REGULATION OF AKT ISOFORMS-AS160-GLUT4 AXIS BY PHLPP AND PP1 ISOFORMS AFFECTING NEURONAL INSULIN SIGNALING AND RESISTANCE.

MEDHA SHARMA

KUSUMA SCHOOL OF BIOLOGICAL SCIENCES

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY-DELHI

DECEMBER 2022

©Indian Institute of Technology Delhi (IITD), New Delhi, 2022

REGULATION OF AKT ISOFORMS-AS160-GLUT4 AXIS BY PHLPP AND PP1 ISOFORMS AFFECTING NEURONAL INSULIN SIGNALING AND RESISTANCE.

By

Medha Sharma

Kusuma School of Biological Sciences

Submitted
in fulfillment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy
to the

Indian Institute of Technology-Delhi

December 2022

CERTIFICATE

This is to certify that the thesis entitled "**Regulation of Akt isoforms-AS160-GLUT4 axis by PHLPP and PP1 isoforms affecting neuronal insulin signaling and resistance.**" being submitted by **Ms. Medha Sharma** to **Indian Institute of Technology-Delhi** for the award of the degree of "**Doctor of Philosophy**" is a record of bonafide research carried out by her, which has been prepared under my supervision and guidance in conformity with rules and regulations of Indian Institute of Technology-Delhi, India. The results prescribed in it have not been submitted in part or full to any other University or Institute for the award of any Degree/ Diploma.

Dr. Chinmoy Sankar Dey

Professor

Kusuma School of Biological Sciences

Indian Institute of Technology-Delhi

New Delhi –110016, India

Date: 21st December, 2022

Place: New Delhi

ACKNOWEGEMENTS

Undertaking this PhD has been a truly life-changing experience for me and it would not have been possible to do without the support and guidance that I received from many people.

I take this opportunity to express my sincere gratitude to my Ph.D. mentor **Prof. Chinmoy Sankar Dey** for his guidance and motivation throughout the course of my Ph.D research. I thank him for the contribution of his valuable time and funding that helped to carry out my research work. Sir's research aptitude, contagious enthusiasm and the scientific discussion with him made my research a great learning experience. He encouraged me to pursue my ideas and plan my experiments independently, in a disciplined manner that greatly helped me to grow as a researcher.

I am extremely thankful to my student research committee (SRC) members: **Prof. James Gomes, Prof. Vivekanandan Perumal, Prof. D Sundar** for providing me valuable suggestions that helped me improve my research. I would like to acknowledge the faculty members of Kusuma School of Biological Sciences: Prof. Tapan K. Chaudhuri, Prof. Aditya Mittal, Prof. Vivekanandan Perumal, Prof. Manidipa Banerjee, Dr. Archana Chugh, Dr. Ashok Patel, Prof. Amitabha Mukhopadhyay, Dr. Anita Roy, Prof. Bishwajit Kundu, Dr. Manoj Menon, Dr. Saran Kumar, Dr. Saurabh Raj, Dr. Shilpi Minocha, Dr. Tapan K. Nayak for providing the research facilities necessary to conduct the experiments.

My special thanks **to Dr. Prosenjit Mondal**, Indian Institute of Technology-Mandi, HP, India for providing ND HFD mice brain samples plasmids as kind gift; and **Dr. Kishore Parsa**, Dr. Reddy's Institute of Life Sciences (DRILS), Hyderabad, India for providing the PHLPP1 plasmid as gift that I required to fulfil my research objectives.

The work done in this thesis would not have been possible without the facility of fluorescence spectrophotometer that has been kindly provided by **Prof. Tapan K Chaudhari, Dr. Bishwajit Kundu**.

I would like to thank **Department of Biotechnology (DBT)** (grant number: PR32795/MED/122/229/2019)**,** Government of India for the research grant to Prof. Dey and also

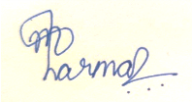
IIT-Delhi for the research funding. I acknowledge **Kusuma trust** for funding the department. I want to thank **Council of Scientific and Industrial Research (CSIR)**, Government of India for providing me Junior Research Fellowship and Senior Research Fellowship throughout the tenure of my PhD research.

Furthermore, I would like to acknowledge the support of my lab members: **Dr. Abhijeet, Dr. Aakash, Dr. Amita, Dr. Pallavi, Dr. Kapil, Dr. Shankari, Yamini, Devanshi and Ishita**. I want to thank them all for providing a great work environment in the laboratory.

I gratefully acknowledge the support provided by my friends **Yamini and Anjali** throughout the tenure of my Ph.D research. I thank them for patiently hearing all my joys and difficulties.

I want to thank the staff members of Kusuma School of Biological Sciences, Ms. Mini and Mr.Pradeep for helping in administrative processes.

My heartfelt gratitude to **my parents, my husband and my sisters** for their love, care and support which cannot be described in a few words. I thank them for standing by my side in my difficult times. They took care of everything that I required so that I could focus completely on my Ph.D. work. Last but not the least I thank the **Lord Almighty** for blessing me with amazing family and friends. I thank God for providing me the opportunity and strength to accomplish my Ph.D degree.



Medha Sharma

ABSTRACT

With the rapid increase in metabolic disorders worldwide, studying the signaling pathways and understanding the mechanism behind the metabolic perturbations is necessary. Insulin signaling is the primary pathway that regulates glucose metabolism of the body. Any perturbations in this pathway cause insulin resistance, which ultimately leads to various metabolic diseases. Amongst the top in metabolic diseases are Type-I, -II diabetes. Recent studies establish possible links of insulin-resistant diabetes with many neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (termed as Type-III diabetes), which occurs as a consequence of defective insulin signaling in brain.

Studies confirm that insulin signaling might branch out at the level of Akt to control several aspects of metabolic regulation. Akt is a serine/threonine kinase that belongs to AGC family, and comprises of three isoforms, Akt1, Akt2, and Akt3. Akt isoforms have been reported to play diverse functions in insulin signaling. Tissue-specific findings report predominant role of Akt2, paradoxical role of Akt1, and limited role of Akt3 in regulating glucose homeostasis in insulin sensitive tissues. Differential expression, differential subcellular localization, structural variations, regulatory partners, and different upstream stimulus may all complicate studying Akt isoform's specific role in insulin signaling. Although knockout and overexpression of isoform-specific studies have elucidated some specific and some redundant roles, these studies are mainly tissue-specific, with no studies in neuronal system. Akt isoforms have been reported to regulate neuronal development, neuronal maturation and outgrowth, polarization and axon branching, synapse formation and neuronal survival. However, no study has yet reported Akt isoform specific role in regulating neuronal insulin signaling and resistance.

There are several upstream phosphatases that regulate Akt isoforms. PHLPP (PH domain Leucine-rich repeat Protein Phosphatase) is one such phosphatase that has previously been studied amongst the primary regulator of Akt isoforms. PHLPP is a serine/threonine phosphatase having two isoforms, PHLPP1 and PHLPP2. PHLPP isoforms have been reported to regulate Akt isoforms in various tissue systems. PHLPP1 dephosphorylates Akt2 and Akt3, while PHLPP2 targets Akt1 and Akt3 as reported in various cancer cells. However, some paradoxical studies have also been reported in other tissue systems. Apart from regulating Akt isoforms, expression and differential regulation of PHLPP isoforms have also been reported to be affected under normal and pathological condition in insulin sensitive tissues. PHLPP1 and PHLPP2 mRNA and protein levels have been reported to be differentially affected in skeletal muscles, adipose tissue, liver and pancreas of obese/ diabetic humans/rodents. Role of PHLPP is well characterized in neurons, with diverse role in circadian clock, memory formation, brain injury and ischemia, etc. However, role of PHLPP isoforms in regulating Akt isoforms, thus affecting neuronal insulin signaling and -resistance is largely missing.

Another important phosphatase is PP1 (Protein Phosphatase 1). PP1 is a serine/threonine phosphatase that has been reported to regulate Akt. PP1 is a heteromeric protein composed of three isoforms of catalytic subunits naming PP1α, PP1β/δ and PP1γ interacting with >200 regulatory subunits. PP1 has been studied in insulin signaling in insulin sensitive tissue systems. However, the information is scattered, arising due to complex interaction of isoforms of catalytic subunits with various regulatory subunits in a tissue-specific manner. PP1 isoforms are highly expressed in neurons, with earlier studies reporting differential expression in different parts of the brain. However, possible role of PP1 in neuronal insulin signaling and resistance has not been reported.

Additionally, PP1 has been reported to regulate Akt, but Akt isoform specific information in any tissue system is largely missing.

Therefore, in the present study, attempts were made (1) to study the role of Akt isoforms in neuronal insulin signaling and resistance, (2) to study the role of PHLPP isoforms in regulating Akt isoforms in neuronal insulin signaling and resistance, and (3) to study the role of PP1 isoforms in regulating Akt isoforms in in neuronal insulin signaling and resistance.

The present work is divided into five chapters:

Chapter 1 Review of Literature: describes general introduction about insulin signaling, insulin resistance, neuronal insulin signaling and resistance. This chapter also elaborates on Akt isoforms, PHLPP isoforms, PP1 isoforms, their structure, activation, function, and regulation.

Chapter 2 Role of Akt isoforms in neuronal insulin signaling and resistance: This chapter demonstrates role of individual Akt isoforms in regulating downstream substrate AS160, ultimately affecting neuronal glucose uptake under neuronal insulin signaling and resistant conditions. It also explains the mechanism underlying Akt isoform specificity.

Chapter 3 Role of PHLPP isoforms in regulating Akt isoforms in neuronal insulin signaling and resistance: This chapter demonstrates role of individual PHLPP isoforms in regulating Akt isoforms, ultimately affecting AS160 and glucose uptake under neuronal insulin signaling and resistant conditions. It also explains the mechanism underlying PHLPP isoform specificity, and how it regulates Akt isoforms differentially.

Chapter 4 Role of PP1 isoforms in regulating Akt isoforms in neuronal insulin signaling and resistance: This chapter demonstrates role of individual PP1 catalytic subunits isoforms in regulating Akt isoforms, ultimately affecting AS160 and glucose uptake under neuronal insulin signaling and resistant conditions.

Chapter 5 Summary: summarizes the present study, proposing its significance and possible future implications.

सारांश

दुनिया भर में चयापचय संबंधी विकारों में तेजी से वृद्धि के साथ, सिग्नलिंग मार्गों का अध्ययन करना और चयापचय गड़बड़ी के पीछे के तंत्र को समझना आवश्यक है। इंसुलिन सिग्नलिंग प्राथमिक मार्ग है जो शरीर के ग्लूकोज चयापचय को नियंत्रित करता है। इस मार्ग में कोई गड़बड़ी इंसुलिन के प्रतिरोध का कारण बनती है, जो अंततः विभिन्न चयापचय रोगों की ओर ले जाती है। चयापचय रोगों में मुख्यत: टाइप- I, -II मधुमेह हैं। हाल के अध्ययनों ने अल्जाइमर रोग (जिसे टाइप- III मधुमेह कहा जाता है) जैसे कई न्यूरोडीजेनेरेटिव रोगों के साथ इंसुलिन-प्रतिरोधी मधुमेह के संभावित लिंक स्थापित किए हैं, जो मस्तिष्क में दोषपूर्ण इंसुलिन सिग्नलिंग के परिणामस्वरूप होता है।

अध्ययन इस बात की पुष्टि करते हैं कि मेटाबोलिक नियमन के कई पहलुओं को नियंत्रित करने के लिए इंसुलिन सिग्नलिंग अक्ट के स्तर पर फैल सकता है। अक्ट एक सेरीन/थ्रेओनाइन काइनेज है जो एजीसी परिवार से संबंधित है, और इसमें तीन इसोफोर्म, अक्ट 1, अक्ट 2 और अक्ट 3 शामिल हैं। अक्ट इसोफोर्म को इंसुलिन सिग्नलिंग में विविध कार्य करने के लिए सूचित किया गया है। ऊतक-विशिष्ट निष्कर्षों में अक्ट2 की प्रमुख भूमिका, अक्ट1 की विरोधाभासी भूमिका और इंसुलिन संवेदनशील ऊतकों में ग्लूकोज होमियोस्टेसिस को विनियमित करने में अक्ट3 की सीमित भूमिका की रिपोर्ट है। डिफरेंशियल एक्सप्रेशन, डिफरेंशियल सबसेलुलर लोकलाइजेशन, स्ट्रक्चरल वेरिएशन, रेगुलेटरी पार्टनर्स और अलग-अलग अपस्ट्रीम स्टिमुलस, ये सभी इंसुलिन सिग्नलिंग में अक्ट आइसोफॉर्म की विशिष्ट भूमिका का अध्ययन करना मुश्किल बना सकते हैं। हालांकि आइसोफॉर्म-विशिष्ट अध्ययनों के नॉकआउट और ओवरएक्प्रेशन ने कुछ विशिष्ट और कुछ निरर्थक भूमिकाओं को स्पष्ट किया है, ये अध्ययन मुख्य रूप से ऊतक-विशिष्ट हैं, जिनमें न्यूरोनल सिस्टम में कोई अध्ययन नहीं है। अक्ट इसोफोर्म को न्यूरोनल विकास, न्यूरोनल परिपक्वता और परिणाम, ध्रुवीकरण और एक्सोन ब्रांचिंग, सिनैप्स गठन और न्यूरोनल उत्तरजीविता को विनियमित करने के लिए सूचित किया गया है। हालांकि, अभी तक किसी भी अध्ययन ने न्यूरोनल इंसुलिन सिग्नलिंग और प्रतिरोध को विनियमित करने में अक्ट आइसोफॉर्म की विशिष्ट भूमिका की सूचना नहीं दी है।

कई अपस्ट्रीम फॉस्फेटेस हैं जो अक्ट आइसोफॉर्म को नियंत्रित करते हैं। पीएचएलपीपी (पीएच डोमेन ल्यूसीन-रिच रिपीट प्रोटीन फॉस्फेटेज़) एक ऐसा फॉस्फेट है जिसका पहले अक्ट इसोफोर्म के प्राथमिक नियामक के बीच अध्ययन किया गया है। पीएचएलपीपी दो इसोफोर्म, पीएचएलपीपी1 और पीएचएलपीपी2 वाले एक सेरीन / थ्रेओनाइन फॉस्फेट है। पीएचएलपीपी इसोफोर्म को विभिन्न ऊतक प्रणालियों में अक्ट

इसोफोर्म को विनियमित करने के लिए सूचित किया गया है। पीएचएलपीपी1 अक्ट 2 और अक्ट 3 को डेफोस्फोरीलात करता है, जबकि पीएचएलपीपी2 अक्ट 1 और अक्ट 3 को लक्षित करता है जैसा कि विभिन्न कैंसर कोशिकाओं में बताया गया है। हालांकि, अन्य ऊतक प्रणालियों में कुछ विरोधाभासी अध्ययन भी रिपोर्ट किए गए हैं। अक्ट इसोफोर्मस को विनियमित करने के अलावा, पीएचएलपीपी इसोफोर्म की अभिव्यक्ति और अंतर विनियमन भी इंसुलिन संवेदनशील ऊतकों में सामान्य और रोग संबंधी स्थिति के तहत प्रभावित होने की सूचना दी गई है। पीएचएलपीपी1 और पीएचएलपीपी2 एमआरएनए और प्रोटीन के स्तर को कंकाल की मांसपेशियों, वसा ऊतक, यकृत और अग्न्याशय के मोटापे / मधुमेह मनुष्यों / कृन्तकों में अंतर से प्रभावित होने की सूचना दी गई है। पीएचएलपीपी की भूमिका न्यूरॉन्स में अच्छी तरह से होती है, जिसमें सर्केडियन क्लॉक, मेमोरी फॉर्मेशन, ब्रेन इंजरी और इस्केमिया आदि में विविध भूमिका होती है। हालांकि, पीएचएलपीपी आइसोफॉर्म की अक्ट आइसोफॉर्म को विनियमित करने में भूमिका होती है, इस प्रकार न्यूरोनल इंसुलिन सिग्नलिंग और -रेसिस्टेंस को प्रभावित करना काफी हद तक लुप्त है।

एक अन्य महत्वपूर्ण फॉस्फेट पीपी1 (प्रोटीन फॉस्फेट 1) है। पीपी1 एक सेरीन/थ्रेओनाइन फॉस्फेटेज़ है जो अक्ट को विनियमित करने के लिए सूचित किया गया है। पीपी1 एक हेटेरोमेरिक प्रोटीन है जो पीपी1α, पीपी1β / δ और पीपी1γ नामकरण उत्प्रेरक सबयूनिट्स के तीन समस्थानिकों से बना है, जो> 200 नियामक सबयूनिट्स के साथ परस्पर क्रिया करता है। पीपी1 का इंसुलिन संवेदनशील ऊतक प्रणालियों में इंसुलिन संकेतन में अध्ययन किया गया है। हालाँकि, सूचना बिखरी हुई है, जो ऊतक-विशिष्ट तरीके से विभिन्न नियामक सबयूनिट्स के साथ उत्प्रेरक सबयूनिट्स के आइसोफॉर्म की जटिल बातचीत के कारण उत्पन्न होती है। पीपी1 इसोफोर्म न्यूरॉन्स में अत्यधिक अभिव्यक्त होते हैं, पहले के अध्ययनों में मस्तिष्क के विभिन्न भागों में अंतर अभिव्यक्ति की रिपोर्ट की गई थी। हालाँकि, न्यूरोनल इंसुलिन सिग्नलिंग और प्रतिरोध में पीपी1 की संभावित भूमिका की सूचना नहीं दी गई है।

इसके अतिरिक्त, पीपी1 को अक्ट को विनियमित करने के लिए सूचित किया गया है, लेकिन किसी भी ऊतक प्रणाली में अक्ट इसोफोर्म विशिष्ट जानकारी काफी हद तक लुप्त है।

इसलिए, वर्तमान अध्ययन में (1) न्यूरोनल इंसुलिन सिग्नलिंग और प्रतिरोध में अक्ट आइसोफॉर्म की भूमिका का अध्ययन करने के लिए प्रयास किए गए। (2) न्यूरोनल इंसुलिन सिग्नलिंग और प्रतिरोध में अक्ट आइसोफॉर्म को विनियमित करने में पीएचएलपीपी आइसोफॉर्म की भूमिका का अध्ययन करने के प्रयास किए गए और

(3) न्यूरोनल इंसुलिन सिग्नलिंग और प्रतिरोध में अक्ट इसोफोर्म को विनियमित करने में पीपी1 इसोफोर्म की भूमिका का अध्ययन करने के प्रयास किए गए।

वर्तमान कार्य को पाँच अध्यायों में विभाजित किया गया है:

अध्याय 1 साहित्य की समीक्षा: इंसुलिन सिग्नलिंग, इंसुलिन के बारे में सामान्य परिचय का वर्णन करता है। प्रतिरोध, न्यूरोनल इंसुलिन सिग्नलिंग और प्रतिरोध। यह अध्याय अक्ट आइसोफोर्म्स, पीएचएलपीपी आइसोफॉर्म्स, पीपी1 आइसोफॉर्म्स, उनकी संरचना, सक्रियण, कार्य और विनियमन पर भी विस्तार से बताता है।

अध्याय 2 न्यूरोनल इंसुलिन सिग्नलिंग और प्रतिरोध में अक्ट आइसोफोर्म्स की भूमिका: यह अध्याय डाउनस्ट्रीम सब्सट्रेट अस160 को विनियमित करने में व्यक्तिगत अक्ट आइसोफोर्म्स की भूमिका को प्रदर्शित करता है, अंततः न्यूरोनल इंसुलिन सिग्नलिंग और प्रतिरोधी स्थितियों के तहत न्यूरोनल ग्लूकोज तेज को प्रभावित करता है। यह अक्ट इसोफोर्म विशिष्टता के अंतर्निहित तंत्र की भी व्याख्या करता है।

अध्याय 3 न्यूरोनल इंसुलिन सिग्नलिंग और प्रतिरोध में अक्ट आइसोफॉर्म को विनियमित करने में पीएचएलपीपी आइसोफॉर्म की भूमिका:- यह अध्याय अक्ट आइसोफॉर्म को विनियमित करने में व्यक्तिगत पीएचएलपीपी आइसोफॉर्म की भूमिका को प्रदर्शित करता है, अंततः न्यूरोनल इंसुलिन सिग्नलिंग और प्रतिरोधी स्थितियों के तहत अस160 और ग्लूकोज तेज को प्रभावित करता है। यह पीएचएलपीपी इसोफोर्म विशिष्टता के अंतर्निहित तंत्र की भी व्याख्या करता है, और यह कैसे अक्ट इसोफोर्म को अलग-अलग नियंत्रित करता है।

अध्याय 4 न्यूरोनल इंसुलिन संकेतन और प्रतिरोध में अक्ट इसोफोर्म को विनियमित करने में पीपी1 इसोफोर्म की भूमिका: यह अध्याय अक्ट इसोफोर्म को विनियमित करने में अलग-अलग पीपी1 उत्प्रेरक सबयूनिट्स इसोफोर्म की भूमिका को प्रदर्शित करता है, अंततः न्यूरोनल इंसुलिन संकेतन और प्रतिरोधी स्थितियों के तहत अस160 और ग्लूकोज तेज को प्रभावित करता है।

अध्याय 5 सारांश: वर्तमान अध्ययन का सार प्रस्तुत करता है, इसके महत्व और भविष्य के संभावित प्रभावों का प्रस्ताव करता है।

TABLE OF CONTENTS

Chapter 1: INTRODUCTION

1.1 Insulin signaling

1.1.1 Insulin signaling pathway 1

1.1.2 Insulin resistance 3

1.1.3 Neuronal insulin signaling and insulin resistance 5

1.2 Akt and Akt isoforms

1.2.1 Akt isoform's structure and activation 6

1.2.2 Akt isoforms and downstream target AS160 9

1.2.3 Akt isoform-AS160-GLUT4 axis in Neuronal system 9

1.3 PHLPP and PHLPP isoforms

1.3.1 PHLPP structure and function 12

1.3.2 PHLPP and downstream target Akt 16

1.3.3 PHLPP Regulation 18

1.3.4 PHLPP in metabolism 20

1.4 PP1 and PP1 isoforms

1.4.1 PP1 structure and function 21

1.4.2 PP1 isoforms 22

1.4.3 PP1 and downstream target Akt isoforms 23

References 25

OBJECTIVES 35

CHAPTER 2: ROLE OF AKT ISOFORMS IN NEURONAL INSULIN SIGNALING AND INSULIN RESISTANCE 39

2.1 Introduction 41

2.2 Methodology

2.2.1 Cell culture 43

2.2.2 Gene Silencing by siRNA Transfection 43

2.2.3 Plasmid DNA transfection using Akt isoform specific plasmids 44

2.2.4 Immunoprecipitation 44

2.2.5 Cell lysis and Immunoblotting 44

2.2.6 Membrane fractionation 45

2.2.7 Mice whole brain tissue lysis and Immunoblotting 46

2.2.8 Glucose Uptake Assay 46

2.2.9 Confocal Microscopy 47

2.2.10 Replicates and Statistical Analysis 47

2.3 Results

2.3.1 Effect of inhibition of Akt on neuronal insulin signaling and glucose uptake 48

2.3.2 Effect of insulin on the expression and activation of Akt1, Akt2 and Akt3 in neuronal cells 48

2.3.3 Effect of silencing of one isoform, on expression and phosphorylation of the others 50

2.3.4 Effect of silencing of Akt isoforms, on expression and activation of AS160 (Akt Substrate of 160kDa) (Ser-588 and Thr-642) and glucose uptake 58

2.3.5 Effect of insulin on subcellular translocation of Akt1, Akt2, Akt3 and AS160 in neuronal system 75

2.3.6 Subcellular translocation of Akt1, Akt2, Akt3 and AS160 in mice whole brain tissue 85

2.3.7 Expression and activation of Akt1, Akt2 and Akt3 in insulin resistant neuronal cell 89

2.3.8 Effect of silencing of Akt isoforms in insulin resistant neuronal cells 89

2.3.9 Effect of insulin stimulation on the translocation of Akt isoforms and AS160 in insulin-resistant neuronal cells 92

2.3.10 Effect of Akt1, Akt2 and Akt3 over-expression on expression and activation of AS160 under insulin resistant condition 94

2.3.11 Effect of Akt1, Akt2 and Akt3 over-expression on neuronal

glucose uptake under insulin-resistant condition 97

2.4 Discussion

2.4.1 Compensatory role of Akt isoforms in regulating neuronal glucose uptake 101

2.4.2 Subcellular translocation determines Akt isoform specificity 106

2.4.3 Akt isoforms differentially regulate activation of AS160 110

2.4.4 Akt isoform specific role in neuronal insulin-resistance 111

2.5 References 113

CHAPTER 3: ROLE OF PHLPP ISOFORMS IN REGULATING AKT ISOFORMS IN NEURONAL INSULIN SIGNALING AND INSULIN RESISTANCE 119

3.1 Introduction 121

3.2 Methodology

3.2.1 Cell Culture 124

3.2.2 Gene Silencing by siRNA Transfection 124

3.2.3 Plasmid DNA transfection using PHLPP isoform specific plasmids 125

3.2.4 Immunoprecipitation 125

3.2.5 Cell lysis and Immunoblotting 126

3.2.6 Membrane fractionation 126

3.2.7 Mice whole brain tissue lysis and Immunoblotting 127

3.2.8 Glucose Uptake Assay 128

3.2.9 Confocal Microscopy 128

3.2.10 Replicates and Statistical Analysis 129

3.3 Results

3.3.1 Effect of insulin stimulation on expression of PHLPP1 and PHLPP2 in insulin signaling and insulin resistant neuronal cells 129

3.3.2 Expression of PHLPP1 and PHLPP2 in High Fat Diet (HFD) fed diabetic mice whole brain tissue lysate 132

3.3.3 Effect of PHLPP1 and PHLPP2 silencing on Akt isoforms and AS160 in insulin signaling and insulin resistant neuronal cells 132

3.3.4 Effect of PHLPP1 and PHLPP2 over-expression on Akt isoforms and AS160 in insulin signaling and insulin resistant neuronal cells 150

3.3.5 Effect of PHLPP1 and PHLPP2 silencing and over-expression on glucose uptake in insulin-resistant neuronal cells 157

3.3.6 Effect of insulin on expression and membrane localization of Scribble in insulin signaling and insulin resistant neuronal cells 164

3.3.7 Effect of Scribble silencing on membrane translocation of PHLPP1 and PHLPP2 170

3.3.8 Effect of Scribble silencing on neuronal GLUT4 translocation and glucose uptake in insulin signaling and insulin resistant neuronal cells 176

3.4 Discussion

3.4.1 Differential expression of PHLPP isoforms in neuronal insulin resistance 180

3.4.2 PHLPP isoforms regulate Akt isoforms differentially in neuronal insulin signaling and insulin resistance 182

3.4.3 PHLPP isoforms control Akt isoform mediated regulation of AS160 and glucose uptake in neuronal insulin signaling and insulin resistance 184

3.4.4 Scribble, the scaffolding protein, mediate PHLPP isoform specific regulation 186

3.5 References 190

CHAPTER 4: ROLE OF PP1 IN REGULATING AKT ISOFORMS IN NEURONAL INSULIN SIGNALING AND INSULIN RESISTANCE 195

4.1 Introduction 197

4.2 Methodology

4.2.1 Cell Culture 198

4.2.2 Mice whole brain tissue lysis 198

4.2.3 Gene Silencing by siRNA Transfection 199

4.2.4 Immunoprecipitation 200

4.2.5 Cell lysis and Immunoblotting 200

4.2.6 Glucose Uptake Assay 201

4.2.7 Confocal Microscopy 201

4.2.8 Replicates and Statistical Analysis 202

4.3 Results

4.3.1 Effect of insulin stimulation on expression of PP1α and PP1γ in insulin sensitive and insulin resistant neuronal cells 202

4.3.2 Effect of PP1α and PP1γ silencing on Akt isoforms and AS160 in insulin sensitive and insulin resistant neuronal cells 207

4.3.3 Effect of PP1α and PP1γ silencing on GLUT4 translocation and glucose uptake in insulin sensitive and insulin resistant neuronal cells 213

4.4 Discussion

4.4.1 PP1 and its isoforms in neuronal insulin signaling and insulin resistance 220

4.4.2 PP1γ regulates neuronal glucose uptake through Akt2-AS160 axis 221

4.5 References 224

CHAPTER 5: SUMMARY 227

Annexures 235

Annexure I: List of figures 236

Annexure II: List of reagents 239

Annexure III: List of instruments 243

Publications and conferences 245

Author's bio-data 249

LIST OF FIGURES

	Contents	Page number
1.1	Schematic diagram representing structure of Akt isoforms.	8
1.2	Schematic diagram representing structure of PHLPP isoforms.	14
2.1	Effect of Akt inhibition on neuronal insulin signaling and glucose. uptake and effect of insulin on Akt and its isoforms.	49
2.2	Akt isoforms siRNA optimisation in N2A cells.	54
2.3	Effect of silencing of single or double isoform, on expression and phosphorylation of other isoform in N2A cells.	59
2.4	Effect of Akt isoform silencing on AS160 in N2A cells.	64
2.5	Effect of Akt isoform silencing on glucose uptake.	71
2.6	Mechanism underlying Akt isoform specificity in neuronal cells.	76
2.7	Effect of insulin on subcellular translocation of GLUT4 and AS160.	83
2.8	Mechanism underlying Akt isoforms specificity in mice whole brain tissue.	86
2.9	Expression and activation of Akt1, Akt2 and Akt3, glucose uptake and subcellular translocation under insulin-resistant condition in neuronal cells	90
2.10	Effect of Akt1, Akt2 and Akt3 over-expression on expression and activation of AS160, and neuronal glucose uptake under insulin-resistant	

condition in neuronal cells 98

2.11 Schematic diagram depicting role of Akt isoforms in regulating neuronal insulin signaling 107

3.1 Expression of PHLPP1 and PHLPP2 under insulin resistant condition in neuronal cells 130

3.2 PHLPP isoforms siRNA optimisation in N2A cells 135

3.3 Effect of PHLPP1 silencing on PHLPP isoforms, Akt isoforms and AS160 in insulin signaling and insulin resistant condition in neuronal cells (N2A) 138

3.4 Effect of PHLPP2 silencing on PHLPP isoforms, Akt isoforms and AS160 in insulin signaling and insulin resistant condition in neuronal cells (N2A) 145

3.5 Effect of PHLPP1 over-expression on PHLPP isoforms, Akt isoforms and AS160 in insulin signaling and insulin resistant condition in neuronal cells (N2A 151

3.6 Effect of PHLPP2 over-expression on PHLPP isoforms, Akt isoforms and AS160 in insulin signaling and insulin resistant condition in neuronal cells (N2A) 155

3.7 Effect of PHLPP 1 or PHLPP2 over-expression on AS160 in insulin signaling and insulin resistant condition in neuronal cells (SH-SY5Y) 160

3.8 Effect of PHLPP isoform specific silencing or over-expression on glucose uptake 163

3.9 Effect of insulin on expression and membrane localization of Scribble in insulin signaling and insulin resistant neuronal cells, and Scribble siRNA optimization in N2A cells 169

3.10	Effect of Scribble silencing on Scribble, membrane localization of PHLPP isoforms in neuronal cells (N2A)	173
3.11	Effect of Scribble silencing on GLUT4 translocation and neuronal glucose uptake under insulin sensitive and-resistant condition (N2A)	177
3.12	Flowchart of PHLPP isoform specific regulation of Akt isoforms, AS160 and glucose uptake in insulin signaling and resistance in neuronal cells.	185
3.13	Schematic diagram depicting role of PHLPP isoforms in regulating neuronal insulin signaling.	188
4.1	Effect of insulin stimulation on expression of PP1α and PP1γ in insulin sensitive and insulin resistant condition	203
4.2	PP1 isoforms siRNA optimisation in N2A cells	208
4.3	Effect of PP1α and PP1γ silencing on Akt isoforms and AS160 in insulin sensitive and insulin resistant condition	210
4.4	Effect of PP1α and PP1γ silencing on Glucose uptake and GLUT4 translocation in insulin sensitive and insulin resistant condition	216
4.5	Schematic diagram depicting role of PP1 in regulating neuronal insulin signaling	222

LIST OF TABLES

Contents	Page number
Table 2.1: Effect of Akt isoform silencing (single and double) on phosphorylation of AS160 and neuronal glucose uptake (N2A cells)	74
Table 3.1: Effect of PHLPP isoform specific silencing on AS160 and glucose uptake (N2A)	167
Table 3.2: Effect of PHLPP isoform specific over-expression on AS160 and glucose uptake N2A)	167
Table 3.3: Effect of PHLPP isoform specific over-expression on AS160 and glucose uptake (SH-SY5Y)	167

ABBREVIATIONS

Akt	Protein kinase B
AS160	Akt Substrate of 160kDa
AU	Arbitrary unit
BCA	Bicinchoninic acid solution
BSA	Bovine serum albumin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGTA	Ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
GLUT4	Glucose transporter 4
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid
HFD	High Fat Diet
IB	Immunoblot
IP	Immunoprecipitation
kDa	Kilodalton
MF	MCDB 201 medium and Nutrient mixture F-12 Ham (1:1)
MFI	MCDB 201 medium and Nutrient mixture F-12 Ham (1:1) + 100 nM insulin
mM	Millimolar
μM	Micromolar
NBDG	(2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose)

ND	Normal Diet
nM	Nanomolar
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffer saline
PHLPP	Pleckstrin Homology (PH) domain Leucine-rich repeat Protein Phosphatases
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
PP2A	Serine/threonine protein phosphatase 2A
PP1	Protein Phosphatase 1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SE	Standard error
siRNA	Small interfering RNA
TBST	Tris-buffered saline tween-20
TEMED	N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine