

## Expressie van vetzuurtransporters in skeletspier van type-2-diabetespatiënten in vergelijking met sedentaire mannen en leeftijd-gematchte getrainde wielrenners

M.M.A.L. PELSERS<sup>1</sup>, K. TSINTZAS<sup>3</sup>, H. BOON<sup>2</sup>, K. JEWELL<sup>3</sup>, L. NORTON<sup>3</sup>, J.J.F.P. LUIKEN<sup>4</sup>, J.F.C. GLATZ<sup>4</sup> en L.J.C. van LOON<sup>1,2</sup>

Het verband tussen verhoogde plasmaconcentraties van langketenige vetzuren (LCFA), intramyocellulair triacylglycerol (IMTG)-stapeling en de ontwikkeling van insulineresistentie en/of type-2-diabetes is in meerdere studies aangetoond (1). Er is echter geen functionele relatie tussen verhoogde IMTG-concentraties en insulineresistentie daar langdurig getrainde atleten een verhoogde insulinegevoeligheid vertonen, ondanks verhoogde IMTG-concentraties (2). Dit laatste wordt verklaard door het feit dat niet de grootte of verdeling van de IMTG-pool belangrijk is maar meer de onbalans tussen LCFA-beschikbaarheid, -opname en/of -oxidatie, welke verantwoordelijk is voor de ontwikkeling van insulineresistentie in de skeletspier (2). Lipide-infusiestudies suggereren dat verhoogde LCFA-opname en/of verminderde -oxidatie leiden tot intramyocellulaire stapeling van LCFA-metabolieten (zoals 'fatty acyl'-CoA, ceramides, en diacylglycerol), die verstoringen in de insulinesignaleringscascade induceren welke leiden tot insulineresistentie (3). Alhoewel LCFA-opname in de skeletspier via passieve diffusie kan optreden, wordt het grotendeels actief opgenomen via transporteiwitten in de plasmamembraan (4). LCFA-transporterexpressie kan daarom een belangrijke factor zijn in het moduleren van de balans tussen LCFA-opname en -oxidatie. Momenteel zijn er drie membraangebonden lipidbindende eiwitten geïdentificeerd welke LCFA-opname mediëren in de skeletspier (4). 'Fatty acid translocase' (FAT/CD36, 88 kDa), is een geglycosyleerd integraal membraaneiwit met twee transmembraandomeinen met een grote betrokkenheid bij de LCFA-opname. Plasmamembraan-'fatty acid-binding protein' (FABPpm, 43 kDa) is perifeer gelokaliseerd op de plasmamembraan en identiek aan mitochondrieel aspartaataminotransferase. Het derde eiwit is 'fatty acid transport protein' (FATP, 63 kDa), een integraal eiwit met zes transmembraandomeinen. Tot nu toe zijn er zes isomeren van FATP geïdentificeerd waarvan FATP1 voornamelijk in de skeletspier tot expressie komt. De rol van deze vetzuurtransporteiwitten in de LCFA-opnameregulatie is nog niet volledig duidelijk, maar verscheidene studies

suggereren dat ze betrokken zijn bij de spieradaptatierepons bij inspanning, en tevens in de etiologie van insulineresistentie en/of type-2-diabetes (5). Het doel van deze studie was om inzicht te krijgen of skeletspier-LCFA-transporter-mRNA- en/of eiwitexpressie veranderd zijn bij type-2-diabetespatiënten. Vanwege de recente suggestie dat actieve personen als controle zouden moeten dienen bij de evaluatie van effecten van chronisch metabole ziekten op substraatmetabolisme (6), is de expressie van FAT/CD36, FABPpm en FATP bepaald in zowel gematchte sedentaire controles, als gezonde actieve mannen.

### Methoden

#### Studiegroep

10 type-2-diabetespatiënten (60±2 jaar), 10 gematchte sedentaire, normoglycemische controles (60±2jaar) en 10 leeftijd-gematchte langdurig getrainde mannen (57±1jaar) (tabel 1). Alle type-2-diabetespatiënten gebruikten bloedglucoseverlagende medicatie (metformin met of zonder sulfonylureaderivaten). Type-2-diabetesstatus was geverifieerd met een orale glucose tolerantietest (OGTT). Maximale zuurstofopnamecapaciteit (VO<sub>2</sub>max) werd bepaald via een cycle ergometer (Lode Excalibur, Groningen). De proefpersonen mochten geen inspannende fysieke activiteit verrichten vanaf 2 dagen voor afname van het biopt in de vastus lateralis. Spierweefsel werd vrijgemaakt van zichtbaar vet en direct ingevroren in vloeibaar stikstof en bewaard bij -80 °C voor analyse.

#### Westernblot-analyse

Voor immunoblotanalyse werd 10 µg (FAT/CD36 en FABPpm)- of 50 µg (FATP1)-membraaneiwit geladen op een 10% SDS-PAGE-gel (50 min, 200V) en vervolgens geblot op nitrocellulose (90 min 100 V). Membranen werden vervolgens geïncubeerd met 'block' middel, antigeenspecifieke antilichamen tegen FAT/CD36, FABPpm en FATP1, horseradishperoxidasegeconjugeerde secundaire antilichamen en vervolgens verder ontwikkeld met 'enhanced chemiluminescence' detectie (ECL).

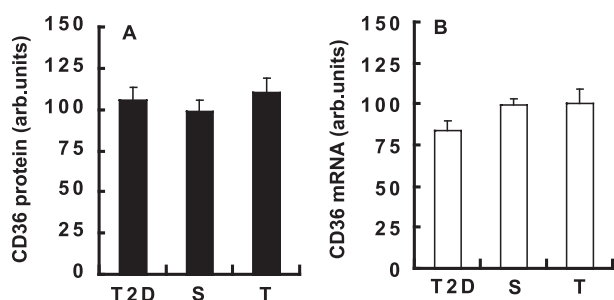
#### Statistiek

Data zijn gemiddelden ± SEM. 'Fatty acid transporter'-mRNA- en eiwitexpressie tussen groepen (P<0.05) is geanalyseerd met een 'one-factor analysis of variance' (ANOVA).

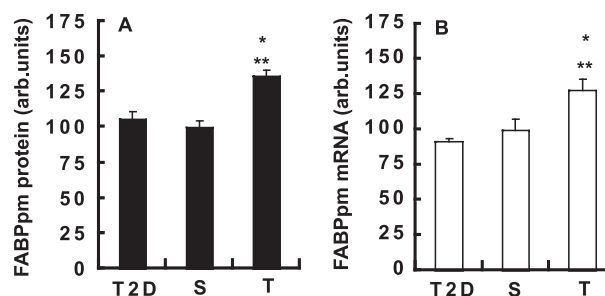
Departments of Movement Sciences<sup>1</sup>, Human Biology<sup>2</sup> and Molecular Genetics<sup>4</sup>, Maastricht University, Maastricht, the Netherlands. Institute of Clinical Research<sup>3</sup>, University of Nottingham Medical School, Nottingham, United Kingdom

**Tabel 1.** Gegevens van type-2-diabetespatiënten, sedentaire en getrainde controles. Data zijn gemiddelde  $\pm$  SEM. \* Significant verschillend van sedentaire controlegroep ( $P < 0.05$ ). # Significant verschillend van type-2-diabetesgroep ( $P < 0.05$ ).

	Type-2-diabetes N=10	Sedentaire controles n=10	Getrainde controles n=10
Leeftijd (jr.)	58,9 $\pm$ 2,5	60,0 $\pm$ 1,9	57,4 $\pm$ 0,8
Lengte (m)	1,79 $\pm$ 0,02	1,76 $\pm$ 0,01	1,75 $\pm$ 0,01
Gewicht (kg)	93, $\pm$ 4,4	86,9 $\pm$ 1,9	77,7 $\pm$ 1,8 #
BMI (kg.m <sup>2</sup> )	28,9 $\pm$ 1,2	27,5 $\pm$ 0,5	25,5 $\pm$ 0,7 #
Vet (%)	30,4 $\pm$ 1,8	28,9 $\pm$ 1,4	17,2 $\pm$ 11,2 *#
Vetvrije massa (kg)	64,5 $\pm$ 2,4	61,7 $\pm$ 1,6	64,2 $\pm$ 11,2
Basaal plasma-FA ( $\mu$ Mol / l)	626 $\pm$ 56	440 $\pm$ 34 #	519 $\pm$ 56
Basaal plasmagluucose (mM)	8,95 $\pm$ 0,43	5,54 $\pm$ 0,16 #	5,65 $\pm$ 0,08 #
Plasma glucose <sub>120min</sub> (mM)	16,81 $\pm$ 1,0	5,34 $\pm$ 0,49 #	5,28 $\pm$ 0,4 #
Basaal plasma-insuline (mU / l)	8,70 $\pm$ 1,01	7,86 $\pm$ 1,58	5,13 $\pm$ 0,56
Plasma-insuline <sub>120min</sub>	47,24 $\pm$ 9,61	48,40 $\pm$ 8,04	29,40 $\pm$ 6,34
HbA1c (%)	7,30 $\pm$ 0,3	5,83 $\pm$ 0,2 #	5,78 $\pm$ 0,1 #
VO <sub>2</sub> max (l / min)	2,9 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,1 #
Wmax (W)	205 $\pm$ 16	206 $\pm$ 18	300 $\pm$ 9 *#
Maximal heartrate (bpm)	161 $\pm$ 4	164 $\pm$ 7	172 $\pm$ 3
Diagnose diabetes (jr.)	7 $\pm$ 1	n.v.t.	n.v.t.



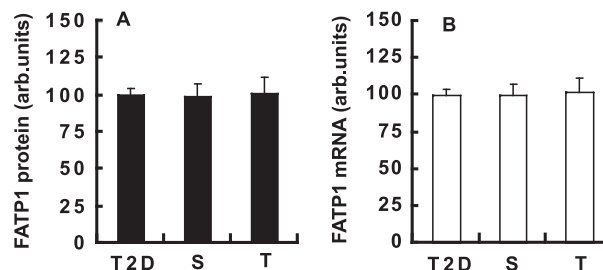
**Figuur 1.** Totale eiwit- (A) en mRNA-hoeveelheden (B) van FAT/CD36 in skeletspier van type-2-diabetespatiënten (T2D), leeftijd- en BMI-gematchte sedentaire controles (S) en langdurig getrainde actieve controles (T). Representatieve western blot is weergegeven. Data zijn weergegeven als gemiddelde  $\pm$  SEM. Geen significant verschil tussen de groepen.



**Figuur 2.** Totale eiwit- (A) en mRNA-hoeveelheden (B) van FABPpm in skeletspier van type-2-diabetespatiënten (T2D), leeftijd- en BMI-gematchte sedentaire controles (S) en langdurig getrainde actieve controles (T). Representatieve western blot is weergegeven. Data zijn weergegeven als gemiddelde  $\pm$  SEM. \* Significant hoger dan in diabetespatiënten en sedentaire controles;  $P < 0,01$ .

## Resultaten

Nuchtere bloedglucose, LCFA en HbA1c waren significant hoger in de type-2-diabetespatiënten vergeleken met de sedentaire en getrainde controlegroep (tabel 1). FAT/CD36-mRNA- en -eiwitexpressie waren niet significant verschillend tussen type-2-diabetes patiënten en de sedentaire en getrainde controlegroep (figuur 1). FABPpm-mRNA- en -eiwitexpressie waren significant hoger (28-37%) in de getrainde groep versus sedentaire controles en type-2-diabetespatiënten ( $P < 0,05$ ; figuur 2). FATP1-mRNA- en -eiwitexpressie waren niet significant verschillend tussen type-2-diabetespatiënten en de sedentaire en getrainde controlegroep (figuur 3). Er was geen significante correlatie tussen de verschillende transporterhoeveelheden in de spier (FAT/CD36-FABPpm,  $r^2 = 0.2433$ ), (FAT/CD36-FATP1  $r^2 = 0.1501$ ) en (FATP1-FABPpm,  $r^2 = 0.0389$ ).



**Figuur 3.** Totale eiwit- (A) en mRNA-hoeveelheden (B) van FATP1 in skeletspier van type-2-diabetespatiënten (T2D), leeftijd- en BMI-gematchte sedentaire controles (S) en langdurig getrainde actieve controles (T). Representatieve western blot is weergegeven. Data zijn weergegeven als gemiddelde  $\pm$  SEM. Geen significant verschil tussen de groepen.

## Discussie

In obesitas en/of type-2-diabetes is een structurele onbalans tussen LCFA-opname, -opslag en/of -oxidatie hoogst waarschijnlijk verantwoordelijk voor het ontstaan van insulineresistentie in de skeletspier (1). LCFA-transporters hebben een belangrijke rol in het moduleren van de balans tussen plasma-LCFA-beschikbaarheid, -opname en/of -oxidatie.

Farmaceutische interventie van de LCFA-transporterhoeveelheid zou in eerste instantie een effectieve manier zijn om plasma-LCFA-opname in de spier te verminderen, echter onze data laten zien dat totale LCFA-transporterhoeveelheid niet betrokken is bij metabole stoornissen. Om de LCFA-transporters functioneel te laten zijn dienen ze gelokaliseerd te zijn op de plasmamembraan. Interessant genoeg blijken alle transporters ook intracellulair voor te komen in endosomale pools (7, 8). Alle drie transporters blijken te transloceren vanuit deze endosomale pools naar de plasmamembraan voor opregulatie van de LCFA-opname op een vergelijkbare manier als de translocatie van de glucosetransporter GLUT4. Als conclusie laat deze studie zien dat er geen verschillen zijn in mRNA- en totale-eiwithoeveelheid van de 3 LCFA-transporters FAT/CD36, FABPpm en FATP1 in skeletspier van type-2-diabetespatiënten ten opzichte van sedentaire controles. Tevens zien we, in contrast met FAT/CD36 en FATP1, een significante opregulatie van FABPpm-mRNA en totale-eiwithoeveelheid in skeletspier van

getrainde mannen vergeleken met de sedentaire controles. Verder onderzoek naar de stoornissen in de bij de LCFA-transportertranslocatie betrokken signaalringscascades is daarom noodzakelijk.

## Referenties

1. Shulmann GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 17-6.
2. Loon LJC van, Goodpaster BH. Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch* 2006; 451: 606-16.
3. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 2002; 277: 32915-22.
4. Bonen A, Luiken JJ, Glatz JFC. Regulation of fatty acid transport and membrane transporters in health and disease. *Mol Cell Biochem* 2002; 239: 181-92.
5. Kiens B. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol Rev* 2006; 86: 205-43.
6. Booth FW, Lees SJ. Physically active subjects should be the control group. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38: 405-6.
7. Bonen A, Luiken JJ, Arumugam Y, Glatz JFC, Tandon NN. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem* 2000; 275: 14501-8.
8. Chabowski A, Coort SLM, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JFC, Luiken JJ, Bonen A. The subcellular compartmentation of fatty acid transporters is regulated differently by insulin and by AICAR. *FEBS Letters* 2005; 579: 2428-32.

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2007; 32: 270-272

## Detection of the CYP2D6\*6 allele by LightCycler real-time PCR

J.F.M. ROIJERS, L. JANSEN-HOUTEPEN, B.S. JAKOBS and E.M. van WIJK

The enzyme debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D6) is involved in the oxidative metabolism and elimination of many commonly used drugs (1,2,3). The CYP2D6 gene (GenBank, M33388) is highly polymorph and the addition alleles result in deficient, reduced, normal or increased enzyme activity. Alleles with complete deficiency, such as CYP2D6\*6, result in a poor metabolizer phenotype. CYP2D6\*6 has an allele frequency of 1% (2).

The aim of this study was to develop a real-time PCR followed by melting curve analysis, using hybridization probes with a highly sensitive, rapid and efficient approach to mutation detection. The LightCycler instrument (LC) was used for the detection of the

CYP2D6\*6 allele. To evaluate the reliability of genotyping with the LightCycler the samples were also analyzed with a tetra-primer PCR.

### Material and methods

DNA was extracted from 400 µl EDTA blood and eluted in 200 µl elution buffer according to the manufacturer's protocol with a MagNaPure Compact (Roche Diagnostics). Anonymous DNA samples with a known CYP2D6\*6 genotype were received from external laboratories. For the detection of the CYP2D6\*6 polymorphism, PCR primers amplified a 563 bp fragment of the CYP2D6 gene. During PCR the amplicon was detected using two specific hybridization probes, one labeled with fluorescein and one with LightCycler Red 640 (LCRed640). The absence of a CYP2D6\*6 allele introduces a destabilizing mismatch, which results in a decreased melting temperature. Primers and probes

---

*KCHL, Department of Clinical Chemistry, TweeSteden Hospital and St. Elisabeth Hospital, Tilburg*