, T., Waters, D., Watts, T., Weber, M., Wenzel, H., Wester, W. C., 3rd, Whitehouse, B., Wicklund, A. B., Wicklund, E., Wilkes, T., Williams, H. H., Wilson, P., Winer, B. L., Winn, D., Wolbers, S., Wolinski, D., Wolinski, J., Wolinski, S., Wolter, M., Worm, S., Wu, X., Wurthwein, F., Wyss, J., Yang, U. K., Yao, W., Yeh, G. P., Yeh, P., Yi, K., Yoh, J., Yosef, C., Yoshida, T., Yu, I., Yu, S., Yu, Z., Yun, J. C., Zanello, L., Zanetti, A., Zetti, F., and Zucchelli, S. (2003) Central pseudorapidity gaps in events with a leading antiproton at the fermilab tevatron pp collider. *Phys Rev Lett* **91**, 011802
255. Kebede, M., Ferdaoussi, M., Mancini, A., Alquier, T., Kulkarni, R. N., Walker, M. D., and Poitout, V. (2012) Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 2376-2381

256. Melloul, D., Ben-Neriah, Y., and Cerasi, E. (1993) Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3865-3869
257. Shushan, E. B., Cerasi, E., and Melloul, D. (1999) Regulation of the insulin gene by glucose: stimulation of trans-activation potency of human PDX-1 N-terminal domain. *DNA Cell Biol* **18**, 471-479
258. Semache, M., Zarrouki, B., Fontes, G., Fogarty, S., Kikani, C., Chawki, M. B., Rutter, J., and Poitout, V. (2013) Per-Arnt-Sim Kinase Regulates Pancreatic Duodenal Homeobox-1 Protein Stability via Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3beta in Pancreatic beta-Cells. *J Biol Chem* **288**, 24825-24833
259. Humphrey, R. K., Yu, S. M., Flores, L. E., and Jhala, U. S. Glucose regulates steady-state levels of PDX1 via the reciprocal actions of GSK3 and AKT kinases. *J Biol Chem* **285**, 3406-3416
260. Macfarlane, W. M., Smith, S. B., James, R. F., Clifton, A. D., Doza, Y. N., Cohen, P., and Docherty, K. (1997) The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **272**, 20936-20944
261. Arnette, D., Gibson, T. B., Lawrence, M. C., January, B., Khoo, S., McGlynn, K., Vanderbilt, C. A., and Cobb, M. H. (2003) Regulation of ERK1 and ERK2 by glucose and peptide hormones in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* **278**, 32517-32525
262. Rafiq, I., Kennedy, H. J., and Rutter, G. A. (1998) Glucose-dependent translocation of insulin promoter factor-1 (IPF-1) between the nuclear periphery and the nucleoplasm of single MIN6 beta-cells. *J Biol Chem* **273**, 23241-23247
263. Melloul, D., Ben-Neriah, Y., and Cerasi, E. (1993) Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 3865-3869
264. Mosley, A. L., Corbett, J. A., and Ozcan, S. (2004) Glucose Regulation of Insulin Gene Expression Requires the Recruitment of p300 by the Beta-cell Specific Transcription Factor Pdx-1. *Mol Endocrinol*
265. Liu, Z., Tanabe, K., Bernal-Mizrachi, E., and Permutt, M. A. (2008) Mice with beta cell overexpression of glycogen synthase kinase-3beta have reduced beta cell mass and proliferation. *Diabetologia* **51**, 623-631
266. Tanabe, K., Liu, Z., Patel, S., Doble, B. W., Li, L., Cras-Meneur, C., Martinez, S. C., Welling, C. M., White, M. F., Bernal-Mizrachi, E., Woodgett, J. R., and Permutt, M. A. (2008) Genetic deficiency of glycogen synthase kinase-3beta corrects diabetes in mouse models of insulin resistance. *PLoS Biol* **6**, e37

267. Furukawa, N., Shirotani, T., Araki, E., Kaneko, K., Todaka, M., Matsumoto, K., Tsuruzoe, K., Motoshima, H., Yoshizato, K., Kishikawa, H., and Shichiri, M. (1999) Possible involvement of atypical protein kinase C (PKC) in glucose-sensitive expression of the human insulin gene: DNA-binding activity and transcriptional activity of pancreatic and duodenal homeobox gene-1 (PDX-1) are enhanced via calphostin C-sensitive but phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and Go 6976-insensitive pathway. *Endocrine journal* **46**, 43-58
268. Kawamori, D., Kajimoto, Y., Kaneto, H., Umayahara, Y., Fujitani, Y., Miyatsuka, T., Watada, H., Leibiger, I. B., Yamasaki, Y., and Hori, M. (2003) Oxidative stress induces nucleo-cytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor PDX-1 through activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Diabetes* **52**, 2896-2904
269. Flotho, A., and Melchior, F. (2013) Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem* **82**, 357-385
270. McClain, D. A., and Crook, E. D. (1996) Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* **45**, 1003-1009
271. Comer, F. I., and Hart, G. W. (2000) O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J Biol Chem* **275**, 29179-29182
272. Konrad, R. J., Janowski, K. M., and Kudlow, J. E. (2000) Glucose and streptozotocin stimulate p135 O-glycosylation in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* **267**, 26-32
273. Kebede, M., Ferdaoussi, M., Mancini, A., Alquier, T., Kulkarni, R. N., Walker, M. D., and Poitout, V. (2012) Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2376-2381
274. Amyot, J., Semache, M., Ferdaoussi, M., Fontes, G., and Poitout, V. (2012) Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF-kappaB signalling. *PLoS One* **7**, e36200
275. Liu, A., Desai, B. M., and Stoffers, D. A. (2004) Identification of PCIF1, a POZ domain protein that inhibits PDX-1 (MODY4) transcriptional activity. *Mol Cell Biol* **24**, 4372-4383
276. Liu, A., Oliver-Krasinski, J., and Stoffers, D. A. (2006) Two conserved domains in PCIF1 mediate interaction with pancreatic transcription factor PDX-1. *FEBS Lett* **580**, 6701-6706
277. Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J. L., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P. E., Tyers, M., Bowerman, B., and Peter, M. (2003) The

- BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* **425**, 311-316
278. Krek, W. (2003) BTB proteins as henchmen of Cul3-based ubiquitin ligases. *Nature cell biology* **5**, 950-951
279. Claiborn, K. C., Sachdeva, M. M., Cannon, C. E., Groff, D. N., Singer, J. D., and Stoffers, D. A. (2010) Pcif1 modulates Pdx1 protein stability and pancreatic beta cell function and survival in mice. *J Clin Invest* **120**, 3713-3721
280. Ryu, G. R., Yoo, J. M., Lee, E., Ko, S. H., Ahn, Y. B., and Song, K. H. (2011) Decreased Expression and Induced Nucleocytoplasmic Translocation of Pancreatic and Duodenal Homeobox 1 in INS-1 Cells Exposed to High Glucose and Palmitate. *Diabetes & metabolism journal* **35**, 65-71
281. Guillemain, G., Da Silva Xavier, G., Rafiq, I., Leturque, A., and Rutter, G. A. (2004) Importin beta1 mediates the glucose-stimulated nuclear import of pancreatic and duodenal homeobox-1 in pancreatic islet beta-cells (MIN6). *Biochem J* **378**, 219-227
282. Ardestani, A., Sauter, N. S., Paroni, F., Dharmadhikari, G., Cho, J. H., Lupi, R., Marchetti, P., Oberholzer, J., Conte, J. K., and Maedler, K. (2011) Neutralizing interleukin-1beta (IL-1beta) induces beta-cell survival by maintaining PDX1 protein nuclear localization. *J Biol Chem* **286**, 17144-17155
283. Yan, L., Guo, S., Brault, M., Harmon, J., Robertson, R. P., Hamid, R., Stein, R., and Yang, E. The B55alpha-containing PP2A holoenzyme dephosphorylates FOXO1 in islet beta-cells under oxidative stress. *Biochem J* **444**, 239-247
284. Kawamori, D., Kaneto, H., Nakatani, Y., Matsuoka, T. A., Matsuhisa, M., Hori, M., and Yamasaki, Y. (2006) The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation. *J Biol Chem* **281**, 1091-1098
285. Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Matsuoka, T., Fujitani, Y., Umayahara, Y., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Yamasaki, Y., and Hori, M. (1999) Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* **48**, 2398-2406
286. Eurich, D. T., Majumdar, S. R., McAlister, F. A., Tsuyuki, R. T., and Johnson, J. A. (2005) Improved clinical outcomes associated with metformin in patients with diabetes and heart failure. *Diabetes Care* **28**, 2345-2351
287. Fryer, L. G., and Carling, D. (2005) AMP-activated protein kinase and the metabolic syndrome. *Biochem Soc Trans* **33**, 362-366
288. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 596-603

289. Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A., and Hudson, E. R. (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS letters* **546**, 113-120
290. Hardie, D. G., Carling, D., and Carlson, M. (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annual review of biochemistry* **67**, 821-855
291. Winder, W. W., and Hardie, D. G. (1999) AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *The American journal of physiology* **277**, E1-10
292. Corkey, B. E., Glennon, M. C., Chen, K. S., Deeney, J. T., Matschinsky, F. M., and Prentki, M. (1989) A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry* **264**, 21608-21612
293. Malaisse, W. J., Conget, I., Sener, A., and Rorsman, P. (1994) Insulinotropic action of AICA riboside. II. Secretory, metabolic and cationic aspects. *Diabetes research* **25**, 25-37
294. Louis, N. A., and Witters, L. A. (1992) Glucose regulation of acetyl-CoA carboxylase in hepatoma and islet cells. *The Journal of biological chemistry* **267**, 2287-2293
295. Liang, Y., and Matschinsky, F. M. (1991) Content of CoA-esters in perfused rat islets stimulated by glucose and other fuels. *Diabetes* **40**, 327-333
296. Kim, W. H., Lee, J. W., Suh, Y. H., Lee, H. J., Lee, S. H., Oh, Y. K., Gao, B., and Jung, M. H. (2007) AICAR potentiates ROS production induced by chronic high glucose: roles of AMPK in pancreatic beta-cell apoptosis. *Cellular signalling* **19**, 791-805
297. Riboulet-Chavey, A., Diraison, F., Siew, L. K., Wong, F. S., and Rutter, G. A. (2008) Inhibition of AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from cytokine-mediated apoptosis and CD8⁺ T-cell-induced cytotoxicity. *Diabetes* **57**, 415-423
298. Richards, S. K., Parton, L. E., Leclerc, I., Rutter, G. A., and Smith, R. M. (2005) Over-expression of AMP-activated protein kinase impairs pancreatic {beta}-cell function in vivo. *The Journal of endocrinology* **187**, 225-235
299. Leff, T. (2003) AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem Soc Trans* **31**, 224-227
300. Zhang, X., Sun, N., Wang, L., Guo, H., Guan, Q., Cui, B., Tian, L., Gao, L., and Zhao, J. (2009) AMP-activated protein kinase and pancreatic/duodenal homeobox-1 involved in insulin secretion under high leucine exposure in rat insulinoma beta-cells. *Journal of cellular and molecular medicine* **13**, 758-770
301. Guo, H., Sun, S., Zhang, X., Zhang, X. J., Gao, L., and Zhao, J. J. AMPK enhances the expression of pancreatic duodenal homeobox-1 via PPARalpha,

- but not PPAR γ , in rat insulinoma cell line INS-1. *Acta Pharmacol Sin* **31**, 963-969
302. Guertin, D. A., and Sabatini, D. M. (2007) Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell* **12**, 9-22
303. Avruch, J., Hara, K., Lin, Y., Liu, M., Long, X., Ortiz-Vega, S., and Yonezawa, K. (2006) Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* **25**, 6361-6372
304. Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C., and Avruch, J. (1998) Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of biological chemistry* **273**, 14484-14494
305. Chen, J., and Fang, Y. (2002) A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochemical pharmacology* **64**, 1071-1077
306. Krebs, M., Brunmair, B., Brehm, A., Artwohl, M., Szendroedi, J., Nowotny, P., Roth, E., Fornsinn, C., Promintzer, M., Anderwald, C., Bischof, M., and Roden, M. (2007) The Mammalian target of rapamycin pathway regulates nutrient-sensitive glucose uptake in man. *Diabetes* **56**, 1600-1607
307. Khamzina, L., Veilleux, A., Bergeron, S., and Marette, A. (2005) Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* **146**, 1473-1481
308. Watanabe, A., Miyashima, H., Kobashi, T., and Take, K. (2004) CT findings of bilateral congenital absence of the long process of the incus. *Neuroradiology* **46**, 859-861
309. Hao, H. X., Cardon, C. M., Swiatek, W., Cooksey, R. C., Smith, T. L., Wilde, J., Boudina, S., Abel, E. D., McClain, D. A., and Rutter, J. (2007) PAS kinase is required for normal cellular energy balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15466-15471
310. Hao, H. X., and Rutter, J. (2008) The role of PAS kinase in regulating energy metabolism. *IUBMB Life* **60**, 204-209
311. Kikani, C. K., Antonysamy, S. A., Bonanno, J. B., Romero, R., Zhang, F. F., Russell, M., Gheyi, T., Iizuka, M., Emtage, S., Sauder, J. M., Turk, B. E., Burley, S. K., and Rutter, J. (2010) Structural bases of PAS domain-regulated kinase (PASK) activation in the absence of activation loop phosphorylation. *J Biol Chem* **285**, 41034-41043
312. Hurtado-Carneiro, V., Roncero, I., Blazquez, E., Alvarez, E., and Sanz, C. (2013) PAS Kinase as a Nutrient Sensor in Neuroblastoma and Hypothalamic Cells Required for the Normal Expression and Activity of Other Cellular Nutrient and Energy Sensors. *Molecular neurobiology* **48**, 904-920

313. Kitanishi, K., Igarashi, J., Hayasaka, K., Hikage, N., Saiful, I., Yamauchi, S., Uchida, T., Ishimori, K., and Shimizu, T. (2008) Heme-binding characteristics of the isolated PAS-A domain of mouse Per2, a transcriptional regulatory factor associated with circadian rhythms. *Biochemistry* **47**, 6157-6168
314. Stephenson, K., and Hoch, J. A. (2001) PAS-A domain of phosphorelay sensor kinase A: a catalytic ATP-binding domain involved in the initiation of development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15251-15256
315. Soshilov, A., and Denison, M. S. (2008) Role of the Per/Arnt/Sim domains in ligand-dependent transformation of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* **283**, 32995-33005
316. Monson, E. K., Ditta, G. S., and Helinski, D. R. (1995) The oxygen sensor protein, FixL, of *Rhizobium meliloti*. Role of histidine residues in heme binding, phosphorylation, and signal transduction. *J Biol Chem* **270**, 5243-5250
317. Amezcua, C. A., Harper, S. M., Rutter, J., and Gardner, K. H. (2002) Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation. *Structure* **10**, 1349-1361
318. Hofer, T., Spielmann, P., Stengel, P., Stier, B., Katschinski, D. M., Desbaillets, I., Gassmann, M., and Wenger, R. H. (2001) Mammalian PASKIN, a PAS-serine/threonine kinase related to bacterial oxygen sensors. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 757-764
319. Rutter, J., Michnoff, C. H., Harper, S. M., Gardner, K. H., and McKnight, S. L. (2001) PAS kinase: an evolutionarily conserved PAS domain-regulated serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8991-8996
320. Schlafli, P., Borter, E., Spielmann, P., and Wenger, R. H. (2009) The PAS-domain kinase PASKIN: a new sensor in energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci* **66**, 876-883
321. Lowrey, P. L., and Takahashi, J. S. (2000) Genetics of the mammalian circadian system: Photic entrainment, circadian pacemaker mechanisms, and posttranslational regulation. *Annu Rev Genet* **34**, 533-562
322. Mimura, J., and Fujii-Kuriyama, Y. (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* **1619**, 263-268
323. Chen, H., Chrast, R., Rossier, C., Gos, A., Antonarakis, S. E., Kudoh, J., Yamaki, A., Shindoh, N., Maeda, H., Minoshima, S., and et al. (1995) Single-minded and Down syndrome? *Nat Genet* **10**, 9-10
324. Johnson, L. N., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149-158
325. Cardon, C. M., and Rutter, J. (2012) PAS kinase: Integrating nutrient sensing with nutrient partitioning. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 626-630

326. Rutter, J., Probst, B. L., and McKnight, S. L. (2002) Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. *Cell* **111**, 17-28
327. Smith, T. L., and Rutter, J. (2007) Regulation of glucose partitioning by PAS kinase and Ugp1 phosphorylation. *Mol Cell* **26**, 491-499
328. Grose, J. H., Smith, T. L., Sabic, H., and Rutter, J. (2007) Yeast PAS kinase coordinates glucose partitioning in response to metabolic and cell integrity signaling. *EMBO J* **26**, 4824-4830
329. Grose, J. H., Sundwall, E., and Rutter, J. (2009) Regulation and function of yeast PAS kinase: a role in the maintenance of cellular integrity. *Cell Cycle* **8**, 1824-1832
330. Wilson, W. A., Skurat, A. V., Probst, B., de Paoli-Roach, A., Roach, P. J., and Rutter, J. (2005) Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16596-16601
331. Katschinski, D. M., Marti, H. H., Wagner, K. F., Shibata, J., Eckhardt, K., Martin, F., Depping, R., Paasch, U., Gassmann, M., Ledermann, B., Desbaillets, I., and Wenger, R. H. (2003) Targeted disruption of the mouse PAS domain serine/threonine kinase PASKIN. *Mol Cell Biol* **23**, 6780-6789
332. Borter, E., Niessen, M., Zuellig, R., Spinaz, G. A., Spielmann, P., Camenisch, G., and Wenger, R. H. (2007) Glucose-stimulated insulin production in mice deficient for the PAS kinase PASKIN. *Diabetes* **56**, 113-117
333. da Silva Xavier, G., Farhan, H., Kim, H., Caxaria, S., Johnson, P., Hughes, S., Bugliani, M., Marselli, L., Marchetti, P., Birzele, F., Sun, G., Scharfmann, R., Rutter, J., Siniakowicz, K., Weir, G., Parker, H., Reimann, F., Gribble, F. M., and Rutter, G. A. (2011) Per-arnt-sim (PAS) domain-containing protein kinase is downregulated in human islets in type 2 diabetes and regulates glucagon secretion. *Diabetologia* **54**, 819-827
334. Semplici, F., Vaxillaire, M., Fogarty, S., Semache, M., Bonnefond, A., Fontes, G., Philippe, J., Meur, G., Diraison, F., Sessions, R. B., Rutter, J., Poitout, V., Froguel, P., and Rutter, G. A. (2011) Human mutation within Per-Arnt-Sim (PAS) domain-containing protein kinase (PASK) causes basal insulin hypersecretion. *J Biol Chem* **286**, 44005-44014
335. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**, 153-183
336. Peti, W., and Page, R. (2013) Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Sci*
337. Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M. H. (2001) MAP kinases. *Chem Rev* **101**, 2449-2476
338. Frodin, M., Sekine, N., Roche, E., Filloux, C., Prentki, M., Wollheim, C. B., and Van Obberghen, E. (1995) Glucose, other secretagogues, and nerve

- growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J Biol Chem* **270**, 7882-7889
339. Lawrence, M., Shao, C., Duan, L., McGlynn, K., and Cobb, M. H. (2008) The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 11-17
 340. Benkhelifa, S., Provot, S., Nabais, E., Eychene, A., Calothy, G., and Felder-Schmittbuhl, M. P. (2001) Phosphorylation of MafA is essential for its transcriptional and biological properties. *Mol Cell Biol* **21**, 4441-4452
 341. Petersen, H. V., Jensen, J. N., Stein, R., and Serup, P. (2002) Glucose induced MAPK signalling influences NeuroD1-mediated activation and nuclear localization. *FEBS Lett* **528**, 241-245
 342. Zhou, J., Pineyro, M. A., Wang, X., Doyle, M. E., and Egan, J. M. (2002) Exendin-4 differentiation of a human pancreatic duct cell line into endocrine cells: involvement of PDX-1 and HNF3beta transcription factors. *J Cell Physiol* **192**, 304-314
 343. Longuet, C., Broca, C., Costes, S., Hani, E. H., Bataille, D., and Dalle, S. (2005) Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology* **146**, 643-654
 344. Costes, S., Broca, C., Bertrand, G., Lajoix, A. D., Bataille, D., Bockaert, J., and Dalle, S. (2006) ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* **55**, 2220-2230
 345. Rayasam, G. V., Tulasi, V. K., Sodhi, R., Davis, J. A., and Ray, A. (2009) Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *British journal of pharmacology* **156**, 885-898
 346. Cohen, P., and Goedert, M. (2004) GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nature reviews. Drug discovery* **3**, 479-487
 347. Doble, B. W., and Woodgett, J. R. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* **116**, 1175-1186
 348. Meijer, L., Flajolet, M., and Greengard, P. (2004) Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends in pharmacological sciences* **25**, 471-480
 349. Embi, N., Rylatt, D. B., and Cohen, P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* **107**, 519-527
 350. Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B. A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789
 351. Mussmann, R., Geese, M., Harder, F., Kegel, S., Andag, U., Lomow, A., Burk, U., Onichtchouk, D., Dohrmann, C., and Austen, M. (2007) Inhibition

- of GSK3 promotes replication and survival of pancreatic beta cells. *J Biol Chem* **282**, 12030-12037
352. Kozma, S. C., and Thomas, G. (2002) Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **24**, 65-71
353. Stocker, H., and Hafen, E. (2000) Genetic control of cell size. *Current opinion in genetics & development* **10**, 529-535
354. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101
355. Wrede, C. E., Dickson, L. M., Lingohr, M. K., Briaud, I., and Rhodes, C. J. (2002) Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* **277**, 49676-49684
356. Briaud, I., Dickson, L. M., Lingohr, M. K., McCuaig, J. F., Lawrence, J. C., and Rhodes, C. J. (2005) Insulin receptor substrate-2 proteasomal degradation mediated by a mammalian target of rapamycin (mTOR)-induced negative feedback down-regulates protein kinase B-mediated signaling pathway in beta-cells. *J Biol Chem* **280**, 2282-2293
357. Cousin, S. P., Hugl, S. R., Wrede, C. E., Kajio, H., Myers, M. G., Jr., and Rhodes, C. J. (2001) Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Endocrinology* **142**, 229-240
358. Dickson, L. M., Lingohr, M. K., McCuaig, J., Hugl, S. R., Snow, L., Kahn, B. B., Myers, M. G., Jr., and Rhodes, C. J. (2001) Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* **276**, 21110-21120
359. Martinez, S. C., Cras-Meneur, C., Bernal-Mizrachi, E., and Permutt, M. A. (2006) Glucose regulates Foxo1 through insulin receptor signaling in the pancreatic islet beta-cell. *Diabetes* **55**, 1581-1591
360. Martinez, S. C., Tanabe, K., Cras-Meneur, C., Abumrad, N. A., Bernal-Mizrachi, E., and Permutt, M. A. (2008) Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Diabetes* **57**, 846-859
361. Karaskov, E., Scott, C., Zhang, L., Teodoro, T., Ravazzola, M., and Volchuk, A. (2006) Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* **147**, 3398-3407
362. Higa, M., Shimabukuro, M., Shimajiri, Y., Takasu, N., Shinjyo, T., and Inaba, T. (2006) Protein kinase B/Akt signalling is required for palmitate-induced beta-cell lipotoxicity. *Diabetes Obes Metab* **8**, 228-233

363. Poitout, V., Amyot, J., Semache, M., Zarrouki, B., Hagman, D., and Fontes, G. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta* **1801**, 289-298
364. Leung, N., Sakaue, T., Carpentier, A., Uffelmann, K., Giacca, A., and Lewis, G. F. (2004) Prolonged increase of plasma non-esterified fatty acids fully abolishes the stimulatory effect of 24 hours of moderate hyperglycaemia on insulin sensitivity and pancreatic beta-cell function in obese men. *Diabetologia* **47**, 204-213
365. Moore, P. C., Ugas, M. A., Hagman, D. K., Parazzoli, S. D., and Poitout, V. (2004) Evidence against the involvement of oxidative stress in fatty acid inhibition of insulin secretion. *Diabetes* **53**, 2610-2616
366. Shimabukuro, M., Higa, M., Zhou, Y. T., Wang, M. Y., Newgard, C. B., and Unger, R. H. (1998) Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J Biol Chem* **273**, 32487-32490
367. Holland, A. M., Hale, M. A., Kagami, H., Hammer, R. E., and MacDonald, R. J. (2002) Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12236-12241
368. Thomas, M. K., Devon, O. N., Lee, J. H., Peter, A., Schlosser, D. A., Tenser, M. S., and Habener, J. F. (2001) Development of diabetes mellitus in aging transgenic mice following suppression of pancreatic homeoprotein IDX-1. *J Clin Invest* **108**, 319-329
369. Stanojevic, V., Habener, J. F., and Thomas, M. K. (2004) Pancreas duodenum homeobox-1 transcriptional activation requires interactions with p300. *Endocrinology* **145**, 2918-2928
370. Guo, S., Dai, C., Guo, M., Taylor, B., Harmon, J. S., Sander, M., Robertson, R. P., Powers, A. C., and Stein, R. (2013) Inactivation of specific beta cell transcription factors in type 2 diabetes. *J Clin Invest*
371. Reimer, M. K., and Ahren, B. (2002) Altered beta-cell distribution of pdx-1 and GLUT-2 after a short-term challenge with a high-fat diet in C57BL/6J mice. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S138-143
372. Guo, J., Zhu, J. X., Deng, X. H., Hu, X. H., Zhao, J., Sun, Y. J., and Han, X. Palmitate-induced inhibition of insulin gene expression in rat islet beta-cells involves the ceramide transport protein. *Cell Physiol Biochem* **26**, 717-728
373. Wang, Z., and Thurmond, D. C. (2009) Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci* **122**, 893-903
374. Wicksteed, B., Alarcon, C., Briaud, I., Lingohr, M. K., and Rhodes, C. J. (2003) Glucose-induced translational control of proinsulin biosynthesis is proportional to preproinsulin mRNA levels in islet beta-cells but not regulated via a positive feedback of secreted insulin. *J Biol Chem* **278**, 42080-42090

375. Itoh, N., and Okamoto, H. (1980) Translational control of proinsulin synthesis by glucose. *Nature* **283**, 100-102
376. Kaelin, D., Renold, A. E., and Sharp, G. W. (1978) Glucose stimulated proinsulin biosynthesis rates of turn off after cessation of the stimulus. *Diabetologia* **14**, 329-335
377. Welsh, M., Scherberg, N., Gilmore, R., and Steiner, D. F. (1986) Translational control of insulin biosynthesis. Evidence for regulation of elongation, initiation and signal-recognition-particle-mediated translational arrest by glucose. *Biochem J* **235**, 459-467
378. Guest, P. C., Rhodes, C. J., and Hutton, J. C. (1989) Regulation of the biosynthesis of insulin-secretory-granule proteins. Co-ordinate translational control is exerted on some, but not all, granule matrix constituents. *The Biochemical journal* **257**, 431-437
379. Alarcon, C., Lincoln, B., and Rhodes, C. J. (1993) The biosynthesis of the subtilisin-related proprotein convertase PC3, but not that of the PC2 convertase, is regulated by glucose in parallel to proinsulin biosynthesis in rat pancreatic islets. *The Journal of biological chemistry* **268**, 4276-4280
380. Giddings, S. J., Chirgwin, J., and Permutt, M. A. (1982) Effects of glucose on proinsulin messenger RNA in rats in vivo. *Diabetes* **31**, 624-629
381. Giddings, S. J., Chirgwin, J., and Permutt, M. A. (1981) The effects of fasting and feeding on preproinsulin messenger RNA in rats. *J Clin Invest* **67**, 952-960
382. Brunstedt, J., and Chan, S. J. (1982) Direct effect of glucose on the preproinsulin mRNA level in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* **106**, 1383-1389
383. Evans-Molina, C., Garmey, J. C., Ketchum, R., Brayman, K. L., Deng, S., and Mirmira, R. G. (2007) Glucose regulation of insulin gene transcription and pre-mRNA processing in human islets. *Diabetes* **56**, 827-835
384. Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development* **13**, 2905-2927
385. Dickson, L. M., and Rhodes, C. J. (2004) Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **287**, E192-198
386. Watson, M. L., Macrae, K., Marley, A. E., and Hundal, H. S. (2011) Chronic effects of palmitate overload on nutrient-induced insulin secretion and autocrine signalling in pancreatic MIN6 beta cells. *PloS one* **6**, e25975
387. Rumi-Masante, J., Rusinga, F. I., Lester, T. E., Dunlap, T. B., Williams, T. D., Dunker, A. K., Weis, D. D., and Creamer, T. P. (2012) Structural basis for activation of calcineurin by calmodulin. *Journal of molecular biology* **415**, 307-317

388. Volmat, V., and Pouyssegur, J. (2001) Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **93**, 71-79
389. Benes, C., Roisin, M. P., Van Tan, H., Creuzet, C., Miyazaki, J., and Fagard, R. (1998) Rapid activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in response to physiological concentration of glucose in the MIN6 pancreatic beta cell line. *The Journal of biological chemistry* **273**, 15507-15513
390. Maedler, K., Storling, J., Sturis, J., Zuellig, R. A., Spinas, G. A., Arkhammar, P. O., Mandrup-Poulsen, T., and Donath, M. Y. (2004) Glucose- and interleukin-1beta-induced beta-cell apoptosis requires Ca²⁺ influx and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and is prevented by a sulfonylurea receptor 1/inwardly rectifying K⁺ channel 6.2 (SUR/Kir6.2) selective potassium channel opener in human islets. *Diabetes* **53**, 1706-1713
391. Giltiay, N. V., Karakashian, A. A., Alimov, A. P., Ligthle, S., and Nikolova-Karakashian, M. N. (2005) Ceramide- and ERK-dependent pathway for the activation of CCAAT/enhancer binding protein by interleukin-1beta in hepatocytes. *Journal of lipid research* **46**, 2497-2505
392. Pu, J., Peng, G., Li, L., Na, H., Liu, Y., and Liu, P. (2011) Palmitic acid acutely stimulates glucose uptake via activation of Akt and ERK1/2 in skeletal muscle cells. *Journal of lipid research* **52**, 1319-1327
393. Wei, C. D., Li, Y., Zheng, H. Y., Tong, Y. Q., and Dai, W. (2013) Palmitate induces H9c2 cell apoptosis by increasing reactive oxygen species generation and activation of the ERK1/2 signaling pathway. *Molecular medicine reports* **7**, 855-861
394. Piro, S., Maniscalchi, E. T., Monello, A., Pandini, G., Mascali, L. G., Rabuazzo, A. M., and Purrello, F. (2010) Palmitate affects insulin receptor phosphorylation and intracellular insulin signal in a pancreatic alpha-cell line. *Endocrinology* **151**, 4197-4206
395. Graciano, M. F., Nogueira, T. C., Carvalho, C. R., Curi, R., and Carpinelli, A. R. (2009) Palmitate activates insulin signaling pathway in pancreatic rat islets. *Pancreas* **38**, 578-584
396. Lawrence, M. C., McGlynn, K., Shao, C., Duan, L., Naziruddin, B., Levy, M. F., and Cobb, M. H. (2008) Chromatin-bound mitogen-activated protein kinases transmit dynamic signals in transcription complexes in beta-cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 13315-13320
397. Levenson, J. M., O'Riordan, K. J., Brown, K. D., Trinh, M. A., Molfese, D. L., and Sweatt, J. D. (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry* **279**, 40545-40559

398. Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R., Rampersaud, N., Dyson, M. H., Hazzalin, C. A., Mahadevan, L. C., and Arthur, J. S. (2003) MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *The EMBO journal* **22**, 2788-2797
399. Khoo, S., and Cobb, M. H. (1997) Activation of mitogen-activating protein kinase by glucose is not required for insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 5599-5604
400. Yamauchi, K., Holt, K., and Pessin, J. E. (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase functions upstream of Ras and Raf in mediating insulin stimulation of c-fos transcription. *The Journal of biological chemistry* **268**, 14597-14600
401. Carel, K., Kummer, J. L., Schubert, C., Leitner, W., Heidenreich, K. A., and Draznin, B. (1996) Insulin stimulates mitogen-activated protein kinase by a Ras-independent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **271**, 30625-30630
402. Jhun, B. H., Haruta, T., Meinkoth, J. L., Leitner, W., Draznin, B., Saltiel, A. R., Pang, L., Sasaoka, T., and Olefsky, J. M. (1995) Signal transduction pathways leading to insulin-induced early gene induction. *Biochemistry* **34**, 7996-8004
403. Suga, J., Yoshimasa, Y., Yamada, K., Yamamoto, Y., Inoue, G., Okamoto, M., Hayashi, T., Shigemoto, M., Kosaki, A., Kuzuya, H., and Nakao, K. (1997) Differential activation of mitogen-activated protein kinase by insulin and epidermal growth factor in 3T3-L1 adipocytes: a possible involvement of PI3-kinase in the activation of the MAP kinase by insulin. *Diabetes* **46**, 735-741
404. Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., and Saltiel, A. R. (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **270**, 27489-27494
405. Keeton, A. B., Bortoff, K. D., Franklin, J. L., and Messina, J. L. (2005) Blockade of rapid versus prolonged extracellularly regulated kinase 1/2 activation has differential effects on insulin-induced gene expression. *Endocrinology* **146**, 2716-2725
406. Lawrence, M. C., Bhatt, H. S., and Easom, R. A. (2002) NFAT regulates insulin gene promoter activity in response to synergistic pathways induced by glucose and glucagon-like peptide-1. *Diabetes* **51**, 691-698
407. Hanlon, M., Sturgill, T. W., and Sealy, L. (2001) ERK2- and p90(Rsk2)-dependent pathways regulate the CCAAT/enhancer-binding protein-beta interaction with serum response factor. *J Biol Chem* **276**, 38449-38456
408. Piwien Pilipuk, G., Galigniana, M. D., and Schwartz, J. (2003) Subnuclear localization of C/EBP beta is regulated by growth hormone and dependent on MAPK. *The Journal of biological chemistry* **278**, 35668-35677

409. Marshak, S., Ben-Shushan, E., Shoshkes, M., Havin, L., Cerasi, E., and Melloul, D. (2001) Regulatory elements involved in human pdx-1 gene expression. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S37-38
410. Sii-Felice, K., Pouponnot, C., Gillet, S., Lecoin, L., Girault, J. A., Eychene, A., and Felder-Schmittbuhl, M. P. (2005) MafA transcription factor is phosphorylated by p38 MAP kinase. *FEBS Lett* **579**, 3547-3554
411. Ochi, H., Ogino, H., Kageyama, Y., and Yasuda, K. (2003) The stability of the lens-specific Maf protein is regulated by fibroblast growth factor (FGF)/ERK signaling in lens fiber differentiation. *J Biol Chem* **278**, 537-544
412. Han, S. I., Aramata, S., Yasuda, K., and Kataoka, K. (2007) MafA stability in pancreatic beta cells is regulated by glucose and is dependent on its constitutive phosphorylation at multiple sites by glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* **27**, 6593-6605
413. Seufert, J., Weir, G. C., and Habener, J. F. (1998) Differential expression of the insulin gene transcriptional repressor CCAAT/enhancer-binding protein beta and transactivator islet duodenum homeobox-1 in rat pancreatic beta cells during the development of diabetes mellitus. *J Clin Invest* **101**, 2528-2539
414. Rutter, C., and Weissman, D. E. (2004) Radiation for palliation--part 2. *J Palliat Med* **7**, 866-867
415. Rutter, J. (2002) Essay: Amersham Biosciences and Science Prize. PAS domains and metabolic status signaling. *Science* **298**, 1567-1568
416. Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & development* **12**, 3499-3511
417. Yost, C., Torres, M., Miller, J. R., Huang, E., Kimelman, D., and Moon, R. T. (1996) The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes & development* **10**, 1443-1454
418. Skelin, M., Rupnik, M., and Cencic, A. (2010) Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *Altex* **27**, 105-113
419. Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., and Yamamura, K. (1990) Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* **127**, 126-132
420. Ishihara, H., Asano, T., Tsukuda, K., Katagiri, H., Inukai, K., Anai, M., Kikuchi, M., Yazaki, Y., Miyazaki, J. I., and Oka, Y. (1993) Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* **36**, 1139-1145

421. Hauge-Evans, A. C., Squires, P. E., Persaud, S. J., and Jones, P. M. (1999) Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced Ca²⁺ and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. *Diabetes* **48**, 1402-1408
422. Luther, M. J., Davies, E., Muller, D., Harrison, M., Bone, A. J., Persaud, S. J., and Jones, P. M. (2005) Cell-to-cell contact influences proliferative marker expression and apoptosis in MIN6 cells grown in islet-like structures. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **288**, E502-509
423. Santerre, R. F., Cook, R. A., Crisel, R. M., Sharp, J. D., Schmidt, R. J., Williams, D. C., and Wilson, C. P. (1981) Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 4339-4343
424. Zhang, H. J., Petersen, B., and Robertson, R. P. (1994) Variable regulation by insulin of insulin gene expression in HIT-T15 cells. *Diabetologia* **37**, 559-566
425. Weir, G. C., Halban, P. A., Meda, P., Wollheim, C. B., Orci, L., and Renold, A. E. (1984) Dispersed adult rat pancreatic islet cells in culture: A, B, and D cell function. *Metabolism: clinical and experimental* **33**, 447-453
426. Mattaj, I. W., and Englmeier, L. (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annual review of biochemistry* **67**, 265-306
427. Lin, C. F., Chen, C. L., Chiang, C. W., Jan, M. S., Huang, W. C., and Lin, Y. S. (2007) GSK-3beta acts downstream of PP2A and the PI 3-kinase-Akt pathway, and upstream of caspase-2 in ceramide-induced mitochondrial apoptosis. *J Cell Sci* **120**, 2935-2943
428. Busch, A. K., Cordery, D., Denyer, G. S., and Biden, T. J. (2002) Expression profiling of palmitate- and oleate-regulated genes provides novel insights into the effects of chronic lipid exposure on pancreatic beta-cell function. *Diabetes* **51**, 977-987
429. Vives-Pi, M., Somoza, N., Fernandez-Alvarez, J., Vargas, F., Caro, P., Alba, A., Gomis, R., Labeta, M. O., and Pujol-Borrell, R. (2003) Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin Exp Immunol* **133**, 208-218
430. Vives-Pi, M., Somoza, N., Fernandez-Alvarez, J., Vargas, F., Caro, P., Alba, A., Gomis, R., Labeta, M. O., and Pujol-Borrell, R. (2003) Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells *Clin Exp Immunol* **133**, 208-218

431. Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, Nuss JM, Goff D, Kinnick TR, Ma ST, Reeder JW, Samuels I, Slabiak T, Wagman AS, Wernette Hammond, ME and Harrison SD. (2003) Selective Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors Potentiate Insulin Activation of Glucose Transport and Utilization In Vitro and In Vivo *Diabetes* 52 (3) 588-595.
432. [Nikoulina SE](#), [Ciaraldi TP](#), [Mudaliar S](#), [Carter L](#), [Johnson K](#) and [Henry RR](#). (2002) Inhibition of glycogen synthase kinase 3 improves insulin action and glucose metabolism in human skeletal muscle. *Diabetes* **51**(7):2190-8.
433. Dokken BB, Sloniger JA, Henriksen EJ. Acute selective glycogen synthase kinase-3 inhibition enhances insulin signaling in prediabetic insulin-resistant rat skeletal muscle (2005). *Am J Physiol Endocrinol Metab.*;288:E1188–E1194.
434. Phukan S, Babu VS, Kannoji A, Hariharan R, and Balaji VN. (2010). GSK3 β : role in therapeutic landscape and development of modulators. *Br J Pharmacol.* 160(1): 1–19.
435. Zhang J1, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. (2008) S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *J Biol Chem.* **19**;283(51):35375-82.
436. Servier Medical Art. <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.
437. Cartailier JP. (2005) Insulin - from secretion to action. Beta Cell Biology Consortium.
438. Turner N. (2013) Mitochondrial Metabolism and Insulin Action, Type 2 Diabetes, Prof. Kazuko Masuo (Ed.). ISBN: 978-953-51-1171-9.

ANNEXE I

Article 4 La glucolipotoxicité dans la cellule bêta pancréatique.

Note : Cet article a pour objectif de compléter l'introduction de la thèse pour une revue plus approfondie sur le principe de glucolipotoxicité dans la cellule bêta pancréatique. Il ne sera donc pas présenté lors de la soutenance.

Titre: Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell.

Auteurs: Vincent Poitout, Julie Amyot, Meriem Semache, Bader Zarrouki, Derek K. Hagman et Ghislaine Fontés.

Article publié dans Biochimica et Biophysica Acta, 2010.

Contribution des auteurs:

Vincent Poitout: Directeur de thèse. A rédigé tout le manuscrit.

Julie Amyot: Coauteure. A participé à l'élaboration des hypothèses et à l'interprétation des résultats.

Meriem Semache: Coauteure. A participé à l'élaboration des hypothèses et à l'interprétation des résultats.

Bader Zarrouki: Coauteur. A participé à l'élaboration des hypothèses et à l'interprétation des résultats.

Derek K. Hagman: Coauteur. A participé à l'élaboration des hypothèses et à l'interprétation des résultats.

Ghislaine Fontés: Coauteure. A participé à l'élaboration des hypothèses et à l'interprétation des résultats.

Glucolipotoxicity of the Pancreatic Beta Cell

**Vincent Poitout^{a,b}, Julie Amyot^b, Meriem Semache^b, Bader Zarrouki^a,
Derek Hagman^a and Ghislaine Fontés^a**

Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, and Departments of
Medicine^a and Biochemistry^b, University of Montreal, Montreal, QC, Canada.

Keywords: Fatty acids, Glucose, Islet of Langerhans, Diabetes, Insulin

Summary

The concept of glucolipotoxicity refers to the combined, deleterious effects of elevated glucose and fatty acid levels on pancreatic beta-cell function and survival. Significant progress has been made in recent years towards a better understanding of the cellular and molecular basis of glucolipotoxicity in the beta cell. The permissive effect of elevated glucose on the detrimental actions of fatty acids stems from the influence of glucose on intracellular fatty-acid metabolism, promoting the synthesis of cellular lipids. The combination of excessive levels of fatty acids and glucose therefore leads to decreased insulin secretion, impaired insulin gene expression, and beta-cell death by apoptosis, all of which probably have distinct underlying mechanisms. Recent studies from our laboratory have identified several pathways implicated in fatty-acid inhibition of insulin gene expression, including the extracellular-regulated kinase (ERK1/2) pathway; the metabolic sensor Per-Arnt-Sim kinase (PASK); and the ATF6 branch of the unfolded protein response. We have also confirmed in vivo in rats that the decrease in insulin gene expression is an

early defect which precedes any detectable abnormality in insulin secretion. While the role of glucolipotoxicity in humans is still debated, the inhibitory effects of chronically elevated fatty acid levels has been clearly demonstrated in several studies, at least in individuals genetically predisposed to developing type 2 diabetes. It is therefore likely that glucolipotoxicity contributes to beta-cell failure in type 2 diabetes as well as to the decline in beta-cell function observed after the onset of the disease.

Introduction

Over the last 20 years, the central role of pancreatic beta-cell dysfunction in the development of type 2 diabetes has become increasingly appreciated [1]. It is now generally accepted that when insulin resistance develops in response to environmental cues such as obesity, a subset of genetically predisposed individuals fails to adequately compensate for the increased insulin demand, and beta-cell failure ensues [2]. In addition, longitudinal studies in humans have clearly demonstrated that beta-cell function deteriorates during the years following diagnosis of type 2 diabetes, regardless of the therapeutic regimen [3, 4]. Although the cause of this metabolic deterioration is unknown, several hypotheses have been proposed. Amongst them, chronic hyperglycemia (glucotoxicity [5]), chronic dislipidemia (lipotoxicity [6]), or the combination of both (glucolipotoxicity [7]), have been postulated to contribute to the worsening of beta-cell function over time, creating a vicious cycle by which metabolic abnormalities impair insulin secretion, which further aggravates metabolic perturbations, and so on. While elevated levels of glucose or fatty acids can, by themselves, be demonstrated to have detrimental effects on beta-

cell function in many experimental systems, the combination of both nutrients is synergistically harmful, which has led to the concept of glucolipotoxicity [7, 8]. However, despite years of investigation and significant progress made in the discovery of the underlying molecular and cellular mechanisms of glucolipotoxicity, its contribution to beta-cell failure in type 2 diabetes remains debated. We speculate that this uncertainty stems from several reasons. First, by nature of their long-term design, experiments to test cause-and-effect relationships between chronic metabolic perturbations and functional outcomes are plagued with confounding variables, and therefore difficult to interpret. Second, the inherent limitations of *in vivo* models have prompted the development of many *in vitro* systems to test the hypothesis and define its underlying mechanisms. As further discussed in this review, these systems also have important caveats. Third and perhaps most importantly, there is no clear consensus on the definition of the term glucolipotoxicity. While its root (toxicity) implies the presence of cell death, it is often employed more loosely to refer to the functional effects of the combination of high glucose and elevated lipids on the beta cell, for instance on insulin secretion or gene expression. Also, while the concept of glucolipotoxicity implicitly refers to a chronic situation, the notion of chronicity is variable, spanning from a few hours of *ex vivo* cell culture to many years in diabetic patients. This is particularly problematic since fatty acids have a dual and time-dependent effect on beta-cell function, acutely stimulatory but chronically inhibitory. Thus, there are virtually as many definitions of the term glucolipotoxicity as groups studying it, which has created confusion in the field. For the purpose of this article, we propose to define glucolipotoxicity as the combined,

deleterious effects of elevated glucose and fatty acid levels on pancreatic beta-cell function and / or survival. This review focuses on recent developments in the field of glucolipotoxicity from both in vitro and in vivo studies.

Cellular and molecular mechanisms of glucolipotoxicity in the beta cell

Considering the complexity of designing mechanistic studies in vivo to investigate the chronic effects of fuel oversupply, a number of in vitro models, using insulin-secreting cells and isolated islets, have been employed to identify the cellular and molecular basis of glucolipotoxicity. In these systems, prolonged exposure to elevated levels of fatty acids is associated with inhibition of glucose-induced insulin secretion [9-12], impairment of insulin gene expression [13-18], and induction of cell death by apoptosis [19-28]. Importantly, several of these studies have provided evidence that lipotoxicity only occurs in the presence of concomitantly elevated glucose levels [15, 16, 28], an observation also confirmed in vivo [29, 30]. The biochemical basis for this permissive effect of glucose will be discussed first in this section, followed by a review of the mechanisms underlying the functional manifestations of glucolipotoxicity on the beta cell (insulin secretion, insulin gene expression, and cell survival).

Biochemical pathways and lipid intermediates implicated in glucolipotoxicity
The permissive effect of glucose on the deleterious actions of chronic fatty acids stems from its influence on intracellular metabolism of fatty acids [31, 32]. Prentki and Corkey [7] first proposed that glucose determines fatty acid partitioning in pancreatic beta cells (Figure 1). At low glucose concentrations, fatty acids are transported into the mitochondria via the enzyme carnitine-

palmitoyl transferase-1 (CPT-1) for beta-oxidation, which has essentially no functional consequences. In contrast, when both glucose and fatty acid concentrations are elevated, intracellular metabolism of glucose leads to the formation of cataplerotic signals, such as citrate, and the generation of malonyl-CoA in the cytosol. Since fatty-acid synthase activity is lower than that of acetyl-CoA carboxylase in the beta cell [33], the predominant effect of malonyl-CoA is to inhibit CPT-1 activity, which in turn blocks fatty acid oxidation and leads to accumulation of long-chain acyl-CoA esters (LC-CoA) in the cytosol [7]. Accumulation of cytosolic LC-CoA, either directly or via generation of lipid-derived signals, adversely affects beta-cell function [8]. In addition to its metabolic effects directing fatty-acid partitioning into esterification, glucose coordinately activates the expression of genes involved in lipogenesis [34]. A key player in this mechanism is the enzyme AMP-activated protein kinase (AMPK), acting as a metabolic sensor that directs the beta cell into a “storage mode” in the face of nutrient oversupply [35], as it does in myocytes and hepatocytes [36]. Indeed, AMPK activity is inversely correlated with the glucose concentration [37] and is stimulated by palmitate [38] in beta cells. Downstream of AMPK, the transcription factor sterol-regulatory-element-binding-protein-1c (SREBP1c), which regulates the expression of genes controlling fatty acid synthesis [39], translates the metabolic signal sensed by AMPK into changes in gene expression, leading to enhanced lipogenesis. Glucose also increases the expression of liver X receptor (LXR) which then contributes to enhancing SREBP1c expression and lipid synthesis [40].

While it is now generally accepted that fatty acid partitioning towards esterification and cellular lipid synthesis underpins the cellular mechanisms of glucolipotoxicity in pancreatic beta-cells, the nature of the lipid-derived metabolites directly responsible for the deleterious effects of fatty acids is still elusive. It is unlikely that triglyceride accumulation itself might be the culprit, since triglycerides represent a relatively innocuous form of fat storage that can actually protect against lipotoxicity [41]. Studies have shown that monounsaturated fatty acids are less toxic and can actually protect from the detrimental effects of saturated fatty acids because they are more readily esterified into triglycerides [26, 41]. Consistent with this notion is the observation that stearoyl CoA desaturase-1 (SCD1) protects from lipoapoptotic cell death induced by palmitate [42]. In fact, whereas deletion of SCD1 in mice improves insulin sensitivity [43], when introduced on the obese, leptin-deficient *ob/ob* background the SCD1 deletion leads to a worsening of diabetes associated with triglyceride and cholesterol overload in islets [44].

Prentki and colleagues [45, 46] have proposed the elegant concept that increased glycerolipid / fatty acid cycling represents a mean by which the beta cell attempts to protect itself from nutrient oversupply while remaining fuel-responsive so as to be capable of releasing insulin in the face of increased demand. In turn, the unintended consequence of this fuel detoxification mechanism is the generation of harmful intermediates from increased flux through the cycle. The question remains that if triglyceride accumulation is merely a marker of enhanced esterification flux but does not cause glucolipotoxicity by itself, then what are the lipid-derived molecules directly

responsible for the impairment of beta-cell function? The role of intermediates of the esterification pathway (e.g. lysophosphatidic acid, phosphatidic acid, diacylglycerols) has been suggested [2] but, to our knowledge, not formally demonstrated. De novo synthesis of ceramide has been shown to play a role both in fatty acid-induced beta-cell death [47] and fatty acid-inhibition of insulin gene expression [17], but not in the impairment of insulin secretion [48]. These observations illustrate an important point, which may in part explain why the lipid-derived intermediates mediating glucolipotoxicity have remained elusive: the mechanisms underlying the various functional manifestations of glucolipotoxicity are likely distinct. For example, accumulation of ceramide impairs insulin gene expression and, under certain circumstances, induces cell death, without affecting insulin secretion. Therefore, our view is that the full array of functional defects associated with glucolipotoxic conditions is due to the generation of several intracellular metabolites acting on various signaling pathways and cellular functions rather than to a single intermediate.

While most studies investigating the mechanisms of glucolipotoxicity in the beta cell have focused on the esterification pathway and triglyceride synthesis, cholesterol metabolism has recently been shown to also play an important role. Exposure of beta cells to oxidized low-density lipoproteins (LDL) induces apoptosis [49] and decreases insulin gene expression [50], whereas native LDL particles have no effect and high-density lipoproteins (HDL) are protective. Beta-cell specific knock-out (KO) of the ATP-binding cassette transporter subfamily A member 1 (ABCA1), which mediates reverse cholesterol efflux, results in increase cellular cholesterol content and impaired

insulin secretion downstream of glucose metabolism, probably at the level of insulin exocytosis [51]. In addition, the ability of the thiazolidinedione rosiglitazone to improve glucose tolerance in high-fat diet fed mice requires a functional ABCA1 in beta cells [51]. Finally, forcing cholesterol synthesis in beta cells by transgenic overexpression of SREBP2 under the rat insulin promoter results in a severe loss of beta-cell mass and a diabetic phenotype [52]. Since LXR regulates ABCA1 expression [51] and is itself directly regulated by glucose [53], glucose therefore coordinately increases fatty acid esterification and intracellular cholesterol synthesis.

The premise to the hypotheses described above that intermediates generated during triglyceride or cholesterol synthesis are mechanistically involved in glucolipotoxicity is that extracellular fatty acids are first transported across the plasma membrane and act intracellularly. This concept has been challenged by the orphanization of the G-protein coupled receptor GPR40 [54, 55]. GPR40 is specifically expressed in pancreatic beta cells and is activated by long-chain fatty acids, which raises the possibility that some of the functional effects of fatty acids on the beta-cell might be mediated by activation of a cell-surface receptor. Consistent with this possibility, a role for GPR40 in mediating fatty acid-inhibition of insulin secretion has been suggested by the observation that islets from GPR40 KO mice are insensitive to the inhibitory effects of prolonged fatty acids [56]. Using a different line of GPR40 KO mice, we were unable to reproduce these findings and found that deletion of the receptor does not protect islets from fatty acid-inhibition of glucose-induced insulin secretion [57]. In addition, subsequent studies also using whole-body KO found that GPR40 deletion did not protect mice from

high-fat diet-induced glucose intolerance [58, 59]. This conclusion was further supported by the observation that small molecule GPR40 agonists improved glucose tolerance in mice with high-fat diet-induced obesity [60]. Therefore, we do not favor the view that GPR40 plays a major role in the mechanisms of glucolipotoxicity in the beta cell.

Mechanisms underlying the functional manifestations of glucolipotoxicity

Fatty-acid impairment of insulin secretion

Prolonged exposure of beta cells to fatty acids in vitro inhibits glucose-stimulated insulin secretion [9-12], a phenomenon also observed in vivo in rats [61] and humans [62]. In recent years, several potential mechanisms have been investigated, including upregulation of uncoupling protein 2 (UCP2), activation of the novel isoform of protein kinase C PKC ϵ , and late exocytotic events.

UCP2 is a ubiquitously expressed mitochondrial carrier which has been suggested to uncouple the respiratory chain from ATP synthesis [63], although its biological functions are still unclear [64]. Initial evidence suggested that UCP2 might modulate insulin secretion and thereby play a role in glucolipotoxicity. This was based on the observations that increasing UCP2 expression in beta cells impairs insulin secretion [65, 66] and that UCP2 KO animals on a mixed genetic background have increased circulating insulin levels and are protected from diabetes [63, 67]. This contention has been recently challenged by the observation that KO of UCP2 on 3 different congenic backgrounds in the mouse leads to oxidative stress and impaired

insulin secretion [68]. Thus, the increase in UCP2 expression observed in islets after high-fat feeding in rodents [30, 66] or exposure to fatty acids in vitro [69, 70] likely represents a cellular defense mechanism against fuel overload and oxidative stress rather than a deleterious response. Consistent with this possibility is the observation that transgenic overexpression of UCP2 does not alter mitochondrial function or glucose-induced insulin secretion but decreases reactive oxygen species production [71]. Overall, it appears unlikely that an increase in UCP2 expression in response to fatty acids represents a causal mechanism of the impairment of insulin secretion under glucolipotoxic conditions.

Activation of the lipid-regulated isoform PKC ϵ has also been suggested as a possible candidate signaling molecule underlying the decrease in insulin secretion in glucolipotoxicity. Work by the group of Biden has shown that the normalization of glucose tolerance in PKC ϵ KO mice under high-fat feeding was due to improved insulin secretion [72]. Further, they demonstrated that islets isolated from PKC ϵ knock-out mice were protected from the deleterious effects of fatty acids on insulin secretion in vitro, and that inhibition of PKC ϵ was capable of restoring insulin secretion in islets from *db/db* mice [72]. More recently, this group has shown that the improvement in insulin secretion in PKC ϵ knock-out islets in the face of glucolipotoxicity was due to selective restoration of the amplifying pathway of insulin release, probably due to the generation of a lipolytic intermediate [73]. Interestingly, this is consistent with the concept proposed by Prentki and colleagues that lipolysis-generated signals contribute to the regulation of insulin secretion [74] and that, more generally, glycerolipid/fatty acid cycling in the beta cell provides essential

coupling factors for insulin secretion but becomes detrimental under conditions of fuel oversupply [45, 46].

Finally, evidence suggests that fatty acids might alter one or more late steps of insulin exocytosis in beta cells. Kato et al. [75] have shown that expression of granuphilin, an effector of the small GTP-binding protein Rab27a, which plays a key role in the docking of insulin secretory granules to the plasma membrane, is increased in islets exposed to palmitate as a consequence of upregulation of SREBP1c. This in turn inhibits insulin secretion in response to fuel and non-fuel stimuli. In addition, Olofsson et al [76] demonstrated that prolonged exposure of mouse islets to glucose and fatty acids inhibited insulin secretion at a very late stage of exocytosis by interfering with the release of insulin at the fusion pore. These findings suggest that the mechanisms by which fatty acids affect insulin secretion might, at least in part, lie at the level of the exocytotic machinery and, consequently, impair insulin secretion in response not only to glucose but also to other secretagogues.

Fatty-acid impairment of insulin gene expression

We [15-18, 77] and others [13, 14] have shown that prolonged exposure to fatty acids impairs insulin gene expression in the presence of high glucose. The mechanisms whereby fatty acids affect insulin gene expression are distinct from those by which they impair insulin secretion. First, whereas both palmitate and oleate inhibit insulin secretion, only palmitate affects insulin gene expression [48]. This is due to the fact that only palmitate can serve as a substrate for de novo ceramide synthesis [17]. The transcriptional mechanisms by which palmitate inhibits insulin gene expression do not involve changes in insulin mRNA stability but, rather, inhibition of glucose-

induced insulin promoter activity [17]. This is associated with decreased binding activity of the transcription factors pancreas-duodenum homeobox 1 (PDX-1) and MafA [18]. PDX-1 is affected in its ability to translocate to the nucleus, whereas MafA is affected at the level of its expression [18]. This is in contrast to the mechanisms of glucotoxicity, which involve post-translational modifications of MafA [78].

The mechanisms whereby ceramide generation from palmitate impairs PDX-1 subcellular localization and MafA expression are unknown, although recent studies have identified potential candidates. The c-jun NH2-terminal kinase JNK is a known target of ceramide [79] and can repress insulin gene transcription both via c-jun-dependent inhibition of E1-mediated transcription [80, 81] and c-jun independent inhibition of PDX-1 binding [82]. In addition, Solinas et al. [83] have shown that palmitate activates JNK in beta cells and that the resulting phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 at sites that impair insulin signaling decreases insulin gene transcription.

Recent studies in our laboratory have also attempted to identify the signaling mechanisms implicated in palmitate inhibition of insulin gene expression. First, we have shown that palmitate enhances glucose-induced phosphorylation of the extracellular-regulated kinases (ERK) 1/2, and that pharmacological inhibition of ERK1/2 partially restores insulin gene expression in insulin-secreting cells and isolated islets exposed to palmitate or ceramide [84]. Second, we have observed that palmitate blocks the induction of the Per-Arnt-Sim kinase (PASK) [84]. PASK is an evolutionarily conserved serine/threonine protein kinase, containing a PAS domain sensitive to the intracellular environment which regulates the kinase domain to

transduce the signal [85]. In budding yeast, it coordinates sugar storage and protein synthesis with carbohydrate availability [86]. In mammals, it has been demonstrated to be an important regulator of glycogen synthase and cellular energy balance [87]. In pancreatic beta cells, PASK is required for glucose-induced insulin gene transcription [88]. In our recent study [84], we observed that overexpression of PASK prevents the inhibitory effect of palmitate on insulin mRNA and PDX-1 mRNA and protein expression in MIN6 cells. In addition, adenoviral-mediated overexpression of wild-type PASK increased, whereas a kinase dead mutant of PASK acting as a dominant negative decreased, insulin mRNA and PDX-1 protein expression in islets. Interestingly, the PASK pathway appears to be independent from the ERK1/2 pathway and to have no effect on MafA expression in our system, suggesting that at least 3 independent signalling arms contribute to the overall decrease in insulin gene expression [84] (Figure 2). Although our initial study revealed that palmitate mostly affects PDX-1 in its subcellular localization rather than its whole-cell expression levels [18], overexpression of a kinase dead mutant of PASK also reduces PDX-1 mRNA levels. This suggests that reduction of PDX-1 expression might also contribute to decreasing its binding activity under glucolipotoxic conditions. Whether PASK can directly phosphorylate PDX-1 and, thereby, alter its nuclear translocation is unknown and currently under investigation. Recently, expression the CAAT enhancer-binding protein β (C/EBP β), a negative regulator of insulin gene transcription [89] has been shown to increase in beta cells in response to fatty acids [90]. Interestingly, we also observed a marked increase in C/EBP β mRNA levels upon overexpression of the dominant-negative PASK mutant in MIN6 cells

[84]. This raises the possibility that, as demonstrated under glucotoxic conditions [91], C/EBP- β binds to the transcription factor nuclear factor of activated T cells (NFAT) on the insulin promoter and thereby inhibits MafA binding activity.

A role for the unfolded protein response (UPR) and endoplasmic reticulum (ER) stress in beta-cell failure has received considerable attention in the past few years, in part because the beta cell's intense secretory activity makes it particularly susceptible to perturbations of ER homeostasis [92]. As discussed in more details in the next section, markers of ER stress have been shown to be induced by prolonged exposure to fatty acids in several studies [93-101]. In most cases, the strong induction of ER stress markers in response to fatty acids is associated with apoptosis. Under our culture conditions of isolated rat islets in the presence of glucose and palmitate, which are not associated with significant cell death [84, 102], we have not been able to detect any activation of the inositol requiring ER-to-nucleus signal kinase (IRE) or protein kinase R-like ER kinase (PERK) branches of the UPR (unpublished data). In contrast, we have observed cleavage of the transcription factor ATF6 under these conditions. Since ATF6 is a negative regulator of insulin gene transcription [103], these preliminary results led us to hypothesize that an early activation of the ATF6 branch of the unfolded protein response upon exposure to fatty acids might represent a protective mechanism whereby the beta cell attempts to further decrease the load to the ER by inhibiting insulin gene expression. This would occur as part of the unfolded protein response, before overt ER stress and associated apoptosis develops. In later stages of more severe ER stress associated with cell death, it is possible that alterations

in PDX-1 function [96, 104] or insulin mRNA stability [105] also contribute to the decrease in insulin gene expression.

Overall, available data regarding the mechanisms of fatty-acid inhibition of the insulin gene reveal a complex picture which appears to involve several independent pathways that all concur to decrease its expression, which is an early, and possibly protective, response of the beta cell in the face of nutrient oversupply (Figure 2). Importantly, the decrease in insulin gene expression under glucolipotoxic conditions is also observed in vivo ([77]; see section III below).

Fatty acid induction of beta-cell death

Saturated fatty acids can induce beta-cell death by apoptosis in the presence of high glucose [22, 26, 28], whereas unsaturated fatty acids are usually protective [21, 22, 28]. As mentioned above, this difference is likely due to the greater ability of unsaturated fatty acids to form intracellular triglycerides [21, 41, 42]. Several mechanisms have been implicated, including ceramide formation [20, 23, 26, 47], oxidative stress [25, 27, 106, 107], and inflammation [108]. Recently, as mentioned above considerable evidence has been provided in support of a role for the UPR and ER stress in saturated fatty-acid induced cell death ([93-101] and reviewed in [59]). The mechanisms by which saturated fatty acids such as palmitate induce ER stress are thought to involve depletion of ER calcium stores [99, 101] and result in the activation of JNK [99, 100], although JNK activation can, under some conditions, be detected prior to the appearance of ER stress [98]. Interestingly, palmitate was shown to induce a rapid degradation of carboxypeptidase E, which resulted not only in altered proinsulin maturation, but also in ER stress and apoptosis

[109]. The changes in CPE levels were demonstrated to occur prior to the development of any sign of ER stress, and to require palmitate metabolism and calcium influx, although the precise mechanisms by which palmitate initiates CPE degradation remain to be clarified [109]. Of note, however, a study by Lai et al. [110] using insulin-secreting cells and isolated islets provided evidence that palmitate-induced apoptosis can also occur in the absence of detectable ER stress. Finally, markers of ER stress are increased in pancreatic sections of type 2 diabetic patients [111].

These observations raise the question as to whether fatty-acid induced apoptosis in beta cells is primarily mediated by ER stress or the mitochondrial death pathway. Intrinsic defects in mitochondrial function have been well documented under conditions of nutrient overload [112], and perturbations in mitochondrial permeability are observed early in the development of fatty-acid induced cell death in beta cells [113]. Luciani et al. [114] have recently shown that depletion of ER calcium stores under conditions of ER stress can lead secondarily to mitochondrial dysfunction, suggesting that perhaps under glucolipotoxic conditions ER stress is a primary event which leads to triggering of several proapoptotic pathways, including mitochondrial-mediated cell death.

Finally, a recent study by Lovis et al. [115] has shown that increased expression of the microRNAs miR34a and miR146 also contributes directly to palmitate-induced cell death in insulin-secreting cells and isolated islets, and the overall role of microRNAs in glucolipotoxicity will hopefully become clearer as progress towards understanding their implications in beta-cell function continues to be made.

Limitations of in vitro studies of glucolipotoxicity

While in vitro models using insulin-secreting cells and isolated islets have proven extremely valuable in dissecting the cellular and molecular mechanisms of glucolipotoxicity, they also have significant limitations which should be borne in mind when interpreting the results obtained in these systems. First, there appears to be species-related differences in the sensitivity to fatty acid-induced cell death [110]. For instance, whereas a 24-h exposure of human islets to elevated glucose and palmitate is sufficient to observe apoptosis [28], we have not detected any cell death in rat islets after 72h of culture under similar conditions [17, 48, 84]. Second, the concentrations of fatty acids used in vitro vary amongst publications. The key determinant of fatty acid potency is the fraction that is unbound to BSA, which depends on the molar ratio of fatty acids to albumin as well as the mode of preparation. Using a fluorescent probe that specifically measures the unbound fraction of fatty acids [116], we observed that when palmitate at a total concentration of 0.5 mM was pre-complexed to bovine serum albumin with a molar ratio of fatty acid:albumin of 5:1, the unbound concentration is in the range of 200 nM (Figure 3), which represents approximately 3 times the unbound concentration measured in the plasma of lean individuals by the same method [117]. Finally, the concentrations of fatty acids in the vicinity of the beta-cells in vivo are unknown and are probably determined by several different factors, including the activity of lipoprotein lipase, which accounts for some of the local delivery of fatty acids to the cells [118]. In fact, it is likely that lipoprotein lipase activity is an important control point for fatty acid delivery to beta-cells, since both beta-cell specific deletion and overexpression of its

gene in the mouse impairs glucose homeostasis and insulin secretion [119]. Thus, the results of in vitro experiments using fatty acids should be interpreted with caution, particularly when marked cytotoxicity is observed.

In vivo studies

Rodent models of glucolipotoxicity

For the reasons described above, the findings of in vitro studies should be confirmed in vivo before they can be extrapolated to physiological or pathological situations. In this regard, pioneering studies by the group of Unger in the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat were instrumental in establishing the concept of lipotoxicity and identifying some of its basic mechanisms (reviewed in [120]). In particular, these studies first identified the key role for ceramide as an intracellular mediator of glucolipotoxicity. Thus, in this model accumulation of intra-islet ceramide is detected prior to beta-cell dysfunction [121] and inhibition of ceramide synthesis prevents beta-cell death [47]. In more recent studies the beneficial effects of pharmacological inhibition of sphingolipid synthesis on beta-cell function and diabetes progression has been confirmed not only in the ZDF rat but also in other rodent models [122-124]. However, since ceramide is also implicated in the mechanisms of insulin resistance [123], it is difficult in these in vivo studies to distinguish between the effects of the treatment on insulin sensitivity and those on beta-cell function.

Non-genetic models of glucolipotoxicity have been developed and most often use prolonged infusions of Intralipid, a soybean oil emulsion which generates a mixture of mostly unsaturated fatty acids [125] when co-injected with heparin. In these models, the effects of Intralipid or fatty-acid infusion on

beta-cell function have been inconsistent, leading to either unaffected [77], enhanced [126, 127] or reduced [9, 61, 128, 129] insulin secretion. These discrepancies are likely due to differences in strain, sex, age, or infusion rates. For instance, Mason et al. [61] and Goh et al. [128] suggested that female Wistar rats are more susceptible to the deleterious effects of prolonged high fatty acid levels, and Steil et al. [127] have observed that a 96-h Intralipid infusion did not affect insulin secretion in male Sprague-Dawley rats. The influence of genetic predisposition on the insulin secretory response to excessive fatty acid levels is also illustrated by the observation that insulin secretion is impaired to a greater extent in heterozygous lean ZDF rats than in Wistar rats after Intralipid infusion [128]. Recent studies in our laboratory also highlight the importance of the age of the animals in the response to chronic fuel overload. In a first study we infused 8 week-old male Wistar rats alternatively with glucose for 4 h and Intralipid + heparin for 4h, for a total of 72 h [77]. Hyperglycemic clamps performed at the end of the infusion failed to detect any effects of the glucose + Intralipid infusion regimen on insulin secretion in vivo, as compared to control, saline-infused animals. Similarly, insulin secretion in response to glucose in isolated islets was unaffected. In animals infused with glucose only, we observed an increase in insulin mRNA levels, PDX-1 nuclear localization, and PDX-1 binding to the endogenous insulin gene promoter in islets. In contrast, in islets from animals infused with glucose + Intralipid, insulin mRNA levels were reduced, PDX-1 localization was shifted towards the cytosol, and occupancy of the endogenous insulin promoter by PDX-1 was markedly diminished [77]. These results demonstrate that fatty acid inhibition of the insulin gene also occurs in vivo, and represents

an early defect that can be detected prior to any alteration in insulin secretion. The lack of effect of the infusion on insulin secretion in 8-week old rats prompted us to assess whether older animals would be more susceptible to nutrient overload. To test this possibility, we recently conducted a second study in which glucose and Intralipid were infused simultaneously and continuously for 72h to either 8-week old or 6-month old Wistar rats (unpublished results). As in our first study, this infusion regimen did not alter insulin secretion in 8-week old rats, as assessed by hyperglycemic clamps at the end of the infusion. In marked contrast, infusion of glucose + Intralipid in 6-month old rats resulted in marked insulin resistance which was not adequately compensated for by a sufficient increase in insulin secretion in vivo, and in defective insulin secretion in vitro in isolated islets. The results from these two studies yield two important conclusions. First, defective insulin gene expression under glucolipotoxic conditions occurs in vivo and precedes abnormalities in insulin secretion. This confirms the physiological relevance of our previous in vitro findings [17, 18] and suggests that impaired insulin gene transcription might represent an early defect in nutrient-induced beta-cell failure. Second, young rats are resistant to the effects of nutrient oversupply, and such studies are probably better conducted in older animals, which more closely resemble the typical setting of type 2 diabetes in humans. Whether or not this age-dependent susceptibility to nutrient oversupply is related to the reduced beta-cell proliferative capacity in older rodents [130, 131] is unknown and currently under investigation.

Studies in humans

As in experimental animals, studies examining the effects of prolonged fatty acids on insulin secretion in humans have led to conflicting results. Initial reports from Boden and colleagues indicated that a 48-h lipid infusion induces an appropriate insulin secretory response in healthy subjects [132] but is defective in type 2 diabetic patients [133]. In contrast, Carpentier et al. [134] showed in non-diabetic individuals that an acute (90-min) lipid infusion elicits an increase in insulin secretion which disappears when the infusion is prolonged for 48h. The loss of insulin secretion is specific to the response to glucose, as the response to arginine remains normal [135]. The same group further showed that obese, but not diabetic, subjects are susceptible to the inhibitory effect of lipids on glucose-induced insulin secretion [136]. Importantly, the increase in insulin secretion observed in non-diabetic subjects in response to a 24-h glucose infusion does not occur if lipids are infused simultaneously with glucose [137]. Xiao et al [138] confirmed that fatty acids also alter beta-cell function in obese individuals when ingested orally, and observed interesting differences between saturated and polyunsaturated fatty acids. While polyunsaturated fatty acids impair insulin secretion directly, saturated fatty acids induce insulin resistance which was not adequately compensated for by an increase in beta-cell function [138]. The same group further observed that concomitant administration of the antioxidant taurine improved insulin resistance and beta-cell dysfunction induced by Intralipid infusion in vivo in humans, suggesting the possible contribution of oxidative stress [139].

Finally, the group of Cusi and De Fronzo has carried out a series of studies in non-diabetic subjects with and without family history of type 2 diabetes which

clearly highlights the importance of genetic predisposition on the effects of chronically elevated fatty acids in humans. They showed that a 4-day Intralipid infusion enhances insulin secretion (taking into account insulin sensitivity) in control subjects but inhibits glucose-induced insulin secretion in individuals with a family history of type 2 diabetes [140]. This suggests that the genetic predisposition to developing type 2 diabetes might be dependent, at least in part, on the ability of the beta cell to increase insulin secretion in response to elevated fatty acid levels. Importantly, treatment of susceptible subjects with Acipimox to decrease circulating fatty acid levels ameliorates insulin secretion [141].

Conclusions

In recent years, major progress has been made towards a better understanding of the cellular and molecular mechanisms of glucolipotoxicity in the beta-cell. The biochemical basis for the permissive effect of elevated glucose on the deleterious actions of fatty acids is better delineated; the mechanisms by which the combination of excessive levels of fatty acids and glucose alter beta cell function are beginning to be unraveled; and it is becoming clear that the various functional effects of fatty acids (i.e. decreased insulin secretion, impaired insulin gene expression, and beta-cell death by apoptosis) have different underlying mechanisms. Despite significant progress, however, a number of important questions remain. While it is now clear that triglyceride accumulation is more a symptom than a cause of glucolipotoxicity, the nature of the lipid-derived intermediates directly responsible for the detrimental effects of fatty acids is still elusive. In that regard, a role for cholesterol

accumulation is also likely. Amongst the several candidates recently proposed to explain fatty-acid inhibition of insulin secretion, the role of UCP2 has become unclear, while convincing evidence seems to implicate the novel isoform PKC ϵ as well as late exocytotic events. Regarding fatty-acid impairment of the insulin gene, a complex picture has emerged which includes prolonged activation of ERK1/2 via de novo ceramide synthesis, downregulation of PASK, and altered binding activities of the transcription factors PDX-1, MafA, and C/EBP β . The role of the UPR under conditions of mild glucolipotoxicity (i.e., not associated with cell death) appears limited, although our current hypothesis is that early activation of ATF6 represses insulin gene transcription and thereby contributes to the reduction in proinsulin biosynthesis in an attempt to decrease the load to the ER. As conditions deteriorate, unresolved and sustained unfolded protein response likely leads to ER stress and, consequently, to beta-cell apoptosis under severe glucolipotoxic conditions. The necessity to confirm in vitro findings under physiological conditions has prompted several groups, including ours, to address these questions in in vivo models. Our studies have confirmed that the decrease in insulin gene expression is an early defect which precedes any detectable abnormality in insulin secretion, and have established that prolonged infusions of glucose and Intralipid impairs beta-cell function in old, but not young, animals, raising caution on the use of younger rodents to examine mechanisms of beta-cell failure. While still debated, the role of glucolipotoxicity in humans has been clearly demonstrated in several studies, at least in individuals genetically predisposed to developing type 2 diabetes.

We propose that the uncertainties regarding the role of glucolipotoxicity and its manifestations stem from the fact that it is being considered, as its name implies, as a deleterious phenomenon, while in fact the beta-cell's response to nutrient excess likely represents a continuum encompassing all stages of beta-cell compensation and beta-cell failure. In that sense, some of the early manifestations of glucolipotoxicity should actually be considered as a positive response and would be more appropriately named «glucolipoadaptation», as proposed by Prentki and Nolan [2]. Examples of such adaptive responses are the early decrease in insulin gene expression, as an attempt to protect the ER from overload [77], or the increase in UCP2 expression, as a defense mechanism against oxidative stress [68].

The hypothesis that glucolipotoxicity represents a continuum from an adaptive response to a deleterious outcome is illustrated in Figure 4. According to this view, in normoglycemic individuals experiencing weight gain, the beta cell mounts a compensatory response to counter insulin resistance associated with obesity. This response involves coordinated increases in beta-cell mass, insulin biosynthesis, and insulin secretion, and likely relies on an enhanced responsiveness to fatty acids [142, 143]. The magnitude of the compensatory beta-cell response is probably genetically determined and, in turn, is a major determinant of the long-term ability of an individual to maintain glucose homeostasis in the face of insulin resistance. In contrast, in genetically predisposed individuals beta-cell compensation eventually becomes insufficient and the beta cell is no longer able to sustain a secretory response that matches the demand imposed by insulin resistance. It is probably during this decompensation phase that glucolipotoxicity plays

a major role, in that hyperglycemia is the permissive factor by which elevated fatty acids affect beta-cell function. Our data suggest that one of the first functional defect at this stage is a decrease in insulin gene expression, which likely contributes to eventual beta-cell failure since maintenance of adequate intracellular stores of insulin is necessary to sustain increased secretory demand [144]. Beta-cell decompensation evolves towards beta-cell failure when fasting hyperglycemia occurs. At this stage, it is likely that both glucotoxicity and glucolipotoxicity contribute to the decline in insulin secretion observed over time during the years following diagnosis of type 2 diabetes [3]. This model is based on extensive experimental evidence obtained in vitro and in rodents, but additional investigation is necessary to ascertain the precise contribution of glucolipotoxicity to the pathogenesis of type 2 diabetes in humans.

Acknowledgements

Work performed in our laboratory was supported by the US National Institutes of Health (R01-DK58096 from NIDDK) and the Canadian Institutes of Health Research (MOP 77686). V.P. holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic Beta-cell Function. G.F. is supported by a post-doctoral fellowship from the Canadian Diabetes Association. B.Z. is supported by the Montreal Diabetes Research Center / Merck Frosst post-doctoral fellowship.

References

- [1] R.A. DeFronzo, From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus, *Diabetes* 58 (2009) 773-795.

- [2] M. Prentki, C.J. Nolan, Islet beta cell failure in type 2 diabetes, *J Clin Invest* 116 (2006) 1802-1812.
- [3] U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group, *Diabetes* 44 (1995) 1249-1258.
- [4] S.E. Kahn, S.M. Haffner, M.A. Heise, W.H. Herman, R.R. Holman, N.P. Jones, B.G. Kravitz, J.M. Lachin, M.C. O'Neill, B. Zinman, G. Viberti, the ADOPT Study Group, Glycemic Durability of Rosiglitazone, Metformin, or Glyburide Monotherapy, *N Engl J Med* 355 (2006) 2427-2443.
- [5] R.P. Robertson, J.S. Harmon, Y. Tanaka, G. Sacchi, P.O.T. Tran, C.E. Gleason, V. Poitout, Glucose toxicity of the beta-cell: cellular and molecular mechanisms., in: D. Le Roith, S.I. Taylor, J.M. Olefsky (Eds.), *Diabetes Mellitus. A fundamental and clinical text*. 2nd edition,, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, pp. 125-132.
- [6] R.H. Unger, Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications, *Diabetes* 44 (1995) 863-870.
- [7] M. Prentki, B.E. Corkey, Are the β -cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?, *Diabetes* 45 (1996) 273-283.
- [8] V. Poitout, R.P. Robertson, Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity, *Endocrinology* 143 (2002) 339-342.
- [9] Y. Sako, V.E. Grill, A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and β -cell oxidation

through a process likely coupled to fatty acid oxidation, *Endocrinology* 127 (1990) 1580-1589.

[10] M.L. Elks, Chronic perfusion of rat islets with palmitate suppresses glucose-stimulated insulin release, *Endocrinology* 133 (1993) 208-214.

[11] Y.-P. Zhou, V. Grill, Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans, *J Clin Endocrinol Metab* 80 (1995) 1584-1590.

[12] Y.P. Zhou, V.E. Grill, Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose-fatty acid cycle, *J Clin Invest* 93 (1994) 870-876.

[13] S. Gremlich, C. Bonny, G. Waeber, B. Thorens, Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels, *J Biol Chem* 272 (1997) 30261-30269.

[14] B. Ritz-Laser, P. Meda, I. Constant, N. Klages, A. Charollais, A. Morales, C. Magnan, A. Ktorza, J. Philippe, Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free-fatty acid palmitate., *Endocrinology* 140 (1999) 4005-4014.

[15] S. Jacqueminet, I. Briaud, C. Rouault, G. Reach, V. Poitout, Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta-cells to palmitate is dependent upon the presence of a stimulatory glucose concentration, *Metabolism* 49 (2000) 532-536.

[16] I. Briaud, J.S. Harmon, C.L. Kelpe, V.B. Segu, V. Poitout, Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids., *Diabetes* 50 (2001) 315-321.

- [17] C.L. Kelpe, P.C. Moore, S.D. Parazzoli, B. Wicksteed, C.J. Rhodes, V. Poitout, Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis, *J Biol Chem* 278 (2003) 30015-30021.
- [18] D.K. Hagman, L.B. Hays, S.D. Parazzoli, V. Poitout, Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans, *J Biol Chem* 280 (2005) 32413-32418.
- [19] A. Pick, J. Clark, C. Kubstrup, M. Levisetti, W. Pugh, S. Bonner-Weir, K. Polonsky, Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker Diabetes Fatty rat, *Diabetes* 47 (1998) 358-364.
- [20] M. Shimabukuro, Y.-T. Zhou, M. Levi, R.H. Unger, Fatty-acid-induced beta-cell apoptosis: a link between obesity and diabetes, *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 2498-2502.
- [21] M. Cnop, J.C. Hannaert, A. Hoorens, D.L. Eizirik, D.G. Pipeleers, Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation, *Diabetes* 50 (2001) 1771-1777.
- [22] K. Maedler, G.A. Spinas, D. Dyntar, W. Moritz, N. Kaiser, M.Y. Donath, Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function, *Diabetes* 50 (2001) 69-76.
- [23] R. Lupi, F. Dotta, L. Marselli, S. Del Guerra, M. Masini, C. Santangelo, G. Patane, U. Boggi, S. Piro, M. Anello, E. Bergamini, F. Mosca, U. Di Mario, S. Del Prato, P. Marchetti, Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence

that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated, *Diabetes* 51 (2002) 1437-1442.

[24] C.E. Wrede, L.M. Dickson, M.K. Lingohr, I. Briaud, C.J. Rhodes, Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1), *J Biol Chem* 277 (2002) 49676-49684.

[25] S. Piro, M. Anello, C. Di Pietro, M.N. Lizzio, G. Patane, A.M. Rabuazzo, R. Vigneri, M. Purrello, F. Purrello, Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: Possible role of oxidative stress, *Metabolism* 51 (2002) 1340-1347.

[26] K. Maedler, J. Oberholzer, P. Bucher, G.A. Spinas, M.Y. Donath, Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function, *Diabetes* 52 (2003) 726-733.

[27] I. Maestre, J. Jordan, S. Calvo, J.A. Reig, V. Cena, B. Soria, M. Prentki, E. Roche, Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1, *Endocrinology* 144 (2003) 335-345.

[28] W. El-Assaad, J. Buteau, M.L. Peyot, C. Nolan, R. Roidit, S. Hardy, E. Joly, G. Dbaibo, L. Rosenberg, M. Prentki, Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death, *Endocrinology* 144 (2003) 4154-4163.

[29] J.S. Harmon, C.E. Gleason, Y. Tanaka, V. Poitout, R.P. Robertson, Antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content and decreased insulin gene mRNA level in Zucker Diabetic Fatty rats, *Diabetes* 50 (2001) 2481-2486.

- [30] I. Briaud, C.L. Kelpe, L.M. Johnson, P.O.T. Tran, V. Poitout, Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic vs. normoglycemic rats., *Diabetes* 51 (2002) 662-668.
- [31] M. Prentki, E. Joly, W. El-Assaad, R. Roduit, Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes, *Diabetes* 51 Suppl 3 (2002) S405-413.
- [32] V. Poitout, Lipid partitioning in the pancreatic beta-cell: physiologic and pathophysiologic implications., *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 9 (2002) 152-159.
- [33] T. Brun, E. Roche, F. Assimacopoulos-Jeannet, B.E. Corkey, K.-H. Kim, M. Prentki, Evidence fore anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling, *Diabetes* 45 (1996) 190-198.
- [34] E. Roche, S. Farfari, L.A. Witters, F. Assimacopoulos-Jeannet, S. Thumelin, T. Brun, B.E. Corkey, A.K. Saha, M. Prentki, Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression, *Diabetes* 47 (1998) 1086-1094.
- [35] N. Ruderman, M. Prentki, AMP kinase and malonyl-CoA: Targets for therapy of the metabolic syndrome, *Nat Rev Drug Discov* 3 (2004) 340-351.
- [36] D.G. Hardie, Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status, *Endocrinology* 144 (2003) 5179-5183.
- [37] I.P. Salt, G. Johnson, S.J. Ashcroft, D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta-cells, and may regulate insulin release, *Biochem J* 335 (1998) 533-539.

- [38] X. Wang, L. Zhou, G. Li, T. Luo, Y. Gu, L. Qian, X. Fu, F. Li, J. Li, M. Luo, Palmitate activates AMP-activated protein kinase and regulates insulin secretion from beta cells, *Biochem Biophys Res Commun* 352 (2007) 463-468.
- [39] F. Foufelle, P. Ferre, New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c, *Biochem J* 366 (2002) 377-391.
- [40] S.S. Choe, A.H. Choi, J.W. Lee, K.H. Kim, J.J. Chung, J. Park, K.M. Lee, K.G. Park, I.K. Lee, J.B. Kim, Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells, *Diabetes* 56 (2007) 1534-1543.
- [41] L.L. Listenberger, X. Han, S.E. Lewis, S. Cases, R.V. Farese, Jr., D.S. Ory, J.E. Schaffer, Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 3077-3082.
- [42] A.K. Busch, E. Gurisik, D.V. Cordery, M. Sudlow, G.S. Denyer, D.R. Laybutt, W.E. Hughes, T.J. Biden, Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearoyl coenzyme A desaturase protects pancreatic beta-cells from lipoapoptosis, *Diabetes* 54 (2005) 2917-2924.
- [43] J.M. Ntambi, M. Miyazaki, J.P. Stoehr, H. Lan, C.M. Kendzioriski, B.S. Yandell, Y. Song, P. Cohen, J.M. Friedman, A.D. Attie, Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 11482-11486.

- [44] J.B. Flowers, M.E. Rabaglia, K.L. Schueler, M.T. Flowers, H. Lan, M.P. Keller, J.M. Ntambi, A.D. Attie, Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 improves insulin sensitivity in lean mice but worsens diabetes in leptin-deficient obese mice, *Diabetes* 56 (2007) 1228-1239.
- [45] C.J. Nolan, M. Prentki, The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable, *Trends Endocrinol Metab* 19 (2008) 285-291.
- [46] M. Prentki, S.R. Madiraju, Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease, *Endocr Rev* 29 (2008) 647-676.
- [47] M. Shimabukuro, M. Higa, Y.T. Zhou, M.Y. Wang, C.B. Newgard, R.H. Unger, Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression, *J Biol Chem* 273 (1998) 32487-32490.
- [48] P.C. Moore, M.A. Ugas, D.K. Hagman, S.D. Parazzoli, V. Poitout, Evidence against the involvement of oxidative stress in Fatty Acid inhibition of insulin secretion, *Diabetes* 53 (2004) 2610-2616.
- [49] M. Cnop, J.C. Hannaert, A.Y. Gruppig, D.G. Pipeleers, Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification, *Endocrinology* 143 (2002) 3449-3453.
- [50] A. Abderrahmani, G. Niederhauser, D. Favre, S. Abdelli, M. Ferdaoussi, J.Y. Yang, R. Regazzi, C. Widmann, G. Waeber, Human high-density lipoprotein particles prevent activation of the JNK pathway induced by human oxidised low-density lipoprotein particles in pancreatic beta cells, *Diabetologia* 50 (2007) 1304-1314.
- [51] L.R. Brunham, J.K. Kruit, T.D. Pape, J.M. Timmins, A.Q. Reuwer, Z. Vasanji, B.J. Marsh, B. Rodrigues, J.D. Johnson, J.S. Parks, C.B. Verchere,

M.R. Hayden, Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment, *Nat Med* 13 (2007) 340-347.

[52] M. Ishikawa, Y. Iwasaki, S. Yatoh, T. Kato, S. Kumadaki, N. Inoue, T. Yamamoto, T. Matsuzaka, Y. Nakagawa, N. Yahagi, K. Kobayashi, A. Takahashi, N. Yamada, H. Shimano, Cholesterol accumulation and diabetes in pancreatic beta-cell-specific SREBP-2 transgenic mice: a new model for lipotoxicity, *J Lipid Res* 49 (2008) 2524-2534.

[53] N. Mitro, P.A. Mak, L. Vargas, C. Godio, E. Hampton, V. Molteni, A. Kreusch, E. Saez, The nuclear receptor LXR is a glucose sensor, *Nature* 445 (2007) 219-223.

[54] C.P. Briscoe, M. Tadayyon, J.L. Andrews, W.G. Benson, J.K. Chambers, M.M. Eilert, C. Ellis, N.A. Elshourbagy, A.S. Goetz, D.T. Minnick, P.R. Murdock, H.R. Sauls, Jr., U. Shabon, L.D. Spinage, J.C. Strum, P.G. Szekeres, K.B. Tan, J.M. Way, D.M. Ignar, S. Wilson, A.I. Muir, The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids, *J Biol Chem* 278 (2003) 11303-11311.

[55] Y. Itoh, Y. Kawamata, M. Harada, M. Kobayashi, R. Fujii, S. Fukusumi, K. Ogi, M. Hosoya, Y. Tanaka, H. Uejima, H. Tanaka, M. Maruyama, R. Satoh, S. Okubo, H. Kizawa, H. Komatsu, F. Matsumura, Y. Noguchi, T. Shinohara, S. Hinuma, Y. Fujisawa, M. Fujino, Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40, *Nature* 422 (2003) 173-176.

[56] P. Steneberg, N. Rubins, R. Bartoov-Shifman, M.D. Walker, H. Edlund, The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis,

and impaired glucose homeostasis in mouse., *Cell Metabolism* 1 (2005) 245-258.

[57] M.G. Latour, T. Alquier, E. Oseid, C. Tremblay, T.L. Jetton, J. Luo, D.C. Lin, V. Poitout, GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo, *Diabetes* 56 (2007) 1087-1094.

[58] M. Kebede, T. Alquier, M.G. Latour, M. Semache, C. Tremblay, V. Poitout, The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding, *Diabetes* 57 (2008) 2432-2437.

[59] M. Cnop, M. Igoillo-Esteve, D.A. Cunha, L. Ladriere, D.L. Eizirik, An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells, *Biochem Soc Trans* 36 (2008) 909-915.

[60] C.P. Tan, Y. Feng, Y.P. Zhou, G.J. Eiermann, A. Petrov, C. Zhou, S. Lin, G. Salituro, P. Meinke, R. Mosley, T.E. Akiyama, M. Einstein, S. Kumar, J.P. Berger, S.G. Mills, N.A. Thornberry, L. Yang, A.D. Howard, Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice, *Diabetes* 57 (2008) 2211-2219.

[61] T.M. Mason, T. Goh, V. Tchishopashvili, H. Sandhu, N. Gupta, G.F. Lewis, A. Giacca, Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats, *Diabetes* 48 (1999) 524-530.

[62] G. Paolisso, A. Gambardella, L. Amato, R. Tortoriello, A. D'Amore, M. Varrichio, F. D'Onofrio, Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects, *Diabetologia* 38 (1995) 1295-1299.

- [63] C.-Y. Zhang, G. Baffy, P. Perret, S. Krauss, O. Peroni, D. Grujic, T. Hagen, A.-J. Vidal-Puig, O. Boss, Y.-B. Kim, X.X. Zheng, M.B. Wheeler, G.I. Shulman, C.B. Chan, B.B. Lowell, Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta-cell dysfunction, and Type 2 diabetes., *Cell* 105 (2001) 745-755.
- [64] J. Nedergaard, D. Ricquier, L.P. Kozak, Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects, *EMBO Rep* 6 (2005) 917-921.
- [65] C.B. Chan, P.E. MacDonald, M.C. Saleh, D.C. Johns, E. Marban, M.B. Wheeler, Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets, *Diabetes* 48 (1999) 1482-1486.
- [66] C.B. Chan, D. De Leo, J.W. Joseph, T.S. McQuaid, X.F. Ha, F. Xu, R.G. Tsushima, P.S. Pennefather, A.M. Salapatek, M.B. Wheeler, Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action., *Diabetes* 50 (2001) 1302-1310.
- [67] J.W. Joseph, V. Koshkin, C.Y. Zhang, J. Wang, B.B. Lowell, C.B. Chan, M.B. Wheeler, Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet, *Diabetes* 51 (2002) 3211-3219.
- [68] J. Pi, Y. Bai, K.W. Daniel, D. Liu, O. Lyght, D. Edelstein, M. Brownlee, B.E. Corkey, S. Collins, Persistent Oxidative Stress Due to Absence of Uncoupling Protein 2 Associated with Impaired Pancreatic Beta-Cell Function, *Endocrinology* (2009).
- [69] N. Lameloise, P. Muzzin, M. Prentki, F. Assimacopoulos-Jeannet, Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion?, *Diabetes* 50 (2001) 803-809.

- [70] G. Patane, M. Anello, S. Piro, R. Vigneri, F. Purrello, A.M. Rabuazzo, Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition, *Diabetes* 51 (2002) 2749-2756.
- [71] N. Produit-Zengaffinen, N. Davis-Lameloise, H. Perreten, D. Becard, A. Gjinovci, P.A. Keller, C.B. Wollheim, P. Herrera, P. Muzzin, F. Assimacopoulos-Jeannet, Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species, *Diabetologia* 50 (2007) 84-93.
- [72] C. Schmitz-Peiffer, D.R. Laybutt, J.G. Burchfield, E. Gurisik, S. Narasimhan, C.J. Mitchell, D.J. Pedersen, U. Braun, G.J. Cooney, M. Leitges, T.J. Biden, Inhibition of PKCepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance, *Cell Metab* 6 (2007) 320-328.
- [73] J. Cantley, J.G. Burchfield, G.L. Pearson, C. Schmitz-Peiffer, M. Leitges, T.J. Biden, Deletion of PKCepsilon selectively enhances the amplifying pathways of glucose-stimulated insulin secretion via increased lipolysis in mouse (429)-cells, *Diabetes* (2009).
- [74] M.L. Peyot, C. Guay, M.G. Latour, J. Lamontagne, R. Lussier, M. Pineda, N.B. Ruderman, G. Haemmerle, R. Zechner, E. Joly, S.R. Madiraju, V. Poitout, M. Prentki, Adipose Triglyceride Lipase Is Implicated in Fuel- and Non-fuel-stimulated Insulin Secretion, *J Biol Chem* 284 (2009) 16848-16859.
- [75] T. Kato, H. Shimano, T. Yamamoto, T. Yokoo, Y. Endo, M. Ishikawa, T. Matsuzaka, Y. Nakagawa, S. Kumadaki, N. Yahagi, A. Takahashi, H.

- Sone, H. Suzuki, H. Toyoshima, A.H. Hasty, S. Takahashi, H. Gomi, T. Izumi, N. Yamada, Granuphilin is activated by SREBP-1c and involved in impaired insulin secretion in diabetic mice, *Cell Metab* 4 (2006) 143-154.
- [76] C.S. Olofsson, S. Collins, M. Bengtsson, L. Eliasson, A. Salehi, K. Shimomura, A. Tarasov, C. Holm, F. Ashcroft, P. Rorsman, Long-term exposure to glucose and lipids inhibits glucose-induced insulin secretion downstream of granule fusion with plasma membrane, *Diabetes* 56 (2007) 1888-1897.
- [77] D.K. Hagman, M.G. Latour, S.K. Chakrabarti, G. Fontes, J. Amyot, C. Tremblay, M. Semache, J.A. Lausier, V. Roskens, R.G. Mirmira, T.L. Jetton, V. Poitout, Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets, *Diabetes* 57 (2008) 424-431.
- [78] J.S. Harmon, R. Stein, R.P. Robertson, Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells, *J Biol Chem* 280 (2005) 11107-11113.
- [79] S. Mathias, L.A. Pena, R.N. Kolesnick, Signal transduction of stress via ceramide, *Biochem J* 335 (Pt 3) (1998) 465-480.
- [80] E. Henderson, R. Stein, c-jun inhibits transcriptional activation by the insulin enhancer, and the insulin control element is the target of control, *Mol Cell Biol* 14 (1994) 655-662.
- [81] G.L. Robinson, E. Henderson, M.E. Massari, C. Murre, R. Stein, c-jun inhibits insulin control element-mediated transcription by affecting the

transactivation potential of the E2A gene products, *Mol Cell Biol* 15 (1995) 1398-1404.

[82] H. Kaneto, G. Xu, N. Fujii, S. Kim, S. Bonner-Weir, G.C. Weir, Involvement of c-Jun N-terminal Kinase in Oxidative Stress-mediated Suppression of Insulin Gene Expression, *J Biol Chem* 277 (2002) 30010-30018.

[83] G. Solinas, W. Naugler, F. Galimi, M.S. Lee, M. Karin, Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 16454-16459.

[84] G. Fontes, M. Semache, D.K. Hagman, C. Tremblay, R. Shah, C.J. Rhodes, J. Rutter, V. Poitout, Involvement of PAS Kinase and ERK1/2 in Palmitate Inhibition of Insulin Gene Expression In Pancreatic Beta-Cells, *Diabetes* (2009) published ahead of print June 5, 2009, doi:10.2337/db08-0579.

[85] C.A. Amezcua, S.M. Harper, J. Rutter, K.H. Gardner, Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation, *Structure* 10 (2002) 1349-1361.

[86] J. Rutter, B.L. Probst, S.L. McKnight, Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase, *Cell* 111 (2002) 17-28.

[87] W.A. Wilson, A.V. Skurat, B. Probst, A. de Paoli-Roach, P.J. Roach, J. Rutter, Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 16596-16601.

[88] G. da Silva Xavier, J. Rutter, G.A. Rutter, Involvement of Per-Arnt-Sim (PAS) kinase in the stimulation of preproinsulin and pancreatic

duodenum homeobox 1 gene expression by glucose, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 8319-8324.

[89] M. Lu, J. Seufert, J.F. Habener, Pancreatic β -cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/Enhancer-binding protein β . Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47, *J Biol Chem* 272 (1997) 28349-28359.

[90] V. Plaisance, V. Perret, D. Favre, A. Abderrahmani, J.Y. Yang, C. Widmann, R. Regazzi, Role of the transcriptional factor C/EBPbeta in free fatty acid-elicited beta-cell failure, *Mol Cell Endocrinol* 305 (2009) 47-55.

[91] M.C. Lawrence, K. McGlynn, B.H. Park, M.H. Cobb, ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter, *J Biol Chem* 280 (2005) 26751-26759.

[92] D.L. Eizirik, A.K. Cardozo, M. Cnop, The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus, *Endocr Rev* 29 (2008) 42-61.

[93] D.R. Laybutt, A.M. Preston, M.C. Akerfeldt, J.G. Kench, A.K. Busch, A.V. Biankin, T.J. Biden, Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes, *Diabetologia* 50 (2007) 752-763.

[94] E. Karaskov, C. Scott, L. Zhang, T. Teodoro, M. Ravazzola, A. Volchuk, Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis, *Endocrinology* 147 (2006) 3398-3407.

[95] M. Cnop, L. Ladriere, P. Hekerman, F. Ortis, A.K. Cardozo, Z. Dogusan, D. Flamez, M. Boyce, J. Yuan, D.L. Eizirik, Selective inhibition of

- EIF2alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced ER stress and causes pancreatic beta -cell dysfunction and apoptosis, *J Biol Chem* (2006).
- [96] H. Wang, G. Kouri, C.B. Wollheim, ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity, *J Cell Sci* 118 (2005) 3905-3915.
- [97] I. Kharroubi, L. Ladriere, A.K. Cardozo, Z. Dogusan, M. Cnop, D.L. Eizirik, Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress, *Endocrinology* 145 (2004) 5087-5096.
- [98] S.C. Martinez, K. Tanabe, C. Cras-Meneur, N.A. Abumrad, E. Bernal-Mizrachi, M.A. Permutt, Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, *Diabetes* 57 (2008) 846-859.
- [99] D.A. Cunha, P. Hekerman, L. Ladriere, A. Bazarra-Castro, F. Ortis, M.C. Wakeham, F. Moore, J. Rasschaert, A.K. Cardozo, E. Bellomo, L. Overbergh, C. Mathieu, R. Lupi, T. Hai, A. Herchuelz, P. Marchetti, G.A. Rutter, D.L. Eizirik, M. Cnop, Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells, *J Cell Sci* 121 (2008) 2308-2318.
- [100] E. Bachar, Y. Ariav, M. Ketzinel-Gilad, E. Cerasi, N. Kaiser, G. Leibowitz, Glucose amplifies fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells via activation of mTORC1, *PLoS One* 4 (2009) e4954.
- [101] K.S. Gwiazda, T.L. Yang, Y. Lin, J.D. Johnson, Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca²⁺ homeostasis in beta-cells, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296 (2009) E690-701.

- [102] P.C. Moore, D.C. Lin, J. Luo, V. Poitout, Deletion of the GPR40 gene impairs fatty-acid potentiation of insulin secretion in isolated mouse islets., *Diabetes* 54/Suppl.1 (2005) A83.
- [103] H.Y. Seo, Y.D. Kim, K.M. Lee, A.K. Min, M.K. Kim, H.S. Kim, K.C. Won, J.Y. Park, K.U. Lee, H.S. Choi, K.G. Park, I.K. Lee, Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner, *Endocrinology* 149 (2008) 3832-3841.
- [104] C. Evans-Molina, R.D. Robbins, T. Kono, S.A. Tersey, G.L. Vestermark, C.S. Nunemaker, J.C. Garmey, T.G. Deering, S.R. Keller, B. Maier, R.G. Mirmira, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation restores islet function in diabetic mice through reduction of endoplasmic reticulum stress and maintenance of euchromatin structure, *Mol Cell Biol* 29 (2009) 2053-2067.
- [105] P. Pirot, N. Naamane, F. Libert, N.E. Magnusson, T.F. Orntoft, A.K. Cardozo, D.L. Eizirik, Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs, *Diabetologia* 50 (2007) 1006-1014.
- [106] X. Wang, H. Li, D. De Leo, W. Guo, V. Koshkin, I.G. Fantus, A. Giacca, C.B. Chan, S. Der, M.B. Wheeler, Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic beta-cell line MIN6, *Diabetes* 53 (2004) 129-140.
- [107] D. Morgan, H.R. Oliveira-Emilio, D. Keane, A.E. Hirata, M. Santos da Rocha, S. Bordin, R. Curi, P. Newsholme, A.R. Carpinelli, Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity

of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line, *Diabetologia* 50 (2007) 359-369.

[108] A.K. Busch, D. Cordery, G.S. Denyer, T.J. Biden, Expression profiling of palmitate- and oleate-regulated genes provides novel insights into the effects of chronic lipid exposure on pancreatic beta-cell function, *Diabetes* 51 (2002) 977-987.

[109] K.D. Jeffrey, E.U. Alejandro, D.S. Luciani, T.B. Kalynyak, X. Hu, H. Li, Y. Lin, R.R. Townsend, K.S. Polonsky, J.D. Johnson, Carboxypeptidase E mediates palmitate-induced beta-cell ER stress and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 8452-8457.

[110] E. Lai, G. Bikopoulos, M.B. Wheeler, M. Rozakis-Adcock, A. Volchuk, Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294 (2008) E540-550.

[111] C.J. Huang, C.Y. Lin, L. Haataja, T. Gurlo, A.E. Butler, R.A. Rizza, P.C. Butler, High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes, *Diabetes* 56 (2007) 2016-2027.

[112] W.F. Graier, R. Malli, G.M. Kostner, Mitochondrial protein phosphorylation: instigator or target of lipotoxicity?, *Trends Endocrinol Metab* 20 (2009) 186-193.

[113] V. Koshkin, F.F. Dai, C.A. Robson-Doucette, C.B. Chan, M.B. Wheeler, Limited mitochondrial permeabilization is an early manifestation of palmitate-induced lipotoxicity in pancreatic beta-cells, *J Biol Chem* 283 (2008) 7936-7948.

- [114] D.S. Luciani, K.S. Gwiazda, T.L. Yang, T.B. Kalynyak, Y. Bychkivska, M.H. Frey, K.D. Jeffrey, A.V. Sampaio, T.M. Underhill, J.D. Johnson, Roles of IP3R and RyR Ca²⁺ channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell death, *Diabetes* 58 (2009) 422-432.
- [115] P. Lovis, E. Roggli, D.R. Laybutt, S. Gattesco, J.Y. Yang, C. Widmann, A. Abderrahmani, R. Regazzi, Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction, *Diabetes* 57 (2008) 2728-2736.
- [116] G.V. Richieri, A. Anel, A.M. Kleinfeld, Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB, *Biochemistry* 32 (1993) 7574-7580.
- [117] G.V. Richieri, A.M. Kleinfeld, Unbound free fatty acid levels in human serum, *J Lipid Res* 36 (1995) 229-240.
- [118] W.S. Cruz, G. Kwon, C.A. Marshall, M.L. McDaniel, C.F. Semenkovich, Glucose and insulin stimulate heparin-releasable lipoprotein lipase activity in mouse islets and INS-1 cells. A potential link between insulin resistance and beta-cell dysfunction, *J Biol Chem* 276 (2001) 12162-12168.
- [119] K.L. Pappan, Z. Pan, G. Kwon, C.A. Marshall, T. Coleman, I.J. Goldberg, M.L. McDaniel, C.F. Semenkovich, Pancreatic beta-cell lipoprotein lipase independently regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion, *J Biol Chem* 280 (2005) 9023-9029.
- [120] R.H. Unger, Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome, *Endocrinology* 144 (2003) 5159-5165.

- [121] Y. Lee, H. Hirose, M. Ohneda, J.H. Johnson, J.D. McGarry, R.H. Unger, Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships, *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 10878-10882.
- [122] J.M. Aerts, R. Ottenhoff, A.S. Powelson, A. Grefhorst, M. van Eijk, P.F. Dubbelhuis, J. Aten, F. Kuipers, M.J. Serlie, T. Wennekes, J.K. Sethi, S. O'Rahilly, H.S. Overkleeft, Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity, *Diabetes* 56 (2007) 1341-1349.
- [123] W.L. Holland, J.T. Brozinick, L.P. Wang, E.D. Hawkins, K.M. Sargent, Y. Liu, K. Narra, K.L. Hoehn, T.A. Knotts, A. Siesky, D.H. Nelson, S.K. Karathanasis, G.K. Fontenot, M.J. Birnbaum, S.A. Summers, Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance, *Cell Metab* 5 (2007) 167-179.
- [124] H. Zhao, M. Przybylska, I.H. Wu, J. Zhang, C. Siegel, S. Komarnitsky, N.S. Yew, S.H. Cheng, Inhibiting glycosphingolipid synthesis improves glycemic control and insulin sensitivity in animal models of type 2 diabetes, *Diabetes* 56 (2007) 1210-1218.
- [125] D.T. Stein, B.E. Stevenson, M.W. Chester, M. Basit, M.B. Daniels, S.D. Turley, J.D. McGarry, The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation., *J Clin Invest* 100 (1997) 398-403.
- [126] C. Magnan, S. Collins, M.F. Berthault, N. Kassis, M. Vincent, M. Gilbert, L. Penicaud, A. Ktorza, F. Assimacopoulos-Jeannet, Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose, *J Clin Invest* 103 (1999) 413-419.

- [127] G.M. Steil, N. Trivedi, J.C. Jonas, W.M. Hasenkamp, A. Sharma, S. Bonner-Weir, G.C. Weir, Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280 (2001) E788-796.
- [128] T.T. Goh, T.M. Mason, N. Gupta, A. So, T.K. Lam, L. Lam, G.F. Lewis, A. Mari, A. Giacca, Lipid-induced beta-cell dysfunction in vivo in models of progressive beta-cell failure, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292 (2007) E549-560.
- [129] A.I. Oprescu, G. Bikopoulos, A. Naassan, E.M. Allister, C. Tang, E. Park, H. Uchino, G.F. Lewis, I.G. Fantus, M. Rozakis-Adcock, M.B. Wheeler, A. Giacca, Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo, *Diabetes* 56 (2007) 2927-2937.
- [130] M.M. Rankin, J.A. Kushner, Adaptive beta-cell proliferation is severely restricted with advanced age, *Diabetes* 58 (2009) 1365-1372.
- [131] S.I. Tschen, S. Dhawan, T. Gurlo, A. Bhushan, Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice, *Diabetes* 58 (2009) 1312-1320.
- [132] G. Boden, X. Chen, J. Rosner, M. Barton, Effects of a 48h fat infusion on insulin secretion and glucose utilization., *Diabetes* 44 (1995) 1239-1242.
- [133] G. Boden, X. Chen, Effects of fatty acids and ketone bodies on basal insulin secretion in type 2 diabetes., *Diabetes* 48 (1999) 577-583.
- [134] A. Carpentier, S. Mittelman, B. Lamarche, R. Bergman, A. Giacca, G. Lewis, Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation., *Am J Physiol* 276 (1999).

- [135] A. Carpentier, A. Giacca, G.F. Lewis, Effect of increased plasma non-esterified fatty acids (NEFAs) on arginine-stimulated insulin secretion in obese humans, *Diabetologia* 44 (2001) 1989-1997.
- [136] A. Carpentier, S.D. Mittelman, R.N. Bergman, A. Giacca, G.F. Lewis, Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes, *Diabetes* 49 (2000) 399-408.
- [137] N. Leung, T. Sakaue, A. Carpentier, K. Uffelman, A. Giacca, G.F. Lewis, Prolonged increase of plasma non-esterified fatty acids fully abolishes the stimulatory effect of 24 hours of moderate hyperglycaemia on insulin sensitivity and pancreatic beta-cell function in obese men, *Diabetologia* 47 (2004) 204-213.
- [138] C. Xiao, A. Giacca, A. Carpentier, G.F. Lewis, Differential effects of monounsaturated, polyunsaturated and saturated fat ingestion on glucose-stimulated insulin secretion, sensitivity and clearance in overweight and obese, non-diabetic humans, *Diabetologia* 49 (2006) 1371-1379.
- [139] C. Xiao, A. Giacca, G.F. Lewis, Oral taurine but not N-acetylcysteine ameliorates NEFA-induced impairment in insulin sensitivity and beta cell function in obese and overweight, non-diabetic men, *Diabetologia* 51 (2008) 139-146.
- [140] S. Kashyap, R. Belfort, A. Gastaldelli, T. Pratipanawatr, R. Berria, W. Pratipanawatr, M. Bajaj, L. Mandarino, R. DeFronzo, K. Cusi, A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes, *Diabetes* 52 (2003) 2461-2474.

- [141] K. Cusi, S. Kashyap, A. Gastaldelli, M. Bajaj, E. Cersosimo, Effects on insulin secretion and insulin action of a 48-h reduction of plasma free fatty acids with acipimox in nondiabetic subjects genetically predisposed to type 2 diabetes, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292 (2007) E1775-1781.
- [142] M. Fex, M.D. Nitert, N. Wierup, F. Sundler, C. Ling, H. Mulder, Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet, *Diabetologia* 50 (2006) 74-83.
- [143] C.J. Nolan, J.L. Leahy, V. Delghingaro-Augusto, J. Moibi, K. Soni, M.L. Peyot, M. Fortier, C. Guay, J. Lamontagne, A. Barbeau, E. Przybytkowski, E. Joly, P. Masiello, S. Wang, G.A. Mitchell, M. Prentki, Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling, *Diabetologia* 49 (2006) 2120-2130.
- [144] G. Leibowitz, G. Uckaya, A.I. Oprescu, E. Cerasi, D.J. Gross, N. Kaiser, Glucose-regulated proinsulin gene expression is required for adequate insulin production during chronic glucose exposure, *Endocrinology* 143 (2002) 3214-3220.

Figure legends

Figure 1: Effects of glucose on lipid partitioning in the beta cell. In the presence of simultaneously elevated levels of glucose and fatty-acid (FA), the increase in cytosolic malonyl-CoA resulting from glucose metabolism inhibits the enzyme carnitine-palmitoyl transferase-1 (CPT-1). Transport of long-chain acyl-CoA (LC-CoA) in the mitochondria is reduced, and the esterification pathway is preferentially activated, leading to cytosolic accumulation of lipid-derived signaling molecules such as ceramide, diglycerides (DG), phosphatidic acid (PA), phospholipids (PL), and triglycerides (TG).

Figure 2: Working model of the mechanisms of fatty-acid inhibition of insulin gene expression. Several signaling pathways are activated in beta cells in the presence of simultaneously elevated levels of palmitate and glucose. First, de novo ceramide synthesis [17] leads to sustained activation of ERK $\frac{1}{2}$ [82] and exclusion of PDX-1 from the nuclear compartment [18]. Second, palmitate blocks glucose-induction of PASK expression, which results in decreased PDX-1 expression and increased C/EBP β expression [82]. Third, palmitate decreases MafA expression [18]. These 3 pathways result in decreased binding activities of PDX-1 and MafA on the insulin promoter. In addition, palmitate induces the cleavage of ATF6, which also represses insulin gene transcription (our unpublished data).

Figure 3: Concentrations of unbound fatty acids (FA) in solution as a function of the fatty acid : BSA ratio for a fixed total palmitate concentration of 0.5 mM. Unbound fatty acids were measured using the fluorescent probe ADIFAB [114]. Data are the average of 2 independent

experiments. Also represented are the mean \pm SD of unbound FA levels measured in human plasma using the same method, from [115].

Figure 4: Hypothetical representation of the progression from beta-cell compensation to failure in the face of obesity-induced insulin resistance, and the role of glucolipotoxicity. According to this hypothesis, the decrease in insulin sensitivity is initially matched by a marked increase in insulin secretion, insulin gene expression, and beta-cell mass. At this stage the beta-cell adapts to nutrient oversupply by switching to preferential utilization of fatty acids, as part of the compensatory response (glucolipoadaptation [2]). In genetically predisposed individuals, the beta cell eventually becomes unable to further compensate and glucolipoadaptation evolves towards glucolipotoxicity, in which excursions of blood glucose levels outside of the normal range become permissive for the detrimental effects of elevated fatty acids. This phase is characterized by an early loss of insulin gene expression, decreased insulin secretion (relative to the degree of insulin resistance), and reduced beta-cell mass. Finally, beta-cell failure occurs when glucose levels are permanently in the hyperglycemic range. At that stage both glucotoxicity and glucolipotoxicity contribute to the continued deterioration of beta-cell function.

Figure 1

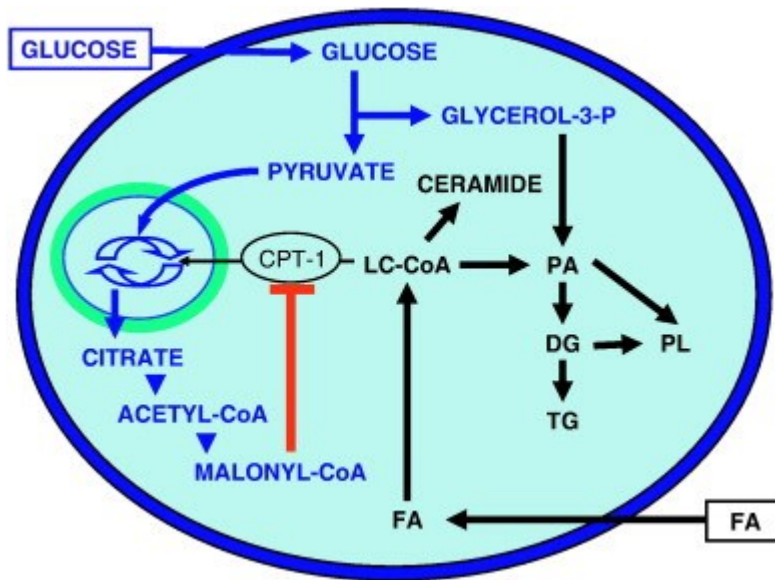


Figure 2

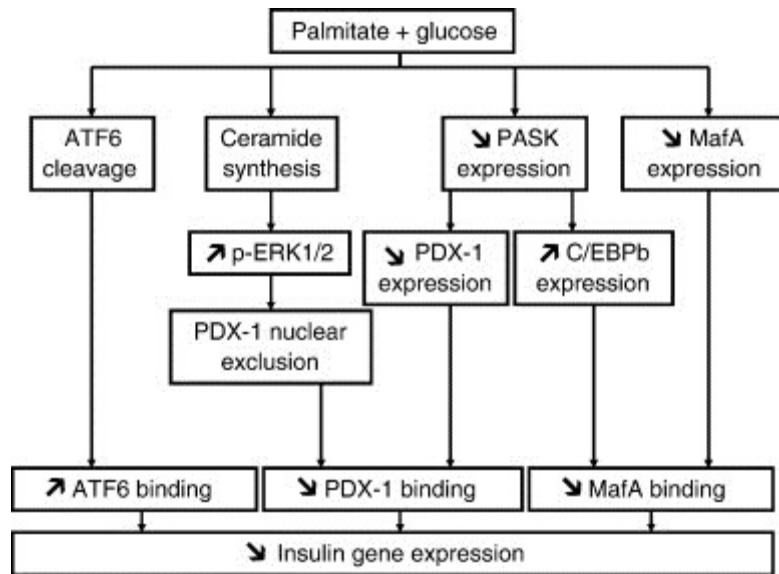


Figure 3

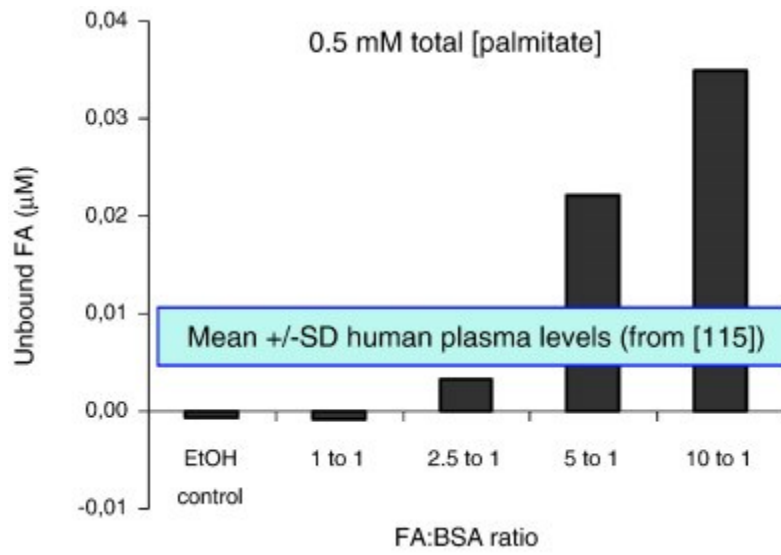


Figure 4

