

## 2 Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 2 (DM Typ 2) ist eine der häufigsten endokrin-metabolischen Störungen. Sie ist charakterisiert durch die Kombination einer verminderten Insulinwirkung (Insulinresistenz) mit einer verminderten Insulinsekretion. Bei einer bestehenden Insulinresistenz wird häufig eine Assoziation von Glukose- und Fettstoffwechselstörungen beobachtet, speziell konnte eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Insulinresistenz und einer Triglyzeridakkumulation in Nicht-Adipozyten (bezeichnet als Lipotoxizität) nachgewiesen werden. Diese Lipotoxizität könnte ein neuer Mechanismus für die pathobiochemischen Schlüsselphänomene des DM Typ 2 sein. Eine wichtige Bedeutung für den Zusammenhang zwischen Insulinsensitivität und Fettstoffwechsel besitzen die *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins* (SREBPs). Sie sind Hauptspieler im Lipidstoffwechsel und beeinflussen durch Veränderungen in ihrer intrazellulären Abundanz und Aktivität den zellulären Lipidgehalt und Insulinsensitivität. SREBPs koppeln die Expressionsrate multipler Gene an den zellulären Cholesteringehalt. Sie vermitteln den genregulatorischen Effekt von Insulin, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, in dem sie durch MAP-Kinasen-Kaskaden via Phosphorylierung reguliert werden. Diese posttranslationale Modifikation erhöht deutlich ihre transkriptionsaktivierende Wirkung.

In dieser Arbeit wurde die physiologische und pathobiochemische Bedeutung der Abundanz von SREBP-1 und Phosphorylierung durch MAP-Kinasen *in vivo* untersucht. Dafür wurden transgene Mausstämme mit C57Bl6-Hintergrund generiert, bei denen der Gehalt und die Struktur von SREBP-1 selektiv in einem insulinsensitiven Gewebe, der Leber, verändert wurde. In diesen Tieren werden unter der Kontrolle des Albuminpromotors leberspezifisch SREBP-1 $\alpha$ , -1 $c$  und eine Phosphorylierungsmutante von SREBP-1 $\alpha$  (bei der alle Phosphorylierungsstellen der ERK-, JNK- und p38-MAP-Kinasen ausgeschaltet wurden) überexprimiert. Dies geschieht bei normaler Stoffwechsellage, da der Albuminpromotor konstitutiv aktiv ist. Es wurden von der 6.-18. Lebenswoche jeweils 4 Männchen folgender transgener Mausstämme untersucht: Alb-SREBP-1 $\alpha$ , Alb-SREBP-1 $c$  und Alb-SREBP-1 $\alpha$   $\Delta$ P (Phosphorylierungsmutante). Als Kontrolle dienten entsprechende Männchen des Wildtypstamms C57Bl6. Die ersten Ergebnisse der in dieser Arbeit begonnenen phänotypischen Beschreibung der transgenen Mausstämme zeigen zum Zeitpunkt der 18. Lebenswoche nur sehr geringe optische Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Es sind keine massiven Triglyzeridakkumulationen zu beobachten, die Lebern sind mit denen der Kontrolltiere vergleichbar. Es zeigten sich jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen von SREBP-1 (-1 $\alpha$  und -1 $c$ ) und zwischen SREBP-1 $\alpha$  und seiner Phosphorylierungsmutante. Die größten Unterschiede zum Wildtyp zeigten Tiere von Alb-SREBP-1 $c$ , die mit 18 Wochen 2,5 g schwerer als C57Bl6 waren und die höchste Gewichtszunahme verzeichneten. Dabei verbrauchten sie am wenigsten Futter. Sie wiesen 1,5fach erhöhte Triglyzeridspiegel im Plasma auf. Außerdem waren wichtige Leberenzyme (GPT, GOT, GLDH) erhöht. Die Tiere von Alb-SREBP-1 $\alpha$   $\Delta$ P waren am leichtesten und verbrauchten das meiste Futter.

Die Auswertung der verschiedenen Proteinmuster der Mitochondrien aus der Leber der untersuchten Tiere im Alter von 18 Wochen zeigen komplexe Auswirkungen der leberspezifischen Überexpression der Transgene. Zum einen werden vorangegangene Beobachtungen bestätigt, daß SREBP-1 $c$  eine schwächere Isoform als SREBP-1 $\alpha$  ist. Zum anderen wird das erste Mal bestätigt, daß die Phosphorylierung als Regulationsmechanismus von SREBPs auch *in vivo* zu beobachten ist. Alle drei verwendeten SREBP-Konstrukte wirken durch ihre Überexpression auf die gleichen Zielgene, nur mit unterschiedlichem Ausmaß: SREBP-1 $\alpha$  am stärksten, gefolgt von Alb-SREBP-1 $\alpha$   $\Delta$ P (seiner Phosphorylierungsmutante) und danach Alb-SREBP-1 $c$ . Dabei werden die meisten Proteine in ihrer Abundanz vermindert. Es wurden 49% der in ihrer Abundanz veränderten Proteine identifi-

ziert. Ein großer Teil davon konnte direkt dem Lipidstoffwechsel zugeordnet werden. Es wurden jedoch auch einige Proteine anderer mitochondrialer Stoffwechselwege, die z. T. erheblichen Einfluß auf den Lipidstoffwechsel haben, identifiziert. Damit werden die Verzahnungen des Lipidstoffwechsels mit anderen Stoffwechselwegen deutlich. Dies kann zu einem besseren Verständnis multifaktorieller Erkrankungen, wie z. B. Diabetes mellitus Typ 2 führen.

## 2.1 Abstract

Type 2 diabetes is one of the most frequent endocrine metabolic disorders which is characterized by a combination of decreased insulinsensitivity (insulin resistance) with decreased insulin secretion. Insulin resistance there can often be associated with disorders of glucose- and lipid-metabolism, especially a positive correlation between the extent of insulin resistance and intracellular lipid accumulation in non-adipose tissues (called lipotoxicity). It is supposed that Lipotoxicity exhibits a new mechanism for the patho-biochemical phenomenon of DM type 2. SREBPs play a fundamental role in the relationship of insulin sensitivity and lipid metabolism. In lipid metabolism they can affect the lipid content and insulinsensitivity by their intracellular abundance and activity. SREBPs link the expression of multiple genes to the cellular content of cholesterol. Major signalling pathways couple transcription factors to extracellular stimuli (like insulin, growth factors and cytokines) by phosphorylation via MAP-kinases cascades. These posttranslational modification increases *trans*-activity of SREBPs.

To get further insights into physiology and pathobiochemistry of SREBP-1 and their phosphorylation via MAP-kinases we generated different transgenic mice models in which abundance and structure of SREBP-1 selectively altered in an insulin sensitive tissue. Under the control of albumin promotor liver-specific overexpression of constitutively active N-terminal domains of SREBP-1a, 1c and a SREBP-1a mutant in which all phosphorylation sites for MAP-kinases are mutated could be detected. 4 male of each transgenic mouse model (Alb-SREBP-1a, Alb-SREBP-1c and Alb-SREBP-1a  $\Delta$ P) and wild type C57Bl6 as littermate-control were tested from 6.-18. week of life. First results of the phenotypical descriptions started in this work show that the transgenic mice exhibit only slight visual differences in comparison to the wild type. No massive lipid accumulations can be observed, the livers are comparable to the ones of the littermate controls. But there are differences between the isoforms of SREBP-1 (-1a and -1c) and between SREBP-1a and the phosphorylation mutant. The greatest differences to the wild type showed the animals of Alb-SREBP-1c. After 18 weeks, they were 2,5 g heavier than C57Bl6 and showed the highest weight gain combined with the lowest consumption of food. Plasma triglycerides were increased by 1,5fold. Liver enzymes (GPT, GOT, GLDH) were also increased. The animals of Alb-SREBP-1a  $\Delta$ P were the leanest and showed the highest consumption of food.

Analyses of different protein patterns of mitochondria from livers of the tested animals at age of 18 weeks showed complex consequences of transgenic overexpression. On one hand earlier studies, that SREBP-1c is weaker than SREBP-1a are confirmed, on the other hand it could be approved for the first time that phosphorylation is a regulatory mechanism of SREBPs, which appears to play a role *in vivo*. Each of the three SREBP constructs used had effects on the same genes but in different scale: SREBP-1a was the strongest activator, followed by SREBP-1a  $\Delta$ P (phosphorylation mutant). The weakest activator is SREBP-1c. Most proteins were decreased in their abundance. 49% of the proteins altered in abundance were identified. Most of them could be assigned to lipid metabolism. There were also proteins of other mitochondrial pathways identified, some of which have great influence on lipid metabolism. Thus, SREBP-mediated crosslinking between lipid metabolism and other metabolic pathways become evident. These observations can lead to a better understanding of multifactorial multigenic diseases, e. g. type 2 diabetes.