

**Proteomanalyse
von Peroxisomen der Mausleber
und ihre Beeinflussung durch
Sterol Regulatory Element Binding Protein-1
(SREBP-1)**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sonja Hartwig
aus Köln

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Brüning
Prof. Dr. D. Müller-Wieland

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Februar 2006

Zusammenfassung

Die *sterol element binding proteins* (SREBPs) sind Transkriptionsfaktoren, die cholesterinabhängig den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel regulieren. Damit spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung verschiedener metabolisch bedingter kardiovaskulärer Risikofaktoren, wie z.B. Insulinresistenz, Fettstoffwechselerkrankungen und Veränderungen der Fettverteilung. In unserer Arbeitsgruppe konnte erstmalig gezeigt werden, daß SREBPs, neben der Regulation durch den Cholesteringehalt, auch Substrate der MAP-Kinasekaskaden sind und durch Phosphorylierung die Transaktivität gesteigert werden kann. Um die physiologische und klinische Bedeutung, sowie den Einfluß von SREBP-1 auf die Regulation des Leberstoffwechsels näher zu untersuchen, wurden transgene Mäuse generiert, welche gewebespezifisch die N-terminale Domäne (NT) der beiden Isoformen (SREBP-1a oder -1c) und verschiedene Mutationskonstrukte, z.B. eine bei der alle Hauptphosphorylierungsstellen ausgeschaltet sind (SREBP-1a NT Δ P), exprimieren.

Für die Proteomanalysen dieser Arbeit wurden die Peroxisomen ausgewählt, da sie neben den Mitochondrien das einflußreichste Organell des zellulären Lipidstoffwechsels sind. Die peroxisomalen Proteine katalysieren zum einen wichtige Schritte in der Biosynthese komplexer Lipide und zum anderen nimmt das peroxisomale β -Oxidationssystem eine Schlüsselstellung im oxidativen Abbau verschiedenster z.T. toxischer Lipide ein. Somit stellen sie möglicherweise ein Bindeglied zwischen dem zellulären Lipidstoffwechsel, der Insulinsensitivität und dem Energiehaushalt dar.

Für die Proteomanalysen der Leberperoxisomen wurden drei verschiedene transgene Mausgenotypen, welche SREBP-1a NT, SREBP-1c NT oder SREBP-1a NT Δ P unter Kontrolle eines Albuminpromotors leberspezifisch exprimieren, sowie C57Bl6 als Wildtypkontrolle herangezogen. Auf Genomebene konnte das jeweilige Transgen nachgewiesen und auf Proteinebene konnte zusätzlich die Leberspezifität gezeigt werden. Im folgenden wurden die phänotypische Entwicklung dieser Mauslinien in kontrollierter Haltung über 12 Wochen, d.h. von der 7.-19. Lebenswoche, beobachtet. Im Alter von 18 Wochen, zeigten die Alb-SREBP-1a- und die Alb-SREBP-1c-Mäuse bei der Sektion, deutliche Unterschiede in der Menge und Verteilung des Fettgewebes im Vergleich zum Wildtyp (C57Bl6) sowie eine durch Lipidakkumulation vergrößerte Leber. Hingegen zeigten die Alb-SREBP-1a Δ P-Mäuse diesen Phänotyp nicht. Betrachtet man die Energieeffizienz, als Maß für den Umsatz von aufgenommener Energie in eine Körpergewichtszunahme, zeigte sich in den Alb-SREBP-1c-Mäusen ein um 58% gesteigerter Wert gegenüber dem Wildtyp, wohingegen dies in den Mäusen der beiden SREBP-1a-Konstrukte nicht der Fall war.

In dieser Arbeit wurde, für die Analyse der peroxisomalen Proteinpattern, eine Methode zur Peroxisomenaufreinigung aus Mausleber etabliert, die auf funktionaler Ebene mit Enzymassays, auf Proteinebene mit Western-Blots und auf morphologischer Ebene anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen dokumentiert wurde.

Für die Proteinpatternanalyse der isolierten Leberperoxisomen der verschiedenen Genotypen wurde mit der Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (DIGE™)-Technologie eine hochsensitive, valide Analyse für das Proteinprofiling ausgewählt, mit der durch das

Multiplexing auch geringe Abundanzunterschiede detektiert werden können. Nach erfolgter 2D-Elektrophorese wurden mit Hilfe des Programms Proteomweaver verschiedenen Genotypen in der Abundanz von mehr als 1600 Proteinspots des Peroxisomenproteoms pH 4-9 miteinander verglichen.

Die Proteinspots, welche einen Abundanzunterschied in einem Vergleich der Genotypen zeigten, wurden in einer Dreifachbestimmung mit einem UltraFlex TOF/TOF Massenspektrometer analysiert und die erhaltenen Peptidmassenfingerprint (PMF)-Spektren wurde „on the fly“ mit der SwissProt Datenbank (<http://ca.expasy.org/sprot/>) abgeglichen. Jeder in der Abundanz veränderte Proteinspot galt nur dann als identifiziert, wenn er mindestens in zwei Gelen dasselbe Ergebnis lieferte und/oder durch ein MS/MS-Spektrum bestätigt wurde. Die Identifizierungsquote lag in der vorliegenden Untersuchung bei 40%.

Interessanterweise korrelierte der deutliche Phänotyp der Alb-SREBP-1a-Mäuse, in Bezug auf die Fettverteilung und Vergrößerung der Leber nicht mit einer hohen Anzahl von Abundanzveränderungen im peroxisomalen Proteinpattern, denn es waren nur 24 veränderte Proteinspots zu detektieren. Wohingegen die Alb-SREBP-1c-Mäuse deutlich mehr Abundanzveränderungen im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Und obwohl sich die beiden Isoformen nur um 24 Aminosäuren unterscheiden, waren auch im direkten Vergleich mit Alb-SREBP-1a noch 83 Abundanzunterschiede zu detektieren.

Durch das Ausschalten der drei Hauptphosphorylierungstellen von SREBP-1a wurde die fundamentale Bedeutung der Phosphorylierung deutlich, denn im peroxisomalen Proteom der Alb-SREBP-1a Δ P-Mäuse waren im direkten Vergleich zu Alb-SREBP-1a mehr als 300 Abundanzunterschiede zu verzeichnen, die möglicherweise ursächlich für den anderen Phänotyp sind.

Werden die erhobenen Daten zusammengeführt, zeigen sich deutliche Hinweise dafür, daß der Transkriptionsfaktor SREBP-1 nicht nur die bekannten lipogenen Stoffwechselwege, sondern auch fettabbauende Stoffwechselwege beeinflusst. Dieser Einfluß wird vermutlich über die Aktivierung eines bisher unbekanntem Faktor X oder einer ganzen Signalkette, welcher wiederum lipidabbauende Stoffwechselweg hemmt, reguliert. Bedeutsam daran ist, daß die Regulation dieses Faktors durch SREBP-1 abhängig vom Phosphorylierungszustand zu sein scheint.