

Aus der Abteilung für Endokrinologie, Diabetes und
Ernährungsmedizin, Campus Benjamin Franklin,
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Regulation des Transkriptionsfaktors Carbohydrate Responsive
Element Binding Protein (ChREBP) in Hep G2-Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Angela Dorothea Sinn

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Pfeiffer
 2. Prof. Dr. med. J. Seufert
 3. Prof. Dr. med. H. Lehnert

Datum der Promotion: 09.09.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung und Aufgabenstellung.....	1
1.1 ChREBP (Carbohydrate responsive element binding protein)	4
1.1.1 Gen.....	4
1.1.2 Protein	4
1.1.3 Funktion	6
1.1.4 Regulation	11
1.2 Erkrankungen, die mit ChREBP in Zusammenhang stehen könnten	34
1.2.1 Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2.....	34
1.2.2 Nicht-alkoholische Fettleber-Erkrankung (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)	36
1.2.3 Williams-Beuren-Syndrom (WBS).....	39
1.2.4 Experimente mit ChREBP-Knockout.....	40
1.3 Aufgabenstellung.....	41
2 Methodik	43
2.1 Materialien.....	43
2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien	43
2.1.2 Restriktionsenzyme	44
2.1.3 Kulturmedien.....	45
2.1.4 Reaktionskits.....	45
2.1.5 Primer für RT-PCR.....	45
2.1.6 Antikörper für Western Blots.....	46
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	46
2.1.8 Geräte und Hilfsmittel.....	47
2.1.9 Software.....	48
2.1.10 Puffer und Lösungen	49
2.2 Methoden	51
2.2.1 PCR und Agarose-Gel-Elektrophorese (Vorversuche)	51
2.2.2 Zellkultur, Kulturbedingungen und Passagierung	52

Inhaltsverzeichnis

2.2.3 Stimulation der Hep G2-Zellen	53
2.2.4 Experimente mit ChREBP-Protein.....	54
2.2.5 Experimente mit ChREBP-mRNA	58
2.2.6 Statistische Auswertung.....	63
3 Ergebnisse	65
3.1 Vorversuche, 1. Teil: Klonierung von ChREBP mittels PCR und Gel-Elektrophorese.....	65
3.2 Vorversuche, 2. Teil: Testung der Antikörper gegen ChREBP an Mäuseleber-Proben.....	65
3.3 Vorversuche, 3. Teil: Western Blots.....	65
3.3.1 Stimulation mit Glucose.....	66
3.3.2 Stimulation mit Insulin	67
3.3.3 Stimulation mit Glucagon.....	68
3.3.4 Stimulation mit Fettsäuren.....	69
3.4 Hauptversuche, 1. Teil: Western Blots.....	70
3.4.1 Stimulation mit Glucose für zwei Stunden.....	71
3.4.2 Stimulation mit Glucose für 24 Stunden	71
3.4.3 Stimulation mit Fructose für zwei Stunden	72
3.4.4 Stimulation mit Fructose für 24 Stunden	73
3.4.5 Stimulation mit Glucagon für zwei Stunden.....	73
3.4.6 Stimulation mit Glucagon für 24 Stunden	74
3.5 Hauptversuche, 2. Teil: RNA-Extraktion und RT-PCR.....	75
3.5.1 Stimulation mit Glucose für vier Stunden.....	78
3.5.2 Stimulation mit Glucose für 24 Stunden	78
3.5.3 Stimulation mit Fructose für vier Stunden	79
3.5.4 Stimulation mit Fructose für 24 Stunden	79
3.5.5 Stimulation mit Glucagon für vier Stunden.....	80
3.5.6 Stimulation mit Glucagon für 24 Stunden	80
3.5.7 Stimulation mit Insulin für vier Stunden	81
3.5.8 Stimulation mit Insulin für 24 Stunden.....	81
3.5.9 Vergleich der Housekeeping-Gene Actin und GAPDH zur Quantifizierung von ChREBP.....	82
4 Diskussion	83
4.1 Effekte von Glucose auf ChREBP	83

Inhaltsverzeichnis

4.1.1 Kurzzeit-Einfluss (zwei bzw. vier Stunden).....	83
4.1.2 Langzeit-Einfluss (24 Stunden)	87
4.2 Effekte von Fructose auf ChREBP	89
4.2.1 Kurzzeit-Einfluss (zwei bzw. vier Stunden).....	89
4.2.2 Langzeit-Einfluss (24 Stunden)	91
4.3 Effekte von Glucagon auf ChREBP	95
4.3.1 Kurzzeit-Einfluss (zwei bzw. vier Stunden).....	95
4.3.2 Langzeit-Einfluss (24 Stunden)	99
4.4 Effekte von Insulin auf ChREBP.....	100
4.4.1 Kurzzeit-Einfluss (zwei bzw. vier Stunden).....	100
4.4.2 Langzeit-Einfluss (24 Stunden)	103
4.5 Effekte von Fettsäuren auf ChREBP	103
4.5.1 Kurzzeit-Einfluss (zwei Stunden).....	103
4.5.2 Langzeit-Einfluss (20 Stunden)	104
4.6 Einfluss der Stimulationszeit auf die Regulation von ChREBP	105
4.7 Vergleich der Housekeeping-Gene Actin und GAPDH.....	106
4.8 Eignung von Hep G2-Zellen.....	107
4.9 Zusammenfassende Diskussion.....	107
4.10 Übertragung in den physiologischen Kontext und weiterer Forschungsbedarf.....	111
5 Zusammenfassung.....	113
6 Literaturverzeichnis.....	116
7 Danksagung.....	125
8 Lebenslauf von Angela Dorothea Sinn	126
9 Erklärung.....	127
10 Appendix	128
1. Protein-Extraktion mit dem „Nuclear Extract Kit“ von Active Motif	128
2. RNA-Extraktion mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ von Roche	129
3. RNA-Extraktion mit dem „SV Total RNA Isolation System“ von Promega.....	130

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-Coenzym A-Carboxylase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACL	Adenosin-Triphosphat-Citrat-Lyase
AMP	Adenosin-Monophosphat
AMPK	Adenosin-Monophosphat-aktivierte Proteinkinase
Aqua a. i.	Aqua ad iniectabilia
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-Triphosphat
bHLH-LZ	Basic helix-loop-helix-leucine zipper
BP	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
ca.	circa
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid, komplementäre DNA
ChoRE	Carbohydrate responsive element
ChREBP	Carbohydrate responsive element binding protein
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonuclein-Säure
DNL	De novo-Lipogenese
FAS	Fatty acid synthase, Fettsäure-Synthase
FOXA/FOXO	Forkhead box-Transkriptionsfaktor der Subklasse A bzw. O
FXR	Farnesoid X receptor
g	1. Gramm; 2. Erdschwerebeschleunigung: $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6Pase	Glucose-6-Phosphatase
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GK	Glucokinase
GLUT	Glucose-Transporter
GPAT	Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase
GRACE	Glucose-response activation conserved element
GSM	Glucose sensing module
HNF	Hepatic nuclear factor
Insig	Insulin-induced gene

Verzeichnisse

IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
kDa	Kilo-Dalton
LID	Low glucose inhibitory domain
L-PK	Leber-Pyruvatkinase
LXR	Liver X receptor, Leber-X-Rezeptor
LXRE	Liver X receptor response element
MCR	Mondo conserved region
Mlx	Max-like protein X
mRNA	Messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonuclein-Säure
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease, Nicht-alkoholische Fettleber-Erkrankung
NEFA	Non-esterified fatty acids, nicht veresterte Fettsäuren
NES	Nuclear export signal
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NF-Y	Nuclear factor-Y
NLS	Nuclear localization signal
NTC	Non-template control, Kontrolle ohne „Vorlage“ (DNA, RNA)
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PKA	Proteinkinase A
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPP	Pentose phosphate pathway, Pentosephosphatweg
PPRE	Peroxisome proliferator response element
PUFAs	Polyunsaturated fatty acids, mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RAR	Retinoic acid receptor
RNA	Ribonucleic acid, Ribonuclein-Säure
ROS	Reactive oxygen species, reaktive Sauerstoff-Spezies
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RXR	Retinoid X receptor
SCAP	SREBP cleavage activating protein
SCD-1	Stearoyl-Coenzym A-Desaturase-1
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate, Natrium-Dodecyl-Sulfat
SRE	Sterol regulatory element
SREBP-1c	Sterol regulatory element binding protein-1c

Verzeichnisse

TAG	Triacylglycerine
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
WBS	Williams-Beuren-Syndrom
X5P	Xylulose-5-Phosphat
ZIP-like	Leucine zipper-like
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl durch ChREBP induzierter Zielgene	6-8
Tabelle 2: Wichtige Phosphorylierungsstellen des ChREBP-Proteins bei Mensch und Maus.....	12
Tabelle 3: Bei der RT-PCR verwendete Primer	45-46
Tabelle 4: Bei den Western Blots verwendete Erst-Antikörper	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stoffwechselwege von Glucose in der Leber	2
Abbildung 2: Struktur des humanen ChREBP-Proteins, Isoform α	5
Abbildung 3: Regulation von ChREBP auf posttranslationaler Ebene	13
Abbildung 4: Der Transport von ChREBP in den Nucleus und ins Cytosol	15
Abbildung 5: Die Regulation von ChREBP in der Leber	17
Abbildung 6: Der Einfluss von Glucose und Insulin auf ChREBP, LXR, SREBP-1c und einige von deren Zielgenen.....	18
Abbildung 7: Metabolismus der Monosaccharide Glucose, Fructose, Galactose und Mannose und deren Verbindung zur Glycolyse.....	19
Abbildung 8: Signale, die die Aktivität von FOXO-Transkriptionsfaktoren beeinflussen.....	28
Abbildung 9: Die Rolle von FOXO1 und FOXA2 im Insulinsignalweg	28-29
Abbildung 10: Auswirkungen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) auf ChREBP	33
Abbildung 11: Herkunft von Fettsäuren für TAG in der Leber bei Gesunden und bei NAFLD	37-38
Abbildung 12: Experimente mit Knockout von ChREBP und Auswirkungen auf die Pathophysiologie im Rahmen des metabolischen Syndroms	41
Abbildung 13: Ergebnis der Testung zweier Primerpaare für ChREBP-cDNA	60
Abbildung 14: Originalbild und inverses Bild einer Agarose-Gel-Elektrophorese mit verschiedenen Proben nach Durchführung der qRT-PCR.....	63
Abbildung 15: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 0 g, 1 g und 4,5 g/l Glucose im Medium DMEM.....	66
Abbildung 16: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 1 g, 2 g und 4 g/l Glucose im Medium EMEM.....	66

Verzeichnisse

Abbildung 17: ChREBP-Protein in Hep G2 nach 20stündiger Stimulation mit 0 g, 1 g und 4,5 g/l Glucose im Medium DMEM	66
Abbildung 18: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 1 µmol/l Insulin im Medium EMEM.....	67
Abbildung 19: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon im Medium EMEM	68
Abbildung 20: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon im Medium DMEM	68
Abbildung 21: ChREBP-Protein in Hep G2 nach 20stündiger Stimulation mit 67 nmol/l Glucagon im Medium EMEM	68
Abbildung 22: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 0,4 % Palmitinsäure im Medium EMEM.....	69
Abbildung 23: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 0,4 % Ölsäure im Medium EMEM.....	69
Abbildung 24: Beispiele für Ergebnisse der Western Blots.....	70
Abbildung 25: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 2 g/l Glucose.....	71
Abbildung 26: ChREBP-Protein in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 2 g/l Glucose	71-72
Abbildung 27: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 1 g/l Fructose.....	72
Abbildung 28: ChREBP-Protein in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 1 g/l Fructose	73
Abbildung 29: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon.....	73-74
Abbildung 30: ChREBP-Protein in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon	74
Abbildung 31: Beispiele für Standard-Kurven der mRNA von ChREBP und Actin in Hep G2.....	75
Abbildung 32: Beispiele für Amplifikations-Kurven der Standards und NTCs der mRNA von ChREBP und Actin in Hep G2.....	75-76
Abbildung 33: Beispiele für Amplifikations-Kurven der Proben der mRNA von ChREBP und Actin in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit verschiedenen Substanzen.....	76
Abbildung 34: Beispiele für Dissoziations-Kurven der Standards und NTCs der mRNA von ChREBP und Actin in Hep G2.....	77
Abbildung 35: Beispiele für Dissoziations-Kurven der Proben der mRNA von ChREBP und Actin in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit verschiedenen Substanzen.....	77
Abbildung 36: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach vierstündiger Stimulation mit 2 g/l Glucose	78
Abbildung 37: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 2 g und 4,5 g/l Glucose.....	78
Abbildung 38: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach vierstündiger Stimulation mit 1 g/l Fructose	79
Abbildung 39: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 1 g/l Fructose.....	79
Abbildung 40: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach vierstündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon	80
Abbildung 41: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon	80
Abbildung 42: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach vierstündiger Stimulation mit 1 µmol/l Insulin ...	81
Abbildung 43: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 1 µmol/l Insulin	81
Abbildung 44: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit verschiedenen Substanzen, normalisiert auf die Housekeeping-Gene Actin bzw. GAPDH.....	82

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Um ihren Energiehaushalt im Gleichgewicht zu halten, müssen lebende Organismen ihren Metabolismus kontinuierlich an Qualität und Quantität der verfügbaren Nahrung anpassen [1]. Weil in Fastenperioden die Energieaufnahme nicht zur Erfüllung der Energieanforderungen ausreicht, muss in Perioden mit ausreichendem Energieangebot überschüssige Energie in speicherbare Formen verwandelt werden [2]. Bei Säugetieren stellen Triacylglycerine (TAG) die Hauptspeicherform für die langfristige Energiespeicherung dar [2].

Essentiell für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase ist bei Säugetieren die Leber. Sie hat die Fähigkeit, aufgenommene Kohlenhydrate zu Glucose abzubauen und diese nach Polymerisierung als Glycogen zu speichern. Sind die hepatischen Glycogenspeicher nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit gefüllt, baut die Leber überschüssige Glucose in der Glycolyse zu Pyruvat und weiter zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) ab. Acetyl-CoA dient als Substrat für die De novo-Lipogenese (DNL), die Neu-Synthese von Fettsäuren. Im Anschluss können die Fettsäuren zusammen mit einem Glycerolgerüst zu TAG synthetisiert werden. Die zur Herstellung von TAG verwendeten Fettsäuren können außer der hepatischen DNL auch dem Pool an nicht-veresterten Fettsäuren (NEFA) im Blutplasma entstammen; dieser setzt sich einerseits aus Fettsäuren zusammen, die durch Lipolyse im Fettgewebe freigesetzt oder im Fettgewebe neu synthetisiert wurden, andererseits aus über die Nahrung aufgenommenen Fettsäuren. Synthetisierte TAG werden in der Leber gespeichert, zu einem späteren Zeitpunkt in der Beta-Oxidation abgebaut oder, verpackt in VLDL, in andere Gewebe exportiert, wo sie als Energielieferanten dienen oder, besonders im Fettgewebe, als TAG gespeichert werden [3]. In Fastenzeiten hält die Leber die Glucose-Produktion durch Glycogenolyse und Gluconeogenese aufrecht, da insbesondere das Gehirn auf Glucose angewiesen ist, oder sie produziert alternative Energiequellen in Form von Ketonkörpern, während Stoffwechselwege, die Glucose verbrauchen, wie Glycolyse, Glycogensynthese und Lipogenese, supprimiert werden [1, 4]. Glucose spielt im Organismus eine essentielle Rolle, vor allem als Energielieferant – durch Glycolyse und oxidative Phosphorylierung entsteht Adenosin-Triphosphat (ATP) – und als Hauptquelle für Acetyl-CoA zur Synthese von Fettsäuren [2, 5].

Einleitung

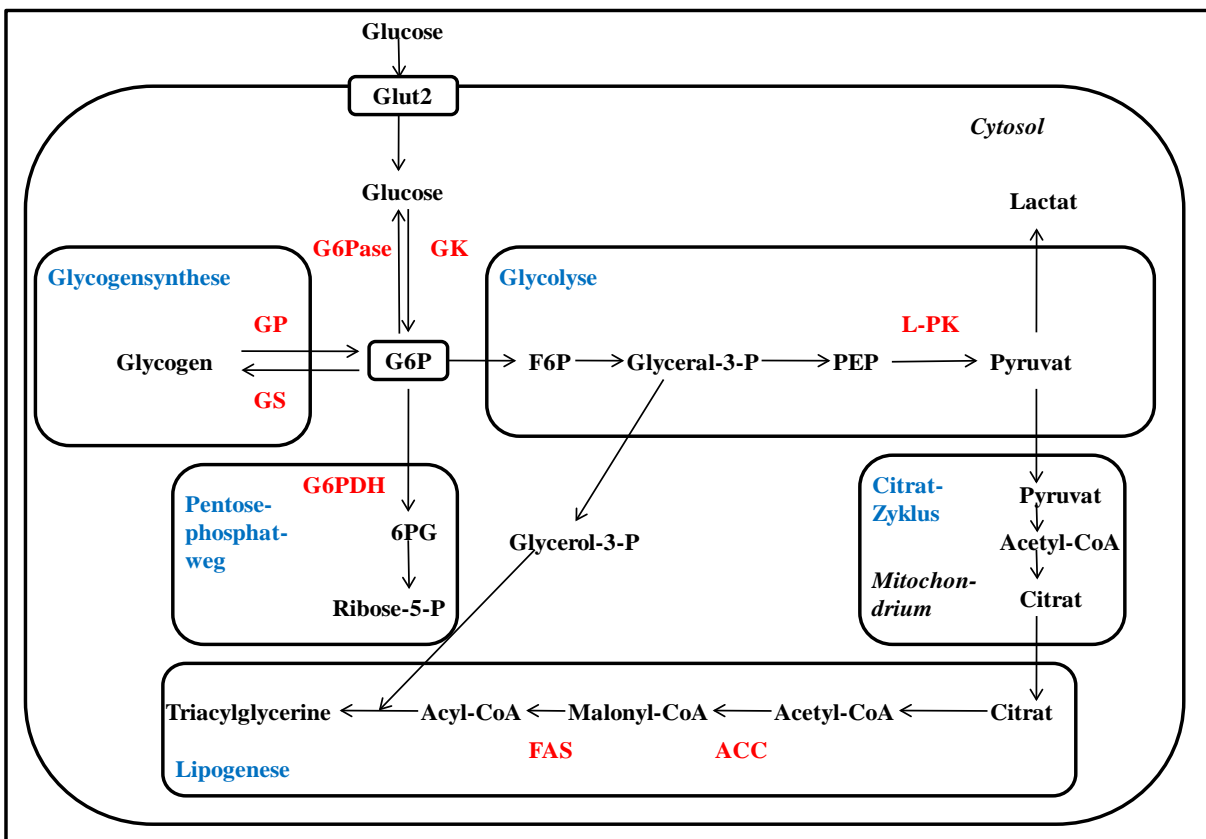


Abbildung 1: Stoffwechselwege von Glucose in der Leber (nach [3]).

Abkürzungen, sofern nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt: 6PG = 6-Phospho-Gluconolacton; F6P = Fructose-6-Phosphat; GP = Glycogen-Phosphorylase; GS = Glycogen-Synthase; P = Phosphat; PEP = Phosphoenolpyruvat.

Für die Konversion von Kohlenhydraten in TAG, an der u. a. Glycolyse, Lipogenese und Pentosephosphatweg (PPP) beteiligt sind, spielen viele Enzyme und Faktoren eine Rolle, die gut koordiniert werden müssen. Akut wird die katalytische Aktivität von Enzymen v. a. auf posttranslationaler Ebene reguliert: durch kovalente Mechanismen wie z. B. Phosphorylierung und/oder durch allosterische Mechanismen (Veränderungen der Konformation) [1]. Langfristig werden Enzyme hauptsächlich über ihre zelluläre Konzentration reguliert; diese wird durch die Transkriptions- und Translationsrate sowie den Abbau der mRNA und des Proteins beeinflusst [1]. Die Induktion von Enzymen auf der Transkriptions-Ebene (Genexpressions-Ebene) wird durch Transkriptionsfaktoren gesteuert [6]. Für eine maximale Transkription vieler an Glycolyse und Lipogenese beteiligter Enzyme sind sowohl Glucose als auch das Hormon Insulin, das bei steigendem Blutzuckerspiegel sezerniert wird, notwendig [3].

Glucose gelangt über den insulinunabhängigen Glucose-Transporter 2 (GLUT2) in die Leber. Dort wird sie durch Glucokinase zu Glucose-6-Phosphat (G6P) umgewandelt; ausgehend von

Einleitung

G6P kann Glucose in die Glycolyse, die Glycogensynthese oder den PPP eingeschleust werden. Der Mediator einer hohen zellulären Glucosekonzentration ist der Transkriptionsfaktor Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP). ChREBP ist sowohl für die basale als auch für die durch Kohlenhydrate induzierte Transkription vieler Enzyme der Glycolyse und Lipogenese in der Leber notwendig und spielt eine zentrale Rolle für die Koordination von Glucose-Metabolismus, Fettsäure- und TAG-Synthese [6]. Die Mediatoren vieler Effekte von Insulin sind die Transkriptionsfaktoren Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) und Forkhead box O (FOXO).

ChREBP wird zu den sogenannten „thrifty genes“ gezählt [7]. Die „Thrifty gene“-Hypothese wurde angesichts der heutigen weltweit hohen Prävalenz von Übergewicht aufgestellt. Sie vermutet, unter dem Druck der Evolution habe die wiederholte Konfrontation mit Zeiten von Nahrungsknappheit und Zeiten von Nahrungsüberfluss dazu geführt, dass das menschliche Genom einen sparsamen („thrifty“) Modus entwickelt habe, um Energie möglichst effizient metabolisch zu nutzen [8]. Dazu gehöre z. B. die effiziente Speicherung überschüssiger Nährstoffe als Fett, um einen zukünftigen potentiellen Nahrungsmangel zu überbrücken [8]. In früheren Zeiten war ein „thrifty“-Genotyp vorteilhaft, weil dieser in Zeiten von Nahrungsüberfluss eine bessere Verwertung der Nahrung und einen schnelleren Aufbau von Energiereserven in Form von Fett gewährleistete und somit in Zeiten von Nahrungsknappheit einen Überlebensvorteil bot [7]. Das führte im Laufe der Evolution zur Selektion dieser Genotypen [9]. Im heutigen Zeitalter hat sich allerdings eine drastische Änderung des Lebensstils vollzogen. Bei „modernen“ Menschen führen eine hohe Kalorienaufnahme und körperliche Inaktivität in Verbindung mit genetischer Suszeptibilität in Form des „thrifty“-Genotyps zur exzessiven Akkumulation von Lipiden [7, 8]. Die Träger dieser Genotypen werden zunehmend benachteiligt, weil sie zur Entwicklung von chronischem Übergewicht/Adipositas und damit assoziierten metabolischen Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, Hypertriglyceridämie, Hypercholesterinämie, Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus Typ 2 prädisponiert sind – ein Symptomenkomplex, der als metabolisches Syndrom bezeichnet wird und einen wesentlichen Risikofaktor zur Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen darstellt [10]. In hohem Maße damit assoziiert ist die Nicht-alkoholische Fettleber-Erkrankung (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), die durch eine exzessive Akkumulation von TAG in der Leber gekennzeichnet ist. Die genannten Erkrankungen gehören weltweit zu den ernstesten Gesundheitsproblemen in Ländern mit sogenanntem westlichem Lebensstil – in den USA beispielsweise sind Studien zufolge ca. zwei Drittel aller Erwachsenen übergewichtig oder adipös; aber auch in sogenannten Entwicklungsländern steigt die Prävalenz dieser Erkrankungen [6, 8]. Die Änderungen des Lebensstils haben sich offensichtlich schneller vollzo-

Einleitung

gen, als die genetische Evolution voranschreiten konnte [11].

Aufgrund seiner Bedeutung für die Lipogenese wird vermutet, der Transkriptionsfaktor ChREBP gehöre zu den „thrifty genes“, da eine Dysregulation von ChREBP an der Entstehung von metabolischem Syndrom und NAFLD beteiligt sein kann [2, 7, 12]. Eine Beeinflussung von ChREBP könnte theoretisch ein wichtiges Ziel in der Therapie dieser Erkrankungen darstellen. Für die Entwicklung zukünftiger Therapiemöglichkeiten ist weitere Forschung über Funktion und Regulation von ChREBP sowie über dessen Zusammenspiel mit anderen an den genannten Stoffwechselwegen beteiligten Transkriptionsfaktoren unerlässlich.

1.1 ChREBP (Carbohydrate responsive element binding protein)

ChREBP ist ein Transkriptionsfaktor, also ein Protein, das die Transkription bestimmter Zielgene durch Beeinflussung der RNA-Polymerase regulieren kann. Es bindet an die DNA und aktiviert oder reprimiert die Promotoren seiner Zielgene; teilweise übt es auch Einflüsse auf andere Transkriptionsfaktoren aus. Dadurch ist ChREBP in der Lage, Expression und Menge der von seinen Zielgenen codierten Proteine und Enzyme zu regulieren. ChREBP wird v. a. in der Leber exprimiert und ist ein zentraler Regulator von Enzymen der Glycolyse und Lipogenese. Kohlenhydrate sind an der Aktivierung von ChREBP beteiligt, woher der Name „Carbohydrate responsive“, „auf Kohlenhydrate reagierend“, stammt.

1.1.1 Gen

Das Gen für ChREBP liegt beim Menschen auf dem Chromosomen-Abschnitt 7q11.23 [13]. Es umfasst 38347 Basenpaare und enthält 17 Exons [13]. Die mRNA von ChREBP enthält 3288 Basenpaare [14]. Durch Transkription des Gens können 15 verschiedene mRNA-Varianten entstehen, davon elf durch alternatives Splicing und vier nicht gespleißte Formen, initiiert von alternativen Promotoren [15].

1.1.2 Protein

ChREBP wird besonders stark in der Leber exprimiert. Es kommt in niedrigerer Konzentration auch in Fettgewebe, Darmtrakt, Niere und Skelettmuskulatur vor, außerdem in pankreatischen Beta-Zellen sowie in bestimmten Gehirnregionen wie dem Hypothalamus [12, 16]. Die elf gespleißten und zwei der nicht gespleißten Varianten der mRNA von ChREBP codieren für insgesamt 15 unterschiedliche Isoformen des ChREBP-Proteins, die sich hinsichtlich Länge und Gewebeverteilung unterscheiden [15].

Die in der Leber prädominante und längste Isoform des ChREBP-Proteins ist die Isoform α . Sie besteht beim Menschen aus 852 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 92,942 kDa

Einleitung

[17]. Die Aminosäuresequenzen von ChREBP bei Mensch, Ratte und Maus sind zu 82 % identisch [12].

Synonyme für ChREBP sind „Williams Beuren syndrome chromosomal region 14 protein“ (WBSR14-Protein), Mondo B, „Max-like protein X-Interactor“ und „Max-like protein X interacting protein like“ (MLXIPL).

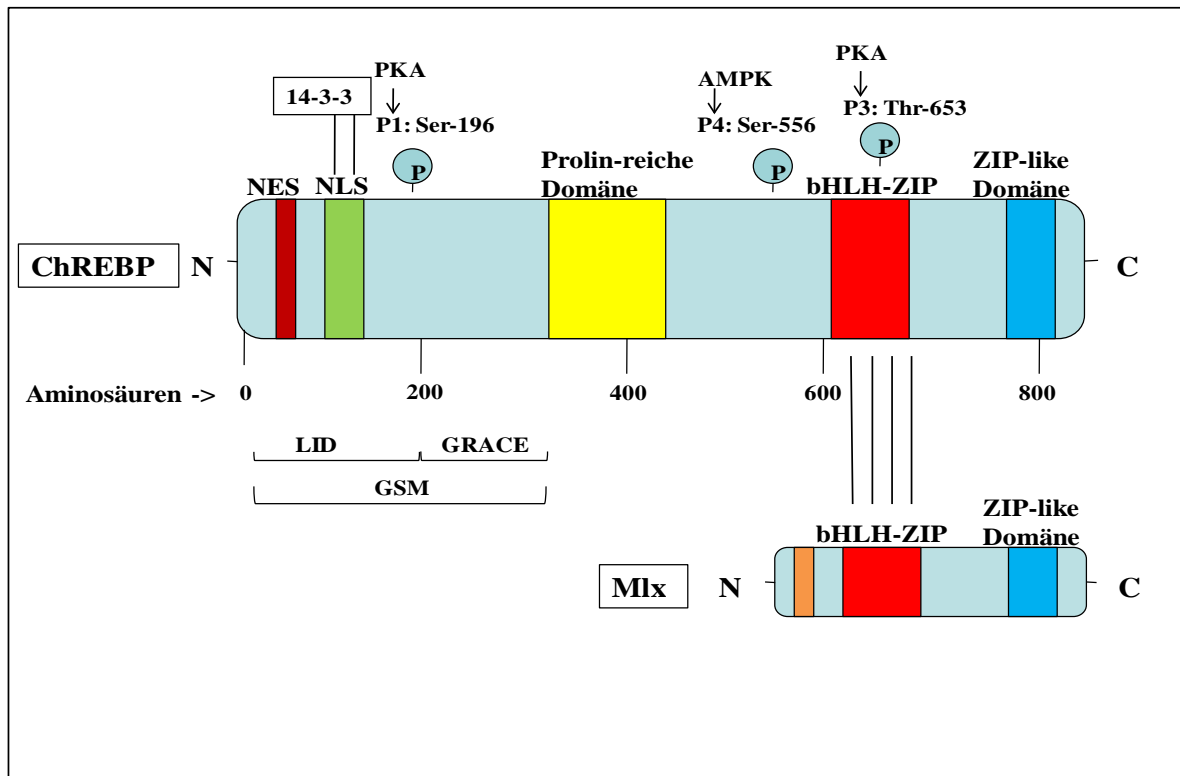


Abbildung 2: Struktur des humanen ChREBP-Proteins, Isoform α (nach [3, 16]).

GRACE: AS 197-298; LID: AS 1-197. Es sind drei Phosphorylierungsstellen markiert (siehe Abschnitt 1.1.4.1): P1: Serin-196, P4: Serin-556, P3: Threonin-653.

ChREBP gehört zur Familie der „Basic helix-loop-helix-leucine zipper“-Transkriptionsfaktoren (bHLH-LZ). Eine HLH-Domäne ist durch zwei Alpha-Helices charakterisiert, die durch einen Bogen („loop“) verbunden sind. Basische Leucin-Zipper-Domänen bestehen aus einer Alpha-Helix, bei der Leucin jede siebte Aminosäure bildet. Das bHLH-LZ-Motiv von ChREBP ist essentiell für die Fähigkeit des Proteins zur Heterodimerisation und zur DNA-Bindung [18]. Weiterhin weist ChREBP eine „Leucine zipper-like-Domäne“ (Zip-like-Domäne) und eine Polyprolin-Domäne auf [19].

Für die Regulation von ChREBP wichtige Domänen sind das Nucleus-Lokalisations-Signal (NLS) und das Nucleus-Export-Signal (NES), die beide in der aminoterminalen Region von ChREBP liegen; diese Region scheint eine wichtige Rolle für die Regulation der subzellulären

Einleitung

Lokalisation sowie der Transkriptionsaktivität zu spielen [20-22]. Das NLS ist für den Transport von ChREBP in den Nucleus zuständig, das NES für den Export aus dem Nucleus.

ChREBP, auch als Mondo B bezeichnet, ist Mitglied der Mondo-Familie von Transkriptionsfaktoren. Sowohl Mondo A als auch ChREBP werden durch erhöhte Glucosekonzentration aktiviert und weisen Ähnlichkeiten in der Sequenz auf; sie unterscheiden sich aber in der Gewebeverteilung, Funktion und Regulation: Mondo A wird v. a. im Skelettmuskel exprimiert, aktiviert v. a. Enzyme der Glycolyse und besitzt keine Phosphorylierungsstellen [22, 23].

1.1.3 Funktion

Nach Transport in den Nucleus und Aktivierung (siehe Abschnitt 1.1.4.1) bindet ChREBP an „Carbohydrate Responsive Element“ (ChoRE)-Motive in den Promotoren seiner Zielgene und aktiviert deren Transkription durch Beeinflussung der RNA-Polymerase. ChREBP induziert v. a. Gene für Enzyme, die an der Glycolyse, an der Lipogenese – der Synthese von Fettsäuren aus Acetyl-CoA – sowie an der Synthese von TAG – aus Fettsäuren und Glycerol, zur langfristigen Speicherung von Fett – beteiligt sind. Ergänzend zur Glycolyse induziert ChREBP auch Gene für Glucose-Transporter, für Enzyme zum Abbau von Fructose und für die Glycogen-Synthese [4]. Zur Unterstützung der Lipogenese induziert ChREBP Enzyme für den PPP und Malat-Enzym, die das für die Fettsäure-Synthese notwendige NADPH + H⁺ liefern, sowie Enzyme des Citratzyklus, der zur Entstehung von Acetyl-CoA, dem Substrat für die Fettsäure-Synthese, führt [4]. Weitere Ziele von ChREBP sind Enzyme zur Synthese von Lipoproteinen und Enzyme für die Modifikation von Fettsäuren durch Elongation und Desaturierung [4, 24].

Die meisten Gene scheinen durch ChREBP induziert, einige wenige Gene supprimiert zu werden [4]. Es folgen einige Beispiele für Zielgene von ChREBP.

Stoffwechselweg	Beispiele für Zielgene von ChREBP-Mlx
Glucose-Transport	<u>Glucosetransporter 2</u> (GLUT2; insulinunabhängig, Expression in Hepatocyten und Beta-Zellen des Pankreas) <u>Glucosetransporter 4</u> (GLUT4; insulinabhängig, Expression in Adipocyten und Skelettmuskelzellen)
Glucose- und Fructose- Abbau	<u>Aldolase B</u> ¹ <u>Glucose-6-Phosphat-Isomerase</u> ¹ <u>Leber-spezifische Pyruvatkinase</u> ² (L-PK) <u>Pyruvat-Dehydrogenase, Untereinheit β^1</u> (PDHB; generiert Acetyl-CoA aus Pyruvat, verbindet Glycolyse und Citrat-Zyklus)

Einleitung

	<u>Fructokinase/Ketohexokinase</u> ¹ (Expression u. a. in Hepatocyten; bildet den ersten Schritt zur Verwertung von Fructose)
Fettsäure-Synthese	<u>Acetyl-Coenzym A-Carboxylase</u> α ³ (ACC; Expression der Isoform α in Hepatocyten und Adipocyten) <u>Acetyl-Coenzym A-Synthetase</u> ^{1,3,4} (AcCS; generiert Acetyl-CoA aus Acetat [nicht aus Pyruvat wie die PDH]) <u>ATP-Citrat-Lyase</u> ^{1,3,4} (ACL; Enzym des Citrat-Shuttles, der Acetyl-CoA ins Cytosol transportiert) <u>Fettsäure-Elongase 2</u> ^{1,3} (Elovl 2) <u>Fettsäure-Elongase 6</u> ³ (Elovl 6) <u>Fettsäure-Synthase</u> ³ (FAS) <u>Spot 14</u> ³ (S14; stimuliert die Lipogenese) <u>Stearoyl-Coenzym A-Desaturase-1/Δ-9-Desaturase</u> ³ (SCD-1/ Δ 9D; Synthese von einfach ungesättigten aus gesättigten Fettsäuren)
Bildung von NADPH + H ⁺ (notwendig für die Fettsäure-Synthese) im Pentosephosphatweg und durch Malat-Enzym	<u>Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase</u> ³ (G6PDH; Schlüsselenzym des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs) <u>Transketolase</u> <u>Malat-Enzym</u> ³ (generiert Pyruvat und NADPH + H ⁺ aus Malat und NADP ⁺) <u>Malat-Dehydrogenase 1</u> (wandelt Oxalacetat in Malat um und liefert damit das Substrat für Malat-Enzym)
Synthese und Transport von Triacylglycerinen	<u>Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase 1</u> (GPDH1; generiert Glycerol-3-Phosphat für die TAG-Synthese) <u>Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase</u> ^{3,5} (GPAT; Schlüsselenzym der TAG-Synthese, katalysiert die Veresterung von Glycerol-3-Phosphat und Acyl-CoA zu 1-Acyl-Glycerol-3-Phosphat) <u>Mikrosomales Triacylglycerin-Transferprotein</u> (MTTP, Synthese der Apolipoprotein B-enthaltenden Lipoproteine VLDL und LDL)
Glycogen-Synthese	<u>Glycogen-Synthase 2</u>
Metabolische Regulatoren	<u>Thioredoxin-Interaktionsprotein</u> (TXNIP; moduliert den zellulären Redox-Status und beeinflusst die Apoptose) <u>G₀-G₁ switch gene 2</u> (G0S2; fördert die Apoptose) <u>Adiponectin-Rezeptor 2</u> ¹ (Expression in Hepatocyten und Skelett-)

Einleitung

	muskelzellen; Adiponectin ist ein Adipocytokin mit anti-inflammatorischer und insulinsensitivierender Wirkung)
--	--

Tabelle 1: Auswahl durch ChREBP induzierter Zielgene (nach [4, 19, 24-29]).

¹Eine Induktion durch ChREBP für diese Enzyme und Faktoren wird in einer Studie beschrieben, die eine erhöhte Expression nach Glucosestimulation und eine erniedrigte nach Knockout von Mlx feststellte [4].

²Für die Transkription von L-PK wird in vielen Studien ChREBP als alleiniger Aktivator angenommen [16, 25, 26]. Teilweise wird Hepatic nuclear factor-4 α (HNF-4 α) eine Rolle für die maximale Induktion von L-PK zugeschrieben [30].

³Diese Enzyme werden nach derzeitiger Studienlage durch ChREBP-Mlx und SREBP-1c zusammen reguliert. ACC, FAS und SCD-1 werden eventuell zusätzlich direkt durch LXR induziert [25, 31], Elov16 und SCD-1 zusätzlich durch PPAR α [24].

⁴AcCS und ACL werden einigen Studien zufolge nicht durch ChREBP induziert, sondern nur durch SREBP-1c [25, 29].

⁵Der Einfluss von ChREBP auf GPAT wird kontrovers diskutiert: Teilweise wird SREBP-1c als einziger Regulator von GPAT beschrieben [25], teilweise wird über ChoRE im Gen von GPAT berichtet [27].

ChREBP reguliert und koordiniert den Glucose-, Fettsäure- und TAG-Metabolismus der Leber sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Induktion durch Kohlenhydrate [6, 22]. Als sogenanntes „thrifty gene“ sorgt ChREBP für die Konversion von nicht direkt benötigten Kohlenhydraten in TAG und ist somit ein wichtiger Faktor für die Speicherung von Energie im Organismus [22]. ChREBP-Mlx ist an schätzungsweise 50 % der durch Glucose aktivierten Transkriptionsprozesse in Leberzellen beteiligt [23]. Weiterhin soll ChREBP laut Studienlage etwa 50 % der hepatischen Lipogenese kontrollieren, und die meisten lipogenen Gene sollen ChoRE enthalten, was ChREBP zu einem zentralen Transkriptionsfaktor der Leber macht [3, 32].

Werden Fettsäuren aus Substraten synthetisiert, die aus Nicht-Lipiden wie Kohlenhydraten oder Aminosäuren gewonnen wurden, spricht man von De novo-Lipogenese (DNL) [32, 33]. Neben der Energiespeicherung haben Fettsäuren weitere wichtige Aufgaben im Organismus: Sie sind Bestandteile der Zellmembran (Membranlipide), dienen als Vorläufer für intrazelluläre Signalmoleküle (Eicosanoide) und können mit Cholesterin-Molekülen verestert werden, die ihrerseits wichtige Funktionen als Vorläufer von Steroidhormonen, Vitaminen und Gallensalzen haben [8, 24, 34].

Ein zentrales Enzym der Glycolyse stellt die Leber-Pyruvatkinase (L-PK) dar. L-PK katalysiert den Schritt von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat unter Bildung von Adenosin-Triphosphat (ATP) und ist geschwindigkeitslimitierend für die Glycolyse. Akut wird L-PK durch allosterische und kovalente Modifikationen kontrolliert, langfristig durch die Regulation seiner Transkription [35].

Einleitung

Für die Transkription von L-PK ist ChREBP obligat [26]. Zwei wichtige durch ChREBP induzierte Enzyme für die Biosynthese von Fettsäuren sind Acetyl-Coenzym A-Carboxylase (ACC) und Fatty acid synthase (Fettsäure-Synthase, FAS). ACC stellt das Schrittmacherenzym der Fettsäure-Synthese dar. Es katalysiert die Carboxylierung von Acetyl-Coenzym A zu Malonyl-Coenzym A und liefert damit das Substrat für die weitere Fettsäure-Synthese. Außerdem hemmt Malonyl-Coenzym A – und damit indirekt ChREBP – allosterisch Leber-Carnitin-Palmitoyltransferase-1 (L-CPT-1), das Schrittmacherenzym für die Beta-Oxidation von Fettsäuren [27]. FAS ist ein multifunktionelles Enzym, ein Komplex, der mehrere Enzyme mit jeweils eigenen katalytischen Zentren in sich vereint. FAS katalysiert die weiteren Schritte der Fettsäure-Synthese bis zur Fertigstellung von Palmitinsäure mit 16 Kohlenstoff-Atomen. ChREBP reguliert ACC und FAS im Zusammenspiel mit dem insulinabhängigen Transkriptionsfaktor SREBP-1c [26]. FAS scheint durch zahlreiche weitere Signale reguliert zu werden, zu denen Insulin, Fettsäuren, Schilddrüsen-Hormone, Sterole, Oxysterole, Glucocorticoide, Wachstumsfaktoren und cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) zählen; es weist Bindungsstellen für SREBP, LXR, ChREBP und Schilddrüsen-Hormon-Rezeptor auf [34].

ChoRE bestehen aus zwei E-Box-Motiven mit der Sequenz CACGTG, die durch fünf Basenpaare voneinander getrennt sind [3, 4, 36]. ChREBP bindet an die ChoRE-Motive der meisten Zielgene nicht alleine, sondern mit seinem Interaktionspartner Max-like protein X (Mlx); dabei bilden zwei ChREBP- und zwei Mlx-Proteine zusammen einen heterotetrameren Komplex [4, 37]. Dies führt zur Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den Promotor des entsprechenden Zielgens, zur Acetylierung der Histone H3 und H4 auf dem Promotor und zur Transkription des Zielgens [29]. Mlx ist bei den meisten Zielgenen obligatorisch für die effiziente DNA-Bindung von ChREBP und die Induktion der Transkription; besonders die lange Loop-Region von Mlx scheint für die Stabilität des ChREBP-Mlx-Komplexes verantwortlich zu sein [3, 4, 37, 38].

Mlx ist wie ChREBP ein bHLH-LZ-Protein; es gehört zur Myc/Max/Mad-Familie von Transkriptionsfaktoren und bildet mit verschiedenen Partnern heterodimere Komplexe, neben ChREBP z. B. mit Mondo A in der Skelettmuskulatur [3, 4]. Es gibt die Isoformen Mlx α , β und γ ; in der Leber wird v. a. Mlx β gebildet [38]. Mlx wird konstitutiv und abundant exprimiert und ist relativ stabil; es wird wahrscheinlich nicht oder kaum durch Nährstoffe wie Glucose oder durch Hormone wie Insulin reguliert [12, 16, 29]. Über die Regulation von Mlx ist noch relativ wenig bekannt. Es ist z. B. fraglich, wie Mlx in den Nucleus transportiert wird und wo seine Assoziation mit ChREBP stattfindet.

Für die volle Induktion der meisten Gene für Enzyme der Lipogenese sowie vieler Gene für Enzyme der Glycolyse scheint ein Zusammenwirken von Glucose/ChREBP-Mlx und Insu-

Einleitung

lin/SREBP-1c nötig zu sein [3, 39]. Diese Gene sind für Glucose und Insulin sensibel und besitzen sowohl ChoRE als auch SRE; ihre Transkription wird nur durch gleichzeitige synergistische Wirkung von ChREBP und SREBP-1c maximal stimuliert, nicht durch Aktivität von ChREBP oder SREBP-1c alleine [3, 40-42]. Physiologisch dürfte eine überlappende Wirkung von ChREBP und SREBP-1c sinnvoll sein, da eine hohe Glucosekonzentration im Blut reaktiv zur Sekretion von Insulin führt, wodurch ChREBP und SREBP-1c und deren Zielgene wahrscheinlich meistens gemeinsam aktiviert werden. Die Notwendigkeit beider Transkriptionsfaktoren für eine effektive Lipogenese könnte außerdem zur Sicherstellung dienen, dass wichtige Stoffwechselmetabolite wie Glucose nur dann zur Lipogenese und Energiespeicherung genutzt werden – Prozesse, welche zunächst Energie erfordern – wenn geeignete physiologische Bedingungen und ausreichende Mengen an Substrat vorliegen, also hohe Glucose- und Insulinkonzentrationen [1, 2, 38, 40]. Außerdem können durch die multifaktorielle Steuerung differenzierte hormonelle und metabolische Signale zur Wirkung kommen und Glycolyse, Lipogenese sowie Modifikationen von Fettsäuren besser koordiniert werden [2].

Einige Enzyme werden nur durch ChREBP, z. B. L-PK, oder nur durch SREBP-1c, z. B. GK, induziert [4, 38]. L-PK und GK sind Schrittmacherenzyme der Glycolyse. GK ist notwendig für die Retention von Glucose in der Zelle sowie für die Einleitung des Glucose-Metabolismus und somit auch notwendig für eine Aktivierung von ChREBP; L-PK sorgt für die Entstehung von Pyruvat, das zu Acetyl-CoA, dem Ausgangssubstrat für die Lipogenese, abgebaut wird [43]. Die Regulation von GK nur über Insulin könnte den Grund haben, dass Glucose nur dann in der Zelle retiniert wird, wenn gleichzeitig über Insulin genügend Wege für den Glucose-Abbau induziert wurden; außerdem wird dadurch die Aufgabe von Insulin unterstützt, den Blutzuckerspiegel zu senken [38]. Die Steuerung von L-PK nur über Glucose gewährleistet, dass die Einleitung der Lipogenese nur bei ausreichendem Glucosespiegel stattfindet [38]. Diese Beispiele zeigen die Notwendigkeit und Zweckmäßigkeit eines Zusammenspiels von ChREBP und SREBP-1c bei der Stimulation von Glycolyse und Lipogenese. An der Expression von Enzymen der Lipogenese sind neben ChREBP und SREBP-1c noch viele weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt, z. B. LXR, FOXO, HNF-4 α oder PPAR α [24].

Die physiologische Rolle von ChREBP in anderen Organen als der Leber ist bisher teilweise ungeklärt. ChREBP ist wahrscheinlich an der Differenzierung von Präadipocyten beteiligt [3]. Es induziert anscheinend die DNL im Fettgewebe, allerdings spielt diese nur eine untergeordnete Rolle, weil die DNL beim Menschen zum weitaus größten Teil in der Leber stattfindet [3]. In Insulin produzierenden Beta-Zellen des Pankreas wird eine Rolle von ChREBP in der Wahrnehmung von Glucose postuliert [41, 44]. ChREBP soll außerdem im Gehirn als Glucose-Sensor

Einleitung

fungieren und im Hypothalamus orexigen (appetitanregend) wirken [45].

1.1.4 Regulation

Im Allgemeinen induzieren Kohlenhydrate Kohlenhydrat-Abbau und Fettsäure-Synthese und hemmen Fettsäure-Abbau und Gluconeogenese, und Fettsäuren induzieren Fettsäure-Abbau und Gluconeogenese und hemmen Kohlenhydrat-Abbau und Fettsäure-Synthese [46]. Dementsprechend sollte eine glucosereiche Diät grundsätzlich eher zur Aktivierung und eine fettreiche Diät eher zur Inhibierung von ChREBP beitragen [47]. An der Regulation von ChREBP ist allerdings eine Vielzahl von Faktoren beteiligt, deren Einflüsse auf ChREBP im Zusammenspiel äußerst komplex sind und deren detaillierte Erforschung teilweise noch aussteht. Eine solch differenzierte Regulation durch multiple metabolische und hormonelle Signale dient einer genauen Koordination sowie der Sicherstellung, dass die Lipogenese nur bei geeignetem zellulärem Energie-Status und Substrat-Angebot eingeleitet wird.

ChREBP kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden: Auf der Proteinebene, also der post-translationalen Ebene, steuern Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Mechanismen die Translokation von ChREBP in den Nucleus oder ins Cytosol. Außerdem beeinflussen Phosphorylierung/Dephosphorylierung sowie weitere Prozesse das ChREBP-Protein in seiner DNA-Bindungs- und Transkriptionsfähigkeit. Auf der Genexpressionsebene werden Transkription und Translation des ChREBP-Gens reguliert. Im Folgenden werden zunächst die Mechanismen der Aktivierung und Hemmung von ChREBP beschrieben und danach Faktoren diskutiert, die an der Regulation von ChREBP beteiligt sind oder für die dies vermutet wird.

1.1.4.1 Aktivierungsmechanismen von ChREBP auf Posttranslationsebene (Proteinebene)

Die Aktivierung von ChREBP beinhaltet nach heutigem Kenntnisstand mindestens drei separate Schritte: 1. Erhöhung der Rate der Translokation in den Nucleus bzw. Senkung der Rate der Translokation ins Cytosol durch eine erste Dephosphorylierung, 2. Steigerung der DNA-Bindungsfähigkeit durch eine zweite Dephosphorylierung und 3. Einleitung der Transkriptionsaktivität von ChREBP durch einen von Dephosphorylierung unabhängigen Mechanismus [22, 48, 49].

Das ChREBP-Protein besitzt verschiedene Phosphorylierungsstellen; bis zu zwölf wurden inzwischen beschrieben [21], von denen drei für die Regulation von humanem ChREBP besonders relevant zu sein scheinen: P1 bei Serin-196, P3 bei Threonin-653 und P4 bei Serin-556 [50].

Einleitung

Phosphorylierungsstelle	Mensch	Maus
P1	Serin-196	Serin-196
P2	Serin-614	Serin-626
P3	Threonin-653	Threonin-665
P4	Serin-556	Serin-566

Tabelle 2: Wichtige Phosphorylierungsstellen des ChREBP-Proteins bei Mensch und Maus (nach [17, 50, 51]).

P1 und P3 werden durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert, die von cAMP abhängig ist, P4 durch die Adenosin-Monophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) [35]. Die Phosphorylierungsstelle P2 beeinflusst die DNA-Bindungsaktivität, spielt aber für die Regulation durch Glucose oder cAMP wahrscheinlich keine größere Rolle und wirkt eher supportiv [47]. Aufgrund der Existenz weiterer, weniger gut erforschter Phosphorylierungsstellen im ChREBP-Protein wird angenommen, dass komplexe Phosphorylierungsmuster die Aktivität von ChREBP regulieren [16, 21].

Es wird hier zunächst die relativ gut untersuchte Aktivierung von ChREBP durch Glucose beschrieben, damit später potentielle weitere Aktivatoren mit den durch Glucose eingeleiteten Wegen verglichen werden können.

Bei geringer Glucosekonzentration in der Zelle ist ChREBP an P1 und P3 phosphoryliert, dadurch inaktiviert und befindet sich im Cytosol. Steigt die Glucosekonzentration in der Zelle, so kommt es zur Einleitung von Glycolyse und Pentosephosphatweg (PPP). Im Zuge des nicht-oxidativen Teils des PPP wird u. a. Xylulose-5-Phosphat (X5P) gebildet; X5P aktiviert die Proteinphosphatase 2A (PP2A), die ChREBP an P1 dephosphoryliert [18]. P1 befindet sich in der Nähe des „Nuclear localization signal“ (NLS) [18]. Durch diese erste Dephosphorylierung kommt es zur Abdissoziation von Protein 14-3-3 (siehe unten), welches ChREBP im Cytosol retiniert, zur Freilegung und Aktivierung des NLS und infolgedessen zur Translokation von ChREBP in den Nucleus [22]. Die direkte Korrelation zwischen der Phosphorylierung von P1 und der intrazellulären Lokalisation war für endogenes ChREBP eine Zeit lang umstritten [19], konnte inzwischen aber in mehreren Studien demonstriert werden [16, 26].

Im Nucleus findet, wiederum gesteuert durch die über X5P aktivierte PP2A, eine zweite Dephosphorylierung statt, diesmal an P3; P3 liegt in der bHLH-Region [18]. Dadurch wird die DNA-Bindungsstelle freigelegt, und ChREBP kann an die „Carbohydrate responsive elements“

Einleitung

(ChoRE) in den Promotoren seiner Zielgene binden. Die Regulation von ChREBP über Dephosphorylierungs-Mechanismen ermöglicht eine schnelle zelluläre Reaktion [52].

X5P wird eine essentielle Rolle im Aktivierungsprozess von ChREBP zugeschrieben; es reagiert innerhalb von Minuten auf Änderungen der Glucose-Konzentration, stellt die verbindende Komponente zwischen Glucose und Aktivierung von ChREBP dar und ermöglicht so die Funktion von ChREBP als Glucose-Sensor [18]. Andere Zuckerphosphate als X5P führen anscheinend nicht zur Aktivierung der PP2A [18]. Außer mittelfristig über ChREBP aktiviert X5P die Glycolyse auch akut, indem es Phosphofruktokinase-2 aktiviert, welche die Synthese von Fructose-2,6-Bisphosphat katalysiert [53]. Fructose-2,6-Bisphosphat ist ein potenter allosterischer Aktivator von Phosphofruktokinase-1, einem Schlüsselenzym der Glycolyse [53]. Außerdem werden dem Enzym Phosphofruktokinase-2 eine Erhöhung der Expression von GK aus der Glycolyse, eine Erniedrigung von Glucose-6-Phosphatase aus der Gluconeogenese sowie Einflüsse auf verschiedene Transkriptionsfaktoren wie ChREBP, SREBP-1c, HNF-1 α und PPAR α zugeschrieben [54].

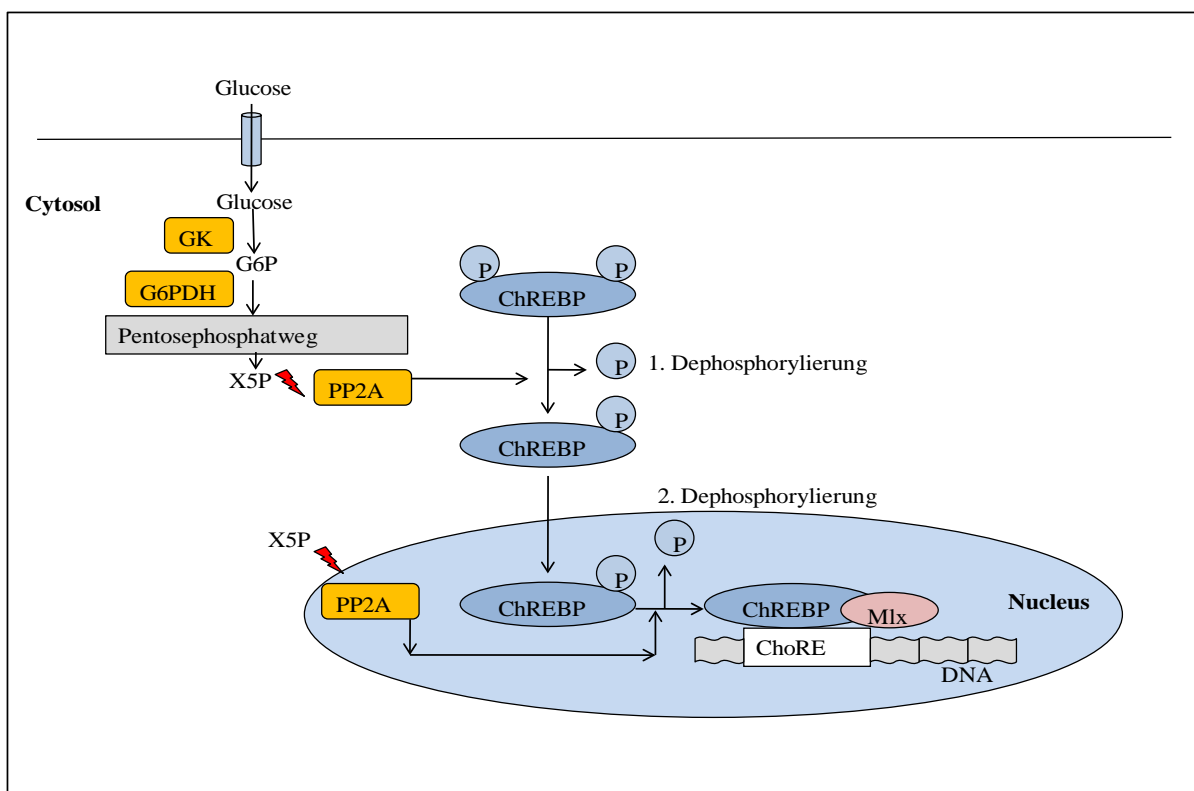


Abbildung 3: Regulation von ChREBP auf posttranslativer Ebene (nach [3]). P = Phosphat.

In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass weder ein „Einsperren“ von ChREBP im Kern noch die Mutation von Phosphorylierungsstellen eine konstitutive transkriptionelle Aktivität von ChREBP erzielen [21, 48]. Daraus wurde geschlossen, außer den zwei Dephosphorylierungen, die zur Translokation von ChREBP in den Kern und zur Bindung an die DNA führen, müsse

Einleitung

noch ein weiterer Schritt hinzukommen, damit ChREBP die Transkription seiner Zielgene aktivieren könne [22, 48]. Dieser dritte Schritt wird durch eine als „Glucose sensing module“ (GSM) bezeichnete Domäne gesteuert [22].

Das GSM liegt in der für die Regulation von Lokalisation und Transkriptionsaktivität wichtigen aminoterminalen Region von ChREBP [22]. Es wird funktionell unterteilt in eine als „Low-glucose inhibitory domain“ (LID) und eine als „Glucose-response activation conserved element“ (GRACE) bezeichnete Domäne [22]. GRACE fördert die Transkriptionssteuerungs-Aktivität von ChREBP [22]. Bei niedriger zellulärer Glucosekonzentration wird die Aktivität von GRACE durch LID inhibiert, dadurch sind GRACE und ChREBP inaktiv [22]. Bei hoher Glucosekonzentration hingegen wird LID inhibiert und die Hemmung von GRACE damit aufgehoben, sodass GRACE und ChREBP aktiv werden können [22]. Diese dynamische intramolekulare Interaktion von GRACE und LID vermittelt die Fähigkeit von ChREBP, auf Glucose zu reagieren, die im Englischen als „Glucose responsiveness“ bezeichnet wird [22]. Das Zusammenspiel von LID und GRACE scheint keine direkte Interaktion zu beinhalten und unabhängig von Änderungen der subzellulären Lokalisation oder der DNA-Bindung von ChREBP zu sein [49].

Im Einzelnen besteht das GSM aus fünf miteinander kooperierenden Submodulen, den „Mondo conserved regions“ (MCR) I-V [22]. MCR IV enthält die LID und ist notwendig, um die Aktivität von ChREBP als Transkriptionsfaktor zu hemmen [22]. MCR II und III kontrollieren die subzelluläre Lokalisation von ChREBP durch die Aktivität eines „Nuclear export signal“ (NES) in MCR II und durch eine Bindungsstelle für das Protein 14-3-3 in MCR III [22]. Die Bindung von 14-3-3, die durch Phosphorylierung von P1 erleichtert wird, führt zum Export von ChREBP aus dem Zellkern [12, 22]. MCR III hemmt die inhibitorische Aktivität der LID und ist damit essenziell für die Aktivierung der Transkriptionssteuerung von ChREBP [22].

Einige Studien beobachteten sowohl bei hoher als auch bei niedriger Glucosekonzentration ein aktives ChREBP-Shuttling zwischen Cytosol und Nucleus, wobei der Transport von ChREBP in den Nucleus bei hoher Glucosekonzentration schneller und in größerem Ausmaß erfolgte [47, 48]. Dies spricht für eine konstitutive Aktivität von ChREBP, die vermutlich auch bei niedrigem Glucosespiegel zu einer Expression der Zielgene in bestimmtem Umfang führt. Stimulation mit Glucose würde dann einen additiven Effekt in Form einer Steigerung der Aktivität bewirken.

ChREBP scheint mit verschiedenen Cofaktoren zu interagieren. Es wurde folgendes Modell aufgestellt [20, 22, 55]: Bei niedriger Glucosekonzentration in der Zelle ist ChREBP an multiplen Stellen phosphoryliert, liegt in einem Komplex mit dem Protein 14-3-3 vor und ist vorwiegend im Cytosol lokalisiert. Bei Anstieg von Glucose findet, über die von X5P aktivierte PP2A, eine Dephosphorylierung statt, wodurch ChREBP von 14-3-3 abdissoziiert und das zuvor durch 14-3-

Einleitung

3 maskierte NLS freigelegt wird (eventuell werden gleichzeitig NES maskiert). Daraufhin interagiert ChREBP mit Importin- α , welches eine Komplexbildung mit Faktoren wie Importin- β , Ran und Guanosin-Triphosphat (GTP) erlaubt; dadurch kommt es zur Translokation von ChREBP in den Nucleus. Im Nucleus dissoziieren die Faktoren des Import-Komplexes von ChREBP ab, übrige phosphorylierte Stellen werden durch PP2A dephosphoryliert, und ChREBP bildet einen Komplex mit Mlx, wodurch es an die DNA binden kann. Die Aktivierung des GSM schließlich induziert die Transkriptionssteuerungsaktivität von ChREBP und die Expression der Zielgene.

Bei Abfall der Glucosekonzentration erfolgt eine Phosphorylierung von ChREBP durch die PKA, was eine Komplexbildung von ChREBP mit 14-3-3, CRM1, Ran-GTPase und GTP zur Folge hat und zur Deaktivierung des NLS, zur Aktivierung des NES und zum Export von ChREBP aus dem Nucleus führt. Der Komplex mit 14-3-3 scheint ChREBP im Cytosol zu retinieren; 14-3-3-Proteine und Importin- α konkurrieren um die Bindung an ChREBP.

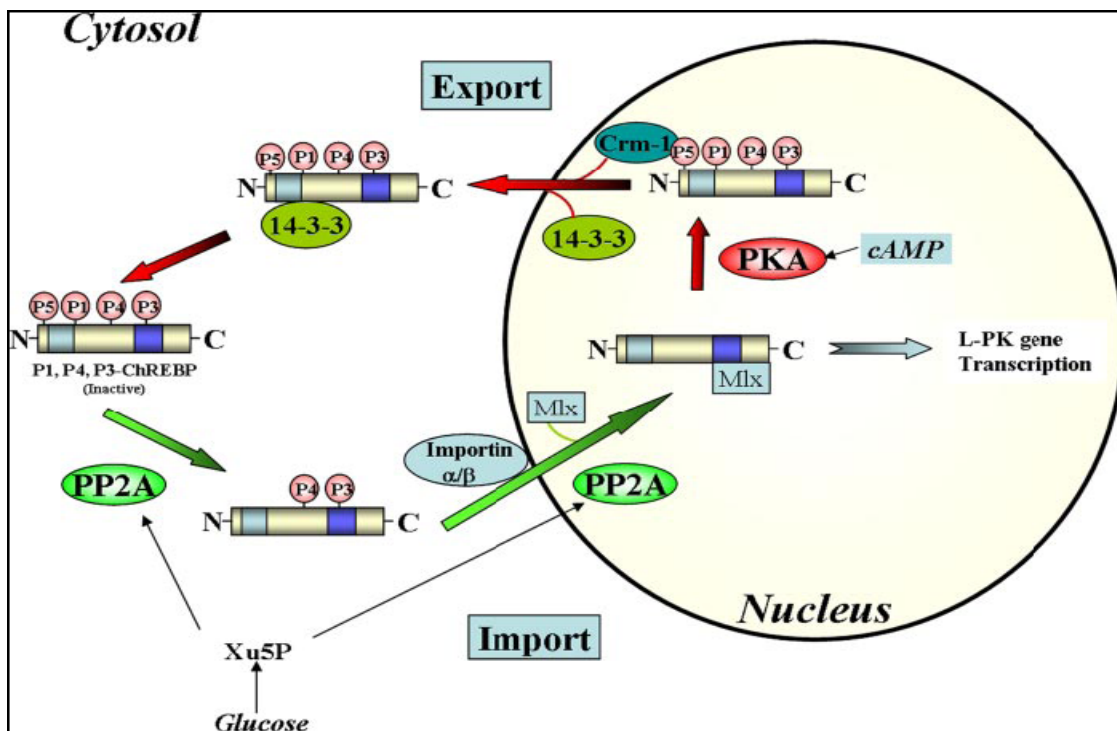


Abbildung 4: Der Transport von ChREBP in den Nucleus und ins Cytosol (aus [20]).

Da eine Phosphorylierung von P1 für die Interaktion mit 14-3-3 und CRM1, eine Dephosphorylierung für die Interaktion mit Importin- α benötigt wird, ist die P1 enthaltende aminoterminale Region von ChREBP für dessen subzelluläre Lokalisation verantwortlich [20]. Die Dephosphorylierung von P3 und eventuell P2 in der carboxyterminalen Region ist verantwortlich für die Interaktion mit Mlx; daher ist diese Region für die DNA-Bindung von ChREBP zuständig [20].

1.1.4.2 Aktivierungsmechanismus von ChREBP auf Transkriptionsebene (Genexpression)

Neben der Aktivierung des ChREBP-Proteins stimuliert Glucose die Transkription des ChREBP-Gens, also die Synthese von mRNA anhand der für ChREBP codierenden DNA. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Synthese von ChREBP-Proteinen. Theoretisch könnte auch eine Regulation der Translation, also der Synthese der Proteine anhand der auf der mRNA kopierten genetischen Information, stattfinden; dazu gibt es bezüglich ChREBP aber momentan keine Daten. Auch ob Glucose die Stabilität der mRNA von ChREBP erhöht, ist ungewiss. Für die kurzfristige Regulation von ChREBP scheinen Phosphorylierung und Dephosphorylierung die entscheidende Rolle zu spielen, während die langfristige Regulation v. a. über die Transkription gesteuert zu werden scheint [54].

1.1.4.3 Hemmungsmechanismen von ChREBP

Eine Hemmung von ChREBP tritt auf, wenn der Organismus sich vom Anabolismus auf den Katabolismus umstellt, z. B. im Fastenzustand: Dieser führt zur Akkumulation von cAMP und von AMP in der Zelle, zur Suppression von u. a. ChREBP und SREBP-1c, zur Reduktion von hepatischer Glycolyse und DNL und zur Steigerung von Gluconeogenese, Ketogenese und Beta-Oxidation von Fettsäuren [56].

Im Fastenzustand liegt ein Glucosemangel vor, der u. a. zur Sekretion der Stresshormone Glucagon und Adrenalin führt. Glucagon aktiviert v. a. die hepatische, Adrenalin v. a. die myocytäre Adenylcyclase, welche die Synthese von cAMP katalysiert; dadurch steigt die Konzentration von cAMP in der Zelle. cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und bewirkt dadurch die Phosphorylierung von ChREBP an P1 und P3 [18]. Die Phosphorylierung von P1 fördert die Interaktion von ChREBP mit Protein 14-3-3 und stimuliert dadurch die Translokation von ChREBP ins Cytosol. Die Phosphorylierung von P3 hemmt die DNA-Bindungsaktivität von ChREBP [18, 26, 47].

Weiterhin kommt es im Fastenzustand zur Mobilisation von Fettsäuren aus dem Fettgewebe und zu deren Aufnahme in Hepatocyten. Der Metabolismus dieser Fettsäuren führt zum Anstieg der Konzentration an AMP – bzw. des Quotienten AMP/ATP – in der Zelle; AMP aktiviert die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) [53, 57]. Die AMPK phosphoryliert ChREBP an P4, was Transkriptionsaktivität und DNA-Bindungsfähigkeit von ChREBP hemmt; eine Translokation ins Cytosol durch die AMPK wurde bisher nicht beschrieben [18, 56, 57]. Außerdem senkt die AMPK Expression und Transkriptionsaktivität von SREBP-1c und HNF-4 α und vermindert auch darüber die Lipogenese [42].

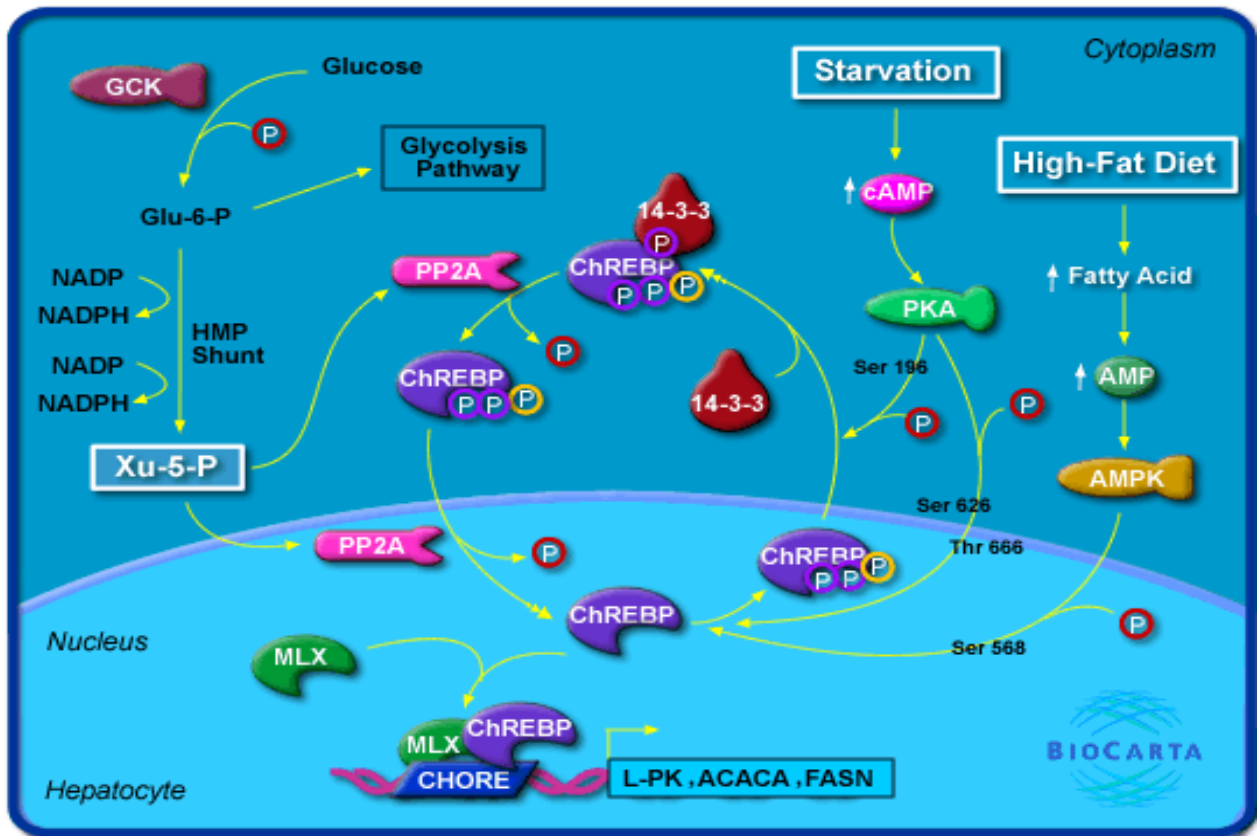


Abbildung 5: Die Regulation von ChREBP in der Leber ([58]). ACACA = ACC; FASN = FAS; HMP Shunt = Hexose-Monophosphat-Weg = Pentosephosphatweg. Die hier bezeichneten Phosphorylierungsstellen werden in einigen Veröffentlichungen für murines ChREBP in dieser Form angegeben.

Außer durch cAMP/PKA und AMP/AMPK wird ChREBP durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) gehemmt; dies geschieht auf mehreren verschiedenen Wegen (siehe Abschnitt 1.1.4.4.11). Neben einer Aktivierung der AMPK vermindern PUFAs Reifung und Stabilität der mRNA von ChREBP, steigern deren Abbau und hemmen die Bildung von X5P und damit die Translokation von ChREBP in den Nucleus und die DNA-Bindung [3]. Zur Regulation von ChREBP über den Abbau seines Proteins wurden keine Studien gefunden.

1.1.4.4 Substanzen und Transkriptionsfaktoren, die ChREBP (eventuell) beeinflussen

Neben ChREBP regulieren auch viele andere Substanzen und Transkriptionsfaktoren – in unterschiedlichem Ausmaß – die Expression von Genen der Glycolyse und Lipogenese. Einige beeinflussen ChREBP oder werden ihrerseits durch ChREBP beeinflusst, andere wirken unabhängig von ChREBP; teilweise ist die Beziehung zu ChREBP (noch) nicht genau geklärt. Im Folgenden sollen einige Substanzen und Transkriptionsfaktoren, ihre Funktion und Regulation sowie ihre Beziehung zu ChREBP dargestellt werden.

Einleitung

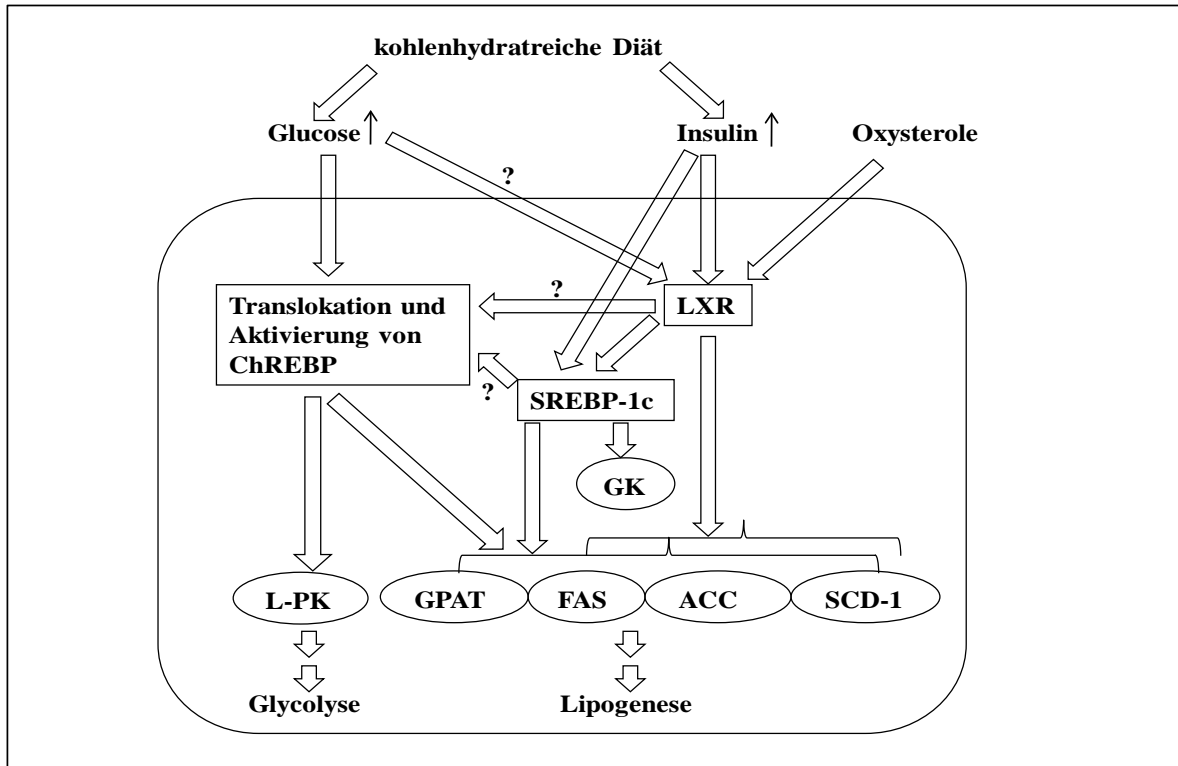


Abbildung 6: Der Einfluss von Glucose und Insulin auf ChREBP, LXR, SREBP-1c und einige von deren Zielgenen (nach [19, 26]).

1.1.4.4.1 Glucose

Glucose aktiviert ChREBP auf mehreren Ebenen und spielt daher eine zentrale Rolle für dessen Regulation. Glucose wird über Glucose-Transporter 2 (GLUT2) rasch insulinunabhängig in Hepatocyten aufgenommen, sodass deren intrazelluläre Glucosekonzentration derjenigen im Blut entspricht, Änderungen schnell wahrgenommen und hepatische Gene schnell reguliert werden können [31]. Glucose leitet in der Zelle Glycolyse und Pentosephosphatweg (PPP) ein. Der PPP führt u. a. zur Entstehung von Xylulose-5-Phosphat (X5P), welches zwei Dephosphorylierungen induziert, durch die ChREBP in den Nucleus transloziert und an die DNA gebunden wird (siehe Abschnitt 1.1.4.1). Außer über X5P reguliert Glucose ChREBP auch über das „Glucose-sensing module“ (GSM), dessen Aktivierung für die Transkriptionsaktivität von ChREBP notwendig ist (siehe Abschnitt 1.1.4.1). Daneben fördert Glucose die Transkription von ChREBP und somit die Neusynthese des Proteins.

1.1.4.4.2 Fructose und weitere Monosaccharide

Neben Glucose kommen potentiell auch andere Monosaccharide für die Aktivierung von ChREBP in Frage, wie Fructose, Mannose und Galactose. Nur für den Einfluss von Fructose auf ChREBP wurden Studien gefunden. Fructose ist zusammen mit Glucose in Saccharose enthalten,

Einleitung

Galactose zusammen mit Glucose in Lactose. Saccharose und Lactose tragen also schon aufgrund der enthaltenen Glucose zur Aktivierung von ChREBP bei. Saccharose (Haushaltszucker) ist ein Disaccharid aus Glucose und Fructose; bei dessen Abbau im Organismus entstehen daher zu gleichen Teilen Glucose und Fructose. Eine große Rolle hinsichtlich des Fructose-Konsums spielt neben Saccharose auch der vielen Softdrinks zugesetzte Maissirup, der enzymatisch aus Maisstärke hergestellt wird und ebenfalls aus Glucose und Fructose besteht [59]. Um die deutlich höhere Süßkraft der Fructose zu nutzen, wird durch das Enzym Glucose-Isomerase der Fructose-Anteil von Maissirup häufig auf bis zu 90 % erhöht (HFCS-90) [59]. Aufgrund ihres verbreiteten Vorkommens in Lebensmitteln sollten Fructose, Galactose und Mannose hinsichtlich einer Wirkung auf ChREBP zukünftig genauer untersucht werden. Einige Überlegungen zu ihren Einflussmöglichkeiten auf ChREBP werden hier vorgestellt.

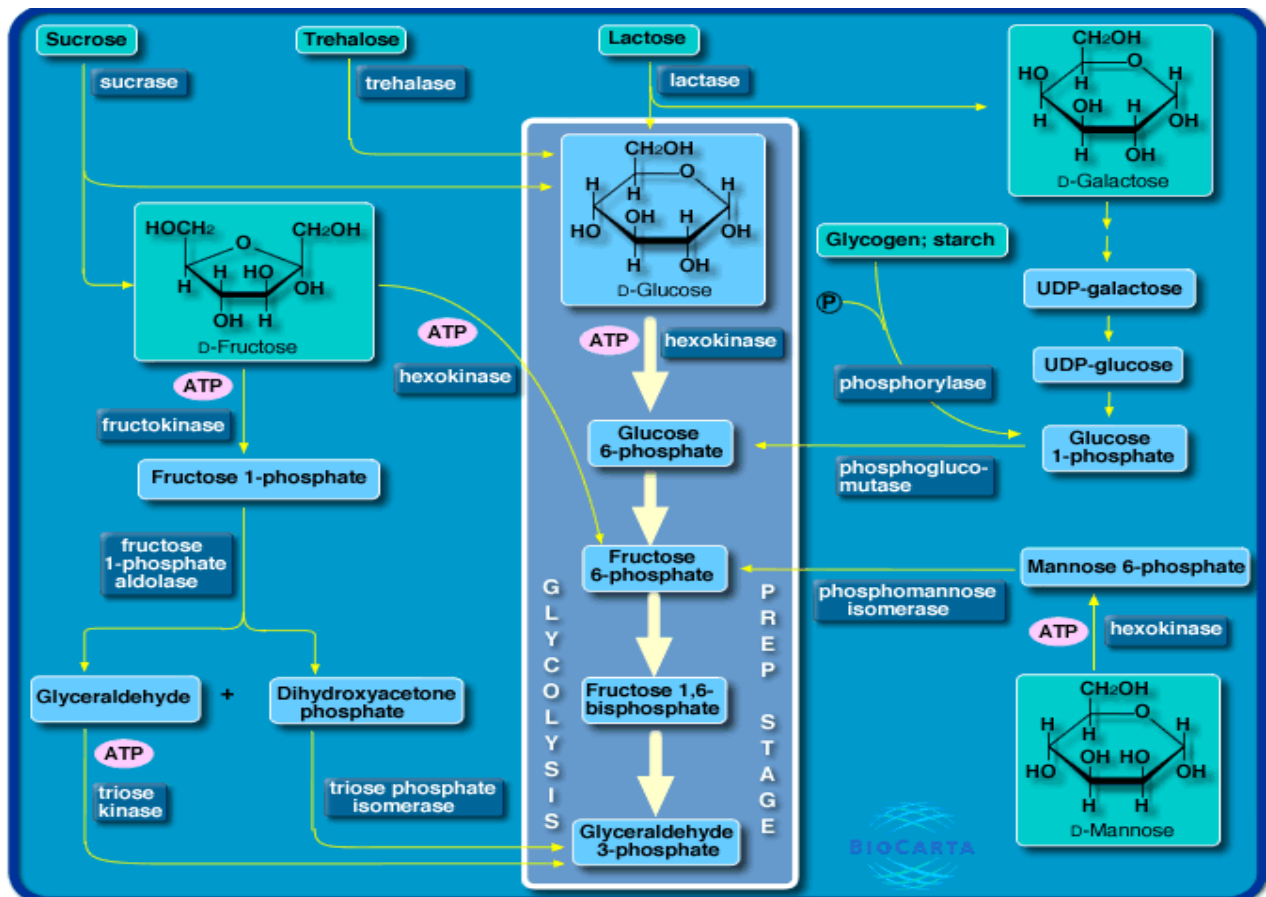


Abbildung 7: Metabolismus der Monosaccharide Glucose, Fructose, Galactose und Mannose und deren Verbindung zur Glycolyse ([64]). Sucrose = Saccharose.

Fructose gelangt insulinunabhängig in Leberzellen und wird dort durch Hexokinase in Fructose-6-Phosphat umgewandelt, das direkt in die Glycolyse eingeschleust wird, oder über Fructose-1-Phosphat in die Triosen Glyceron-3-Phosphat und Glyceral-3-Phosphat abgebaut, die ebenfalls meistens für die Glycolyse verwendet werden. Über Glycolyse und Pyruvat-Dehydrogenase ent-

Einleitung

steht Acetyl-CoA, das als Substrat für die Lipogenese dient (siehe Abschnitt 4.2.2.1) [60]. Fructose-6-Phosphat und die Triosen können aber auch über Teilschritte der Gluconeogenese zur Synthese von Glucose-6-Phosphat (G6P) führen, das am Beginn des PPP steht. Glycerol-3-Phosphat könnte auch gleich dem PPP zugeführt und im Rahmen von dessen nicht-oxidativem, reversiblen Teil über verschiedene Teilschritte mittels des Enzyms Transketolase zu X5P umgewandelt werden. Über das hierdurch entstehende X5P und die in Abschnitt 1.1.4.1 erläuterten Mechanismen könnte Fructose zur Dephosphorylierung, Translokation in den Nucleus und DNA-Bindung von ChREBP beitragen. Möglicherweise aktiviert Fructose auch G6PDH, das Schlüsselenzym des oxidativen Teils des PPP [61].

Einige Studien sprechen Fructose eine besondere Rolle in der Entstehung von Insulinresistenz und NAFLD zu. Dies ließe einen Einfluss von Fructose auf ChREBP vermuten. Studien zu Einflüssen von Fructose auf ChREBP kommen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Ein direkter Einfluss von Fructose auf das GSM oder auf Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren von ChREBP wurde bisher nicht gefunden. Eine Studie beschreibt eine gesteigerte DNA-Bindfähigkeit von ChREBP nach Gabe von Fructose im Vergleich zu Glucose, jedoch keine Erhöhung von X5P, keine signifikant erhöhte Transkription und keine erhöhte Translokation in den Nucleus; dies könnte möglicherweise auf eine Aktivierung des GSM durch Fructose hindeuten [62]. Andere Studien hingegen, teilweise mit Hep G2-Zellen, beobachteten eine gesteigerte Transkription, Translokation und DNA-Bindung von ChREBP nach Stimulation mit Fructose im Vergleich zu Glucose [61, 63]. Studien mit ChREBP-Knockout-Mäusen zeigten eine Intoleranz dieser Mäuse gegenüber den Effekten einer Diät mit hohem Fructose- oder Saccharose-Gehalt, was auf eine Rolle von ChREBP im Fructose-Metabolismus hinweist (siehe Abschnitt 1.2.4) [61].

Möglicherweise würde Fructose im Zusammenspiel mit Glucose, z. B. als Saccharose, eine größere Wirkung auf ChREBP erzielen, da die Glucose Schritte in der Aktivierung von ChREBP, die bei ausschließlicher Gabe von Fructose eventuell fehlen – wie vielleicht die Stimulation des GSM – in diesem Fall übernehmen könnte und weitere Wirkungen von Fructose erst dadurch richtig zur Geltung kommen könnten. Bisher sind Ausmaß und Mechanismen der Wirkung von Fructose auf ChREBP noch nicht vollständig geklärt.

Mannose kann entweder für den Einbau in Glycoproteine verwendet oder, über Mannose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat, in die Glycolyse eingeschleust werden. Um Einfluss auf den PPP und damit ChREBP zu erlangen, müsste Fructose-6-Phosphat entweder in Glucose-6-Phosphat umgewandelt werden, die Ausgangssubstanz für den PPP, oder die in der Glycolyse entstehende Triose Glycerol-3-Phosphat müsste in den PPP eingeschleust und dort zu X5P umgewandelt werden. Der Einfluss von Mannose auf ChREBP, dessen GSM oder Transkription

Einleitung

wurde bisher anscheinend noch nicht untersucht.

Zu einer möglichen Wirkung von Galactose auf ChREBP wurden ebenfalls keine Studien gefunden. Galactose kann in der Leber zur Synthese von Glycoproteinen verwendet, über Uridin-Diphosphat (UDP)-Glucose zur Glycogensynthese herangezogen oder, nach Umwandlung in Glucose-6-Phosphat, der Glycolyse oder dem PPP zugeführt werden, wodurch es theoretisch ChREBP aktivieren könnte. Einflüsse auf GSM oder Transkription von ChREBP sind ungeklärt.

1.1.4.4.3 Insulin

Hohe Glucosekonzentrationen, die ChREBP auf Transkriptions- und Translationsebene aktivieren, führen im Organismus zu einer erhöhten Sekretion von Insulin. Insulin ermöglicht die Aufnahme von Glucose in Skelettmuskel und Fettgewebe durch Induktion von GLUT4 und steigert den Abbau von Kohlenhydraten: In Leber und Fettgewebe induziert es Glycolyse und Lipogenese und hemmt die Beta-Oxidation von Fettsäuren, in Leber und Muskel induziert es die Synthese und inhibiert den Abbau von Glycogen; außerdem hemmt es die Gluconeogenese in der Leber.

Viele Studien beobachteten keinen direkten Einfluss von Insulin auf ChREBP. Eine Studie hingegen berichtete über eine direkte Stimulation der Expression von ChREBP durch Insulin, die durch eine über Insulin vermittelte Reduktion der Expression von „Octamer transcription factor-1“ (Oct-1), einem Repressor der Transkription von ChREBP, zustande komme [65].

Indirekte Einflüsse auf ChREBP kann Insulin über die Transkriptionsfaktoren Leber-X-Rezeptor (LXR, siehe Abschnitt 1.1.4.4.4) und Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c, siehe Abschnitt 1.1.4.4.5) erzielen. Insulin erhöht auf mehreren Wegen (siehe unten) Aktivität und Expression von LXR. LXR steigert anscheinend die Expression von ChREBP, aber weniger dessen Translokation in den Nucleus und funktionelle Aktivität. Sowohl Insulin als auch LXR sind für die Aktivierung von SREBP-1c zuständig; SREBP-1c führt seinerseits indirekt – über Induktion von Glucokinase und PPP – zur Aktivierung von ChREBP.

1.1.4.4.4 Leber-X-Rezeptor (Liver X receptor, LXR)

LXR ist ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle im Cholesterin- und Gallensäure-Metabolismus spielt, aber auch den Lipid-, Insulin- und Glucose-Metabolismus reguliert und Effekte auf das Immunsystem hat [66]. Die Splice-Variante LXR α wird u. a. in Leber, Fettgewebe, Skelettmuskel und Makrophagen exprimiert, LXR β kommt ubiquitär vor [66-68].

LXR steigert den reversen Transport von Cholesterin aus peripheren Zellen zur Leber [69]. Er stimuliert über ATP-Binding-Cassette (ABC)-Transporter den zellulären Cholesterin-Efflux, fördert die Bildung von High density lipoproteins (HDL), hemmt die Cholesterin-Synthese, in-

Einleitung

duziert die Gallensäure-Synthese und aktiviert die Exkretion von Cholesterin und Gallensäuren über die Galle [34, 69].

LXR reguliert einige Gene für die Lipogenese direkt über LXR response elements (LXRE) in deren Promotoren herauf, andere Gene indirekt über Induktion von SREBP-1c und einen Teil der Gene sowohl direkt als auch indirekt, z. B. FAS, ACC oder SCD-1 [26, 28]. LXR induziert die Transkription und Synthese des Precursor-Proteins von SREBP-1c; zur Spaltung des Precursors in seine reife Form ist Insulin notwendig [70]. LXR fördert die Bildung von HDL und VLDL und reguliert Enzyme für die Modifikation von Lipoproteinen [11, 71]. Außerdem erhöht er die Synthese von ungesättigten Fettsäuren durch Induktion von Desaturasen [72].

LXR beeinflusst auch andere in den Lipid-Metabolismus involvierte Transkriptionsfaktoren. Er scheint die Transkription von ChREBP über zwei LXRE in dessen Promotor zu induzieren, unabhängig vom Glucosestoffwechsel [25, 26]. Eine Steigerung der Aktivität von ChREBP durch LXR auf posttranslationaler Ebene ist umstritten.

Eine Studie berichtet, LXR inaktiviere die AMPK und verstärke dadurch Transkriptionsaktivität und DNA-Bindungsfähigkeit von ChREBP [25]. Andere Studien finden keinen Einfluss von LXR auf Dephosphorylierung, Translokation in den Nucleus und funktionelle Aktivität von ChREBP [26, 67]. Wahrscheinlich sind die Aktivierung der Transkriptionsfähigkeit und die volle Induktion der Expression von ChREBP nur durch erhöhte Glucosekonzentrationen in der Zelle zu erreichen, jedenfalls nicht allein über Stimulation von LXR; LXR scheint im Gegensatz zu Glucose nicht für die Aktivierung notwendig zu sein [26]. Auch wenn LXR die Expression von ChREBP, eventuell auch die DNA-Bindung, in gewissem Ausmaß stimulieren kann, scheint Glucose eine bedeutendere Rolle als LXR für die Regulation von ChREBP zu spielen, weil Einflüsse auf die Proteinebene für die kurzfristige Aktivierung von ChREBP wichtiger sind [26]. Für eine maximale Induktion vieler Gene der Lipogenese ist aber offenbar die kombinierte Aktion von Glucose/ChREBP und Insulin/LXR/SREBP-1c notwendig [26].

LXR scheint die Transkription von PPAR direkt zu induzieren, ist auf posttranslationaler Ebene aber ein kompetitiver Antagonist von PPAR [69]. LXR kann zur Entstehung von hepatischer Steatose beitragen, indem er SREBP-1c induziert, den Membranrezeptor CD36 aktiviert, der Fettsäuren und LDL aus dem Blut aufnimmt, und Adiponectin hemmt, das die hepatische Lipogenese reduziert [69, 73].

LXR β steigert Insulinsynthese und -sekretion in pankreatischen Beta-Zellen [74]. Chronische Aktivierung von LXR scheint hingegen Dysfunktion und Apoptose der Beta-Zellen zu induzieren, möglicherweise durch intrazelluläre Lipidakkumulation und Lipotoxizität [75].

LXR senkt die Glucose-Abgabe durch die Leber und steigert die hepatische und periphere Glu-

Einleitung

cose-Aufnahme [76]. Dies erreicht LXR durch Suppression der Gluconeogenese, durch Induktion der hepatischen Glucokinase und durch Induktion des insulinunabhängigen GLUT1 sowie des insulinabhängigen GLUT4 in Muskel- und Fettgewebe [68, 76].

LXR-Agonisten hemmen in Makrophagen die Expression vieler proinflammatorischer Cytokine [77]. Wahrscheinlich sind indirekte Mechanismen wie eine Transrepression von Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) dafür verantwortlich [78]. Außerdem senkt LXR die hepatische Produktion von C-reaktivem Protein (CRP) [77].

Diskutiert wird eine über LXR vermittelte Hemmung der Expression von Leptin im Fettgewebe, was eine gesteigerte Energieaufnahme zur Folge hätte [79].

Aktivierende Liganden von LXR α und LXR β sind Oxysterole, langkettige Fettsäuren und eventuell Glucose; Insulin aktiviert LXR auf mehreren Wegen [19, 76, 80]. Oxysterole entstehen durch Hydroxylierung von Cholesterin und ermöglichen LXR die Reaktion auf den intrazellulären Cholesterin-Gehalt [66].

Glucose als Aktivator von LXR ist umstritten. Einige Studien beschreiben Glucose oder G6P als direkte Liganden von LXR, die die Transkriptionsaktivität sowie die Stabilität von LXR erhöhten [69, 81, 82]. Andere Studien kommen zu dem Schluss, Glucose aktiviere LXR nicht und entfalte seine aktivierende Wirkung auf ChREBP vollkommen unabhängig von LXR, es sei also nur ChREBP und nicht LXR ein Sensor für Glucose [26].

Insulin aktiviert LXR, indem es die Produktion von Oxysterolen stimuliert, die Interaktion von LXR mit anderen Faktoren fördert, die Transkription von LXR steigert und dessen Halbwertszeit verlängert [16, 83].

LXR bildet einen heterodimeren Komplex mit Retinoid X receptor (RXR), um an seine Zielgene binden zu können [66, 80]. RXR bildet neben LXR auch mit anderen Transkriptionsfaktoren Heterodimere, z. B. mit Peroxisomen-Proliferator-aktiviertem Rezeptor (PPAR) und Farnesoid X receptor (FXR); daher ist LXR auf posttranslationaler Ebene ein kompetitiver Antagonist dieser Transkriptionsfaktoren [11, 69, 84]. Weil LXR die Fettsäure-Synthese und PPAR α die Fettsäure-Oxidation fördert, wird die simultane Aktivierung antagonistischer Stoffwechselwege hierdurch vermieden [84, 85]. PPAR α und PPAR γ induzieren aber die Transkription von LXR, sodass kurzfristig ein hemmender, langfristig ein aktivierender Effekt von PPAR auf LXR zustande kommt [69]. FXR wird durch Gallensäuren aktiviert und hemmt die Expression von Enzymen der hepatischen Lipogenese und der Gallensäure-Synthese, während LXR diese Enzyme induziert [34, 86].

Gallensäuren hemmen die Aktivität von LXR, proinflammatorische Cytokine wie TNF α und IL-1 β senken die Expression von LXR α [69]. LXR α verstärkt seine eigene Expression über drei

Einleitung

LXRE im LXR α -Gen-Promotor [69]. Proteinkinase A (PKA) – der durch cAMP aktivierte Mediator von Glucagon und Adrenalin – phosphoryliert LXR α und reduziert dadurch dessen DNA-Bindungsfähigkeit und Transkriptionsaktivität [52, 67]. Da ChREBP ebenfalls durch die PKA phosphoryliert und inaktiviert wird, haben die Stoffwechselwege, die die PKA regulieren, auf LXR α , SREBP-1c und ChREBP einen ähnlichen Einfluss.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) sind kompetitive Antagonisten der Liganden von LXR [69, 87]. Außerdem sollen PUFAs LXR durch Aktivierung von PPAR α und PPAR γ hemmen [88].

Eine medikamentöse Beeinflussung von LXR könnte zur Modulation der Immunantwort, zum Schutz vor Atherosklerose und zur Verbesserung einer diabetischen Stoffwechsellage beitragen [89]. LXR könnte vor Atherosklerose schützen, indem er den reversen Cholesterintransport aus Makrophagen fördert und damit deren Transformation in Schaumzellen reduziert, die Expression proinflammatorischer Cytokine in Makrophagen und des proatherogenen CRP in Hepatocyten senkt und günstige Lipoproteine wie HDL induziert [78, 90]. Die Gabe von LXR-Agonisten führte in Studien zur Senkung des Blutzuckerspiegels und zur Verbesserung der peripheren Insulinsensitivität, was vermutlich durch eine Inhibition der hepatischen Gluconeogenese und eine erhöhte Glucose-Aufnahme in der Peripherie bei jedoch unverändertem Insulinsignalweg zustande kommt [91-93]. Weiterhin kommen für die Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage eine reduzierte Expression von Glucocorticoid-Rezeptor und eine Hemmung des die Insulinresistenz fördernden Cytokins TNF α in Frage [79, 94, 95].

Nachteilig war in diesen Studien die Entwicklung einer hepatischen Steatose und einer Hypertriglyceridämie [25, 90]. Vor einem Einsatz von LXR-Agonisten in der Therapie wäre daher eine selektive Inhibierung der lipogenen Effekte von LXR notwendig.

1.1.4.4.5 Sterol regulatory element binding protein (SREBP-1c)

SREBP-1c ist ein Transkriptionsfaktor der bHLH-LZ-Familie, der viele Enzyme der Lipogenese aktiviert [96]. Seine Zielgene überschneiden sich zum Teil mit denen von ChREBP, und für eine maximale Induktion dieser Gene ist das Zusammenspiel beider Transkriptionsfaktoren, SREBP-1c und ChREBP, nötig (siehe Tabelle 1).

SREBP wird beim Menschen in drei Isoformen exprimiert: SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2 [96]. SREBP-1c wird u. a. in Leber, Fettgewebe und Skelettmuskulatur exprimiert [96].

Während SREBP-2 v. a. an der Aktivierung der Cholesterin-Synthese und der Cholesterin-Aufnahme in die Zelle beteiligt ist, sind SREBP-1a und -1c für die Synthese von Fettsäuren und TAG und die Formation von VLDL zuständig [29, 96]. Insbesondere SREBP-1c vermittelt als

Einleitung

„thrifty gene“ viele der induzierenden Wirkungen von Insulin auf glycolytische und lipogene Gene, z. B. auf GK, FAS, ACC und SCD-1 [80, 96, 97]. SREBP-1c hemmt außerdem die Gluconeogenese [98]. Anscheinend inhibiert SREBP-1c die Transkription von Insulin-Rezeptor-Substrat-2 (IRS-2), kann somit den Insulinsignalweg stören und möglicherweise Insulinresistenz erzeugen [39, 99]. In Beta-Zellen hemmt SREBP-1c die Insulinsekretion [96, 99].

SREBP wird auf posttranslationaler Ebene durch proteolytische Prozessierung und proteasomale Degradation reguliert [25, 29]. Alle Isoformen von SREBP werden als Precursor-Proteine ins rauhe endoplasmatische Reticulum (ER) sezerniert und dort im unreifen, inaktiven Zustand in einem Komplex mit „SREBP cleavage activating protein“ (SCAP) und „Insulin-induced gene“-Proteinen (Insig-Proteinen) retiniert [29, 96]. Unter bestimmten Bedingungen (siehe unten) dissoziiert SCAP von den Insig-Proteinen ab und transportiert die Precursor-Proteine vom ER zum Golgi-Apparat [96]. Dort schneiden zwei Proteasen den Precursor in seine reife Form, den aktiven Transkriptionsfaktor, der freigesetzt und in den Kern transportiert wird, wo SREBP an die SRE seiner Zielgene bindet [29, 96].

Die Aktivierung von SREBP-1a und SREBP-2 wird über die intrazelluläre Konzentration von Cholesterin und Sterolen gesteuert; diese induzieren Insig-Proteine, welche SREBP im ER zurückhalten [29, 96].

Für die volle Induktion der Isoform SREBP-1c sind sowohl LXR α als auch Insulin notwendig, wobei Insulin selbst auf mehreren Wegen LXR α induziert (siehe Abschnitt 1.1.4.4.4) [70, 100]. LXR α induziert direkt die Transkription von SREBP-1c und führt so zur Synthese des Precursor-Proteins; auch SREBP-1c induziert über SRE seine eigene Expression [29, 70, 101]. Die proteolytische Spaltung des Precursors in seine reife Form und die nachfolgenden Schritte sind anscheinend nur durch Insulin möglich, weil Insulin Insig-2 hemmt, während LXR α Insig-2 induziert [70]. Daneben stabilisiert Insulin die mRNA von SREBP-1c und verhindert die proteasomale Degradation des Proteins [29]. Nach erfolgter DNA-Bindung wird SREBP-1c phosphoryliert und in der Folge ubiquitiniert und degradiert [102].

Glucose allein scheint nicht zur Aktivierung von SREBP-1c zu führen [80].

Eine durch erhöhtes intrazelluläres cAMP vermittelte Aktivierung der PKA, z. B. durch Glucagon oder Adrenalin, führt zur Phosphorylierung von SREBP-1c und zur Inhibition der Transkriptions-Induktion [96]. Die AMPK scheint die Transkription des SREBP-1c-Gens zu hemmen und den Abbau des SREBP-1c-Proteins zu fördern [42]. PUFAs verhindern die induktive Wirkung von LXR auf SREBP-1c, hemmen die Proteolyse von SREBP-1c in die reife Form, senken die mRNA-Stabilität und fördern die proteasomale Degradation [8, 29, 53, 80].

Für eine ausführliche Erläuterung des Zusammenspiels von SREBP-1c und ChREBP in der Gly-

Einleitung

colyse und Lipogenese sei auf Abschnitt 1.1.3 verwiesen.

ChREBP scheint keinen direkten Einfluss auf Expression oder Aktivität von SREBP-1c zu haben. Ein direkter Einfluss von SREBP-1c auf ChREBP ist umstritten [43]. Eine Studie beschreibt ein SRE im Promotor von ChREBP, das allerdings eher SREBP-1a als SREBP-1c zu binden scheint [103]. Indirekte aktivierende Auswirkungen von SREBP-1c auf ChREBP sind durch die Einleitung von Glycolyse und PPP über die von SREBP-1c induzierte GK gegeben. Hemmende Einflüsse auf ChREBP durch entstehende Produkte der durch SREBP-1c induzierten Lipogenese wären für die mittel- bis langfristige Regulation von ChREBP aber auch vorstellbar.

Die Abschnitte 1.2.1 und 1.2.2 erläutern die Rolle von SREBP-1c in pathophysiologischen Prozessen.

1.1.4.4.6 FOXO und FOXA (Forkhead box-Transkriptionsfaktoren, Subklassen O und A)

Transkriptionsfaktoren der Familie Forkhead box zeichnen sich durch eine charakteristische DNA-Bindungs-Domäne aus, die Forkhead box (FOX) genannt wird und drei Alpha-Helices und zwei charakteristische große Loops oder „Flügel“ besitzt [1, 104]. Die FOXO-Subklasse besteht aus den Transkriptionsfaktoren FOXO1, 3a, 4 und 6, die FOXA-Subklasse aus FOXA1, 2 und 3 [104, 105].

FOXO1 wird v. a. in Adipocyten und Hepatocyten, FOXO3a in Hepatocyten, FOXO4 im Muskelgewebe und FOXO6 spezifisch im zentralen Nervensystem exprimiert [104, 106]. FOXA wird in der Leber, im Darm, in Beta-Zellen und Adipocyten exprimiert [9].

Transkriptionsfaktoren der Subklasse FOXO regulieren Zelldifferenzierung und Zellzyklus, Proliferation, Apoptose, Resistenz gegen oxidativen Stress, DNA-Reparatur, Zellalterung und Glucose-Homöostase [104, 107]. Sie übermitteln die Effekte von Insulin und Wachstumsfaktoren auf den Zellmetabolismus [108].

In der Leber aktiviert FOXO1 die Gluconeogenese und die Ketogenese und ist somit wichtig für die Adaptation an Fastenzeiten [1, 9, 109]. FOXO1 fördert die Expression des Insulin-Rezeptors und von Insulin-Rezeptor-Substrat-2 (IRS-2); dadurch erhöht es die Insulinsensitivität und hemmt seine eigene Aktivität, weil Insulin FOXO1 inhibiert [110]. FOXO1 supprimiert die Gene der Schlüsselenzyme von Glycolyse, PPP und Lipogenese sowie die Gene der Transkriptionsfaktoren LXR, PPAR γ und HNF-4 α [108, 111, 112].

Bei oxidativem Stress, der z. B. bei Mangel an Wachstumsfaktoren oder an Glucose, aber auch durch chronische Hyperglycämie entsteht, kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), die zelluläre Schäden verursachen können (siehe Abschnitt 1.2.1) [104]. FOXO induziert Enzyme wie Katalase und Mangan-Superoxid-Dismutase, die ROS detoxifizieren, und

Einleitung

schützt so vor oxidativem Stress [113]. Sind bereits zelluläre Schäden entstanden, kann FOXO je nach Ausmaß der Schäden eine frühzeitige Zellalterung oder die Apoptose einleiten [104].

FOXO1 hemmt Wachstum und Proliferation von pankreatischen Beta-Zellen; es reduziert die Expression des Insulin-Gens und schützt vor durch oxidativen Stress verursachter Dysfunktion der Beta-Zellen [108, 112].

FOXA ist an der Regulation des Glucose- und Lipid-Metabolismus beteiligt [105]. FOXA2 ist, wie FOXO1, wichtig für die Adaptation an Fastenzeiten: Es aktiviert in der Leber Gene für die Degradation von TAG, für den Fettsäure-Transport, für die Produktion und Sekretion von VLDL, für die mitochondriale und peroxisomale Beta-Oxidation sowie für Glycolyse und Ketogenese; es induziert PPAR γ und HNF-4 α und inhibiert die DNL [9, 60]. FOXA3 induziert die Gluconeogenese [9, 105].

Die Transkriptionsaktivität von FOXO wird durch Phosphorylierung, Acetylierung, Modulation der DNA-Bindung und Interaktion mit Cofaktoren reguliert; außerdem erfolgt eine Steuerung von FOXO über nucleo-cytoplasmatisches Shuttling, Ubiquitinierung und Degradation [106-108].

FOXO stellt eine wichtige Komponente des Insulinsignalweges dar. Im Fastenzustand mit niedrigen Insulinspiegeln ist FOXO unphosphoryliert im Nucleus der Zelle lokalisiert und induziert aktiv die Transkription seiner Zielgene [9]. Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor, der zu den Tyrosin-Kinase-Rezeptoren gehört, bewirkt zunächst die Autophosphorylierung des Rezeptors, dann Phosphorylierung und Aktivierung der Insulin-Rezeptor-Substrate-1 und -2 (IRS-1 und IRS-2); dies führt zur Entstehung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP3) [104]. PIP3 aktiviert direkt und indirekt das Enzym Akt/Proteinkinase B, das FOXO an drei Stellen phosphoryliert [104, 106]. Daneben können auch „Serum and glucocorticoid-regulated kinase“ (SGK) und der durch Insulin oder IRS-1 aktivierte Ras-Signalweg FOXO phosphorylieren [106]. Die Phosphorylierungen von FOXO führen zur Inhibition der Transkription seiner Zielgene, weil die NLS-Funktion und die DNA-Bindung gehemmt und hoch affine Bindungen von 14-3-3-Proteinen an phosphoryliertes FOXO induziert werden, wodurch es zur Freilegung eines NES und zur Translokation von FOXO ins Cytosol kommt [28, 106, 108, 109]. Im Cytosol wird phosphoryliertes FOXO ubiquitiniert und degradiert [106, 109].

Einleitung

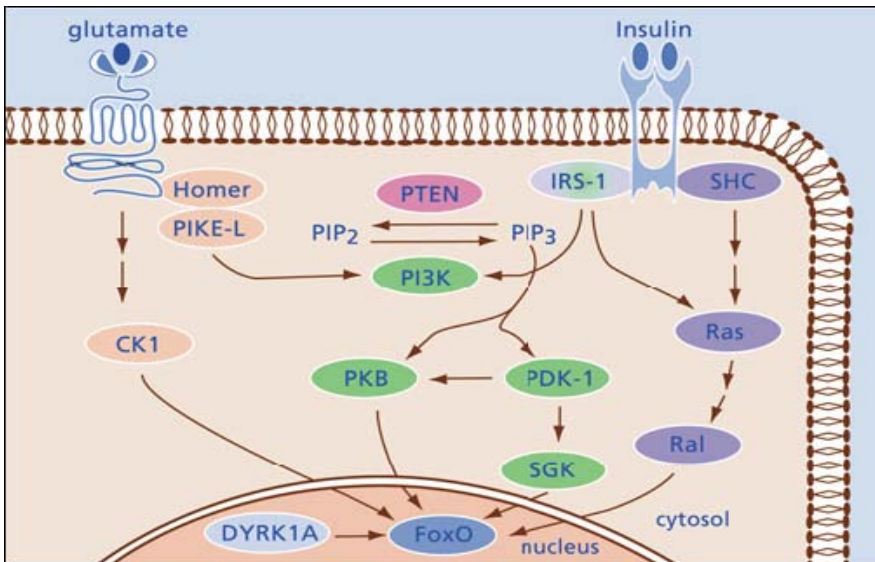


Abbildung 8: Signale, die die Aktivität von FOXO-Transkriptionsfaktoren beeinflussen (aus [106]).

Insulin, v. a. eine Hyperinsulinämie, führt zur Deaktivierung von FOXO, dadurch zur Herunterregulation der Insulin-Rezeptoren und zur Hemmung der Transkription von IRS-2, somit also zu Insulinresistenz [110]. FOXO1 wird nur nach Rekrutierung von IRS-2 an den Insulinrezeptor in der Insulin-Signalkaskade phosphoryliert und gehemmt, FOXA2 hingegen nach Rekrutierung von IRS-1 und IRS-2, sodass FOXA2 sensitiver auf Insulin reagiert als FOXO1 [9].

Der hemmende Effekt von Insulin auf FOXO1 wird durch Fructose abgeschwächt [62]. Glucagon, der funktionelle Antagonist von Insulin, kann FOXO1 aktivieren [62]. Gesättigte Fettsäuren scheinen FOXO3 zu dephosphorylieren und zu aktivieren [114].

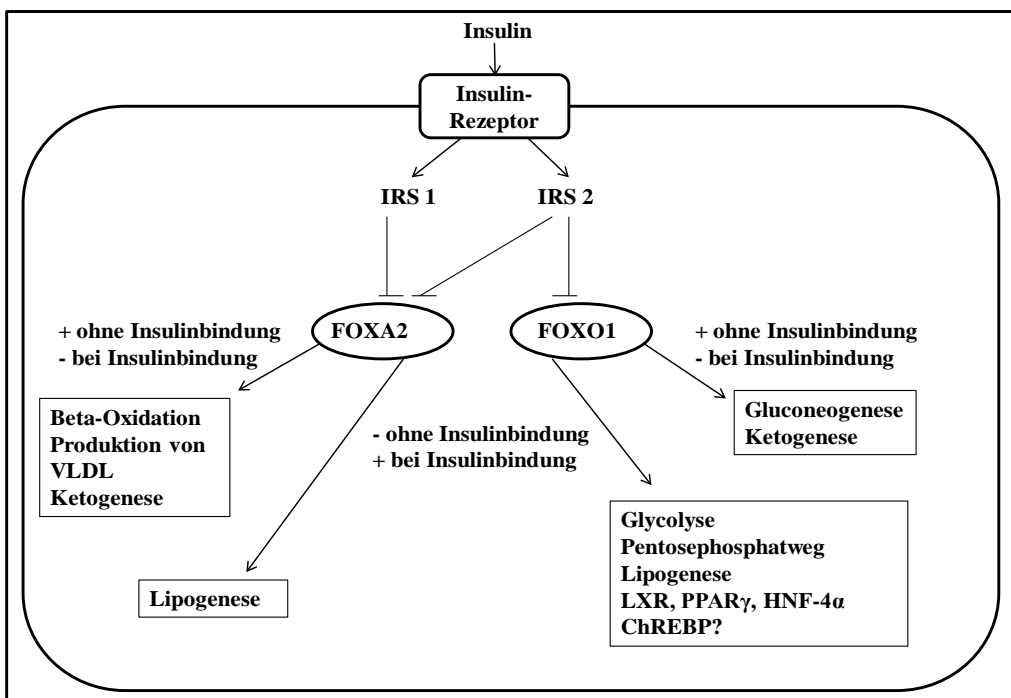


Abbildung 9: Die Rolle von FOXO1 und FOXA2 im Insulinsignalweg.

Insulin führt über Akt/PKB zur Phosphorylierung und Inaktivierung von FOXA2; FOXA1 und FOXA3 hingegen werden nicht über den Insulinsignalweg phosphoryliert [9, 60].

FOXO interagiert mit dem Östrogen-, Progesteron-, Androgen-, Schilddrüsenhormon- und Glucocorticoid-Rezeptor, mit RAR (retinoic acid receptor), PPAR und HNF-4 α [106]. FOXO1 und PPAR γ hemmen sich gegenseitig [108]. SREBP-1c inhibiert IRS-2 und aktiviert dadurch FOXO1 [110].

Die Hemmung von Glycolyse, PPP und Lipogenese durch FOXO1 spräche theoretisch für einen hemmenden Einfluss von FOXO1 auf ChREBP, der bisher aber nicht gezeigt wurde [111].

Eine Deregulation von FOX-Genen könnte einerseits zu metabolischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, andererseits zur Entstehung von Neoplasien beitragen [115].

Beim Gesunden sorgt Insulin durch die Hemmung von FOXO1 und FOXA2 für Normoglycämie und für ein Gleichgewicht von Lipid-Synthese und -Oxidation [116]. Bei moderater Insulinresistenz, wie sie bei beginnendem Diabetes mellitus Typ 2 auftritt, kommt es zu einer reduzierten, aber noch vorhandenen Induktion von IRS-1 und IRS-2; FOXA2 wird durch beide IRS gehemmt, FOXO1 aber nur durch IRS-2, sodass in diesem Fall FOXA2 stärker gehemmt wird als FOXO1 und FOXO1 dementsprechend aktiver ist [116]. Die durch FOXA2 vermittelte Fettsäure-Oxidation wird daher bei moderater Insulinresistenz weiterhin supprimiert, die durch FOXO1 vermittelte Gluconeogenese wird aber kaum noch inhibiert, was insgesamt zu hepatischer Steatose, Hyperlipidämie und Hyperglycämie führt [116]. Bei absolutem Insulinmangel, wie er bei unbehandeltem Diabetes mellitus Typ 1 sowie bei fortgeschrittenem Diabetes mellitus Typ 2 vorkommt, werden IRS-1 und -2 kaum noch induziert, sodass sowohl FOXO1 als auch FOXA2 fast nicht mehr gehemmt werden und ständig aktiv sind; dies zieht eine erhöhte Gluconeogenese nach sich, was die Hyperglycämie verschlimmert, sowie eine erhöhte hepatische Fettsäure-Oxidation, was eine Ketoazidose zur Folge haben kann [116]. Eine Hemmung von FOXO1 und eventuell eine Aktivierung von FOXA2 wären in der pharmakologischen Therapie von Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus Typ 2 und hepatischer Steatose ein potentielles Ziel [9].

1.1.4.4.7 Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR)

Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) sind Transkriptionsfaktoren, deren Name von ihrer Aktivierung durch Peroxisomen-Proliferatoren stammt, eine breite Klasse xenobiotischer Substanzen, zu denen z. B. Fibrate gehören, die als lipidsenkende Medikamente eingesetzt werden [71, 88].

Es sind die drei Isoformen PPAR α , β/δ und γ bekannt [71]. PPAR α wird v. a. in der Leber ex-

Einleitung

primiert, daneben in Gastrointestinaltrakt, Skelettmuskel, Fettgewebe und Makrophagen [80, 84, 117]. PPAR γ -1 und -2 sind v. a. in insulinabhängigen Geweben wie Skelettmuskel und Fettgewebe zu finden [118]. PPAR β/δ wird ubiquitär exprimiert [117].

PPAR α reguliert die Lipid-Homöostase und die Zusammensetzung der Fettsäuren in Hepatocyten, indem es Beta-Oxidation, Transport, Export, Desaturation und Elongation von Fettsäuren kontrolliert [29]. PPAR α hemmt die Transkriptionsaktivität von LXR und SREBP-1c und verhindert so eine Akkumulation von Lipiden in Hepatocyten; es induziert allerdings die Transkription von LXR [69, 71, 83, 117]. Durch die Regulation von Apolipoproteinen und Lipoprotein-Lipase beeinflusst PPAR α den peripheren Lipid-Metabolismus [117]. In Makrophagen hemmt PPAR α die Expression inflammatorischer Faktoren wie NF- κ B [117].

PPAR γ -Agonisten – Thiazolidindione – werden in der Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt [90]. Sie fördern die Insulinsensitivität in Fettgewebe und Skelettmuskel, erhöhen die Aufnahme von Glucose in diese Gewebe – wahrscheinlich über Induktion von GLUT4 [68] –, steigern die Glycogensynthese im Skelettmuskel und reduzieren die Gluconeogenese; dadurch tragen sie zur Senkung des Blutzuckers bei [117, 119]. In Makrophagen inhibiert PPAR γ die Expression inflammatorischer Cytokine [71, 88]. PPAR γ wird als Induktor von LXR α und SREBP-1c vermutet und soll außerdem über noch unbekannte Mechanismen die Transkription von ChREBP erhöhen [67, 83, 88, 90].

PPAR β/δ scheint in Hepatocyten den Abbau von Fettsäuren zu steigern und die Lipogenese zu hemmen, teilweise über Hemmung der Prozessierung von SREBP-1c [120].

Ungesättigte Fettsäuren aktivieren die drei PPAR-Isoformen durch direkte Bindung [80, 87]. Auch gesättigte Fettsäuren, Fettsäure-Derivate, Eicosanoide und Fibrate können PPAR α teilweise aktivieren [71, 80, 84, 88]. PPAR γ kann durch Thiazolidindione aktiviert werden (siehe oben) [93].

Die Bindung von aktivierenden Liganden führt zur Konformationsänderung von PPAR, zur Hemmung von Co-Repressoren und Rekrutierung von Co-Aktivatoren, zur Bildung von Heterodimeren aus PPAR und RXR, zu deren Bindung an Promotoren ihrer Zielgene und zur Transkriptionsinduktion [117, 118]. LXR und PPAR α hemmen sich aufgrund der Konkurrenz um den gemeinsamen Partner RXR auf posttranslationaler Ebene gegenseitig, induzieren aber gegenseitig ihre Transkription [11, 69, 71].

Insulin steigert sowohl die basale als auch die durch Liganden induzierte Transkriptionsinduktion durch PPAR α , PPAR γ -1 und -2 [83, 118].

Ein Knockout von PPAR α führte in Studien zu hepatischer Steatose und Steatohepatitis aufgrund mangelnder Fettsäure-Oxidation sowie reduzierter anti-inflammatorischer Wirkung [71].

Einleitung

1.1.4.4.8 Hepatic nuclear factor-4 α (HNF-4 α)

HNF-4 α ist ein v. a. in Leber, Nieren, Darm und Pankreas exprimierter Transkriptionsfaktor, der die Expression von Enzymen der Glycolyse, Gluconeogenese und Gallensäure-Synthese, von diversen Apolipoproteinen sowie von Transferrin reguliert [80, 121]. Langkettige Fettsäuren und Cholesterin binden direkt an HNF-4 α , wobei gesättigte Fettsäuren zu einer Aktivierung, PUFAs zu einer Hemmung führen [80]. AMPK senkt die Transkription von HNF-4 α [42].

Wahrscheinlich ist HNF-4 α an der Induktion einiger Zielgene von ChREBP, z. B. L-PK oder FAS, beteiligt, da seine Bindungselemente teilweise innerhalb der ChoRE von Zielgenen liegen [122]. Außerdem wird eine funktionelle und physikalische Interaktion zwischen HNF-4 α und ChREBP postuliert, die die Bindung an Zielgene erleichtern oder stabilisieren könnte [122].

1.1.4.4.9 Glucagon

Einige Studien, vornehmlich mit Mäuse- oder Ratten-Hepatocyten in vivo oder in vitro, beschrieben eine Hemmung von endogenem ChREBP durch Glucagon. Als Erklärung wurde folgender Mechanismus postuliert: Glucagon führe zur Aktivierung der Adenylylcyclase, folglich zur Erhöhung des zellulären cAMP und dadurch zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), die ChREBP an P1 und P3 phosphoryliert und damit dessen Deaktivierung, Hemmung der DNA-Bindung sowie Translokation ins Cytosol bewirkt (siehe Abschnitt 1.1.4.3) [6, 18, 20, 26, 36, 47, 122]. Allerdings wurde nur bei einer Studie direkt der Effekt von Glucagon auf ChREBP gemessen, indem Glucagon in die Pfortader von Mäusen gespritzt und danach die subzelluläre Lokalisation von endogenem ChREBP beobachtet wurde [26]. Sämtliche übrige zitierte Studien berichteten nur indirekt oder in der Theorie über eine Hemmung von ChREBP durch Glucagon, und Studien zu den Einflüssen von Glucagon auf humanes ChREBP wurden nicht gefunden.

1.1.4.4.10 Gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren

Es gibt vier Klassen langkettiger Fettsäuren: gesättigte Fettsäuren, einfach ungesättigte ω 3-Fettsäuren sowie mehrfach ungesättigte ω 3- und ω 6-Fettsäuren (PUFAs) [80]. Der Anstieg der Konzentration an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren in der Zelle und der Metabolismus dieser Fettsäuren führen zu einer Erhöhung der AMP-Konzentration, zur Aktivierung der AMPK und dadurch zur Phosphorylierung von ChREBP an P4, was die DNA-Bindungsfähigkeit und die Transkriptionsinduktion durch ChREBP hemmt (siehe Abschnitt 1.1.4.3) [35, 53, 57]. Einige Studien bestätigen einen solchen Einfluss von gesättigten und einfach ungesättigten sowie kurzkettigen Fettsäuren auf ChREBP [35], andere hingegen bestreiten ihn [123]. Eine Transloka-

Einleitung

tion von ChREBP ins Cytosol durch gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren wurde bisher nicht beschrieben.

1.1.4.4.11 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)

Fettsäuren, insbesondere PUFAs – beispielsweise die essentiellen Fettsäuren Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3) sowie Arachidonsäure (20:4), Eicosapentaensäure (20:5) und Docosahexaensäure (22:6) –, können diverse hepatische Enzyme auf verschiedenen Wegen beeinflussen: direkt über deren Transkription oder indirekt über Metabolite, Second messenger oder die Beeinflussung von Menge und Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren [53, 87]. PUFAs inhibieren die hepatische Glycolyse und die DNL, außerdem die Elongation und Desaturation von Fettsäuren, und sie fördern die Beta-Oxidation; dadurch vermitteln sie ein negatives Feedback und kontrollieren den zellulären Gehalt an gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren [3, 29, 80]. Herunterreguliert durch PUFAs werden z. B. ChREBP, LXR α , SREBP-1c oder HNF-4 α , heraufreguliert wird PPAR α [87]. Die Effekte von PUFAs differieren je nach Kettenlänge, Grad der Sättigung und akutem Zustand des zellulären Metabolismus [87].

Für einige PUFAs, z. B. Linolensäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure, wird eine Hemmung der Aktivität von ChREBP auf mehrere Arten beschrieben [3, 53, 123]. Erstens sollen diese PUFAs Reifung und Stabilität der mRNA von ChREBP vermindern und/oder deren Abbau steigern. Zweitens verhindern sie die Translokation von ChREBP aus dem Cytosol in den Nucleus sowie dessen DNA-Bindung, was teilweise über eine Hemmung von Glycolyse und PPP und reduzierte Bildung von X5P vermittelt wird (u. a. wahrscheinlich durch Hemmung der Schlüsselenzyme GK und G6PDH) [3]. Drittens scheinen PUFAs, unabhängig davon, die Aktivität von ChREBP durch die Aktivierung der in Abschnitt 1.1.4.3 beschriebenen AMPK zu hemmen [3, 56]. Ob PUFAs auch einen Einfluss auf die Transkription von ChREBP haben, ist noch nicht geklärt [3, 123].

PUFAs hemmen die DNL auch als kompetitive Antagonisten von Oxysterolen, den Liganden von LXR, sowie durch Inhibierung der Transkription und Prozessierung von SREBP-1c; sie aktivieren hingegen die Fettsäure-Oxidation durch Induktion von PPAR α [3, 69, 124].

PUFAs scheinen hepatische Steatose und Insulinsensitivität zu verbessern; dies könnte teilweise der Hemmung von SREBP-1c, die Verbesserung der Insulinsensitivität aber eher der Hemmung von ChREBP zugeschrieben werden [3]. Die beschriebenen PUFAs stellen essentielle Fettsäuren dar (Linol- und Linolensäure) bzw. werden aus solchen synthetisiert (Arachidon-, Eicosapentaen- und Docosahexaensäure), sodass ihre Zufuhr bzw. die Zufuhr ihrer Vorstufen über die Nahrung zu erfolgen hat.

Einleitung

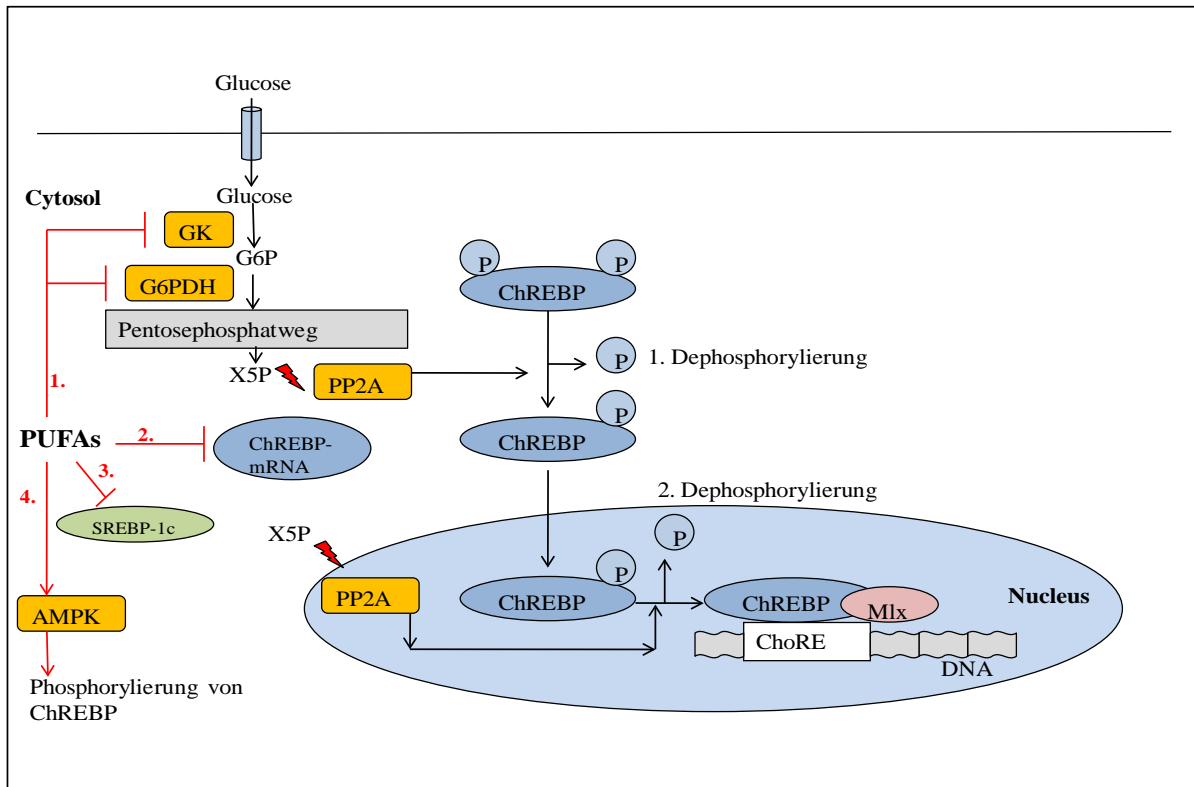


Abbildung 10: Auswirkungen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) auf ChREBP (nach [3]).

1.1.4.4.12 Weitere Faktoren

Weitere mögliche Faktoren, die in der Regulation von ChREBP potentiell eine Rolle spielen könnten, deren Einflüsse auf ChREBP aber bislang wenig erforscht sind, stellen Hormone wie Schilddrüsenhormone oder Glucocorticoide dar, aber auch weitere Transkriptionsfaktoren. Für Adrenalin, das wie Glucagon zur Erhöhung von cAMP in der Zelle beiträgt, wurde bisher kein direkter Einfluss auf ChREBP nachgewiesen [26]. Eine Studie fand je zwei Bindungsstellen im Promotor von ChREBP für Specificity protein 1 (Sp1) und Nuclear factor-Y (NF-Y) [103]. Der Transkriptionsfaktor c-Myc im Komplex mit Max scheint für die volle Expression der Zielgene von ChREBP nötig zu sein, indem er mit ChREBP an die DNA bindet und Co-Aktivatoren rekrutiert; der Transkriptionsfaktor Mad hingegen bindet im Komplex mit Max an dieselben Sequenzen wie c-Myc-Max, aktiviert aber Co-Repressoren [125]. Eine Studie berichtet, ChREBP sowie SREBP-1c induzierten in Hepatocyten den Transkriptionsfaktor BHLHB2/DEC1, der ChREBP von seinen ChoRE verdrängt und somit einen Feedback-Mechanismus zum Schutz vor überschießender Lipogenese darstellt [126]. Eine Regulation der Transkriptionsaktivität von ChREBP über Co-Aktivatoren und Co-Repressoren ist zu vermuten, allerdings liegen darüber

wenige Daten vor. Weiterhin könnte ChREBP theoretisch über Einflüsse auf seinen DNA-Bindungspartner Mlx gesteuert werden; allerdings scheint Mlx nur in geringem Ausmaß reguliert zu werden und konstitutiv sowie abundant in den Zellen vorhanden zu sein, sodass eine Regulation von Mlx wahrscheinlich für die Aktivität von ChREBP keine größere Rolle spielt [12, 16].

1.2 Erkrankungen, die mit ChREBP in Zusammenhang stehen könnten

Einerseits spielt ChREBP als „thrifty gene“ eine wichtige Rolle für die Bereitstellung von Energiereserven in Hungerzeiten, da es die Umwandlung von Kohlenhydraten in Fette ermöglicht. Andererseits könnte sich aber eine Überexpression und Überstimulation von ChREBP negativ auswirken und möglicherweise zur Entstehung von Übergewicht sowie daraus resultierenden Erkrankungen wie Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2, metabolischem Syndrom und hepatischer Steatose führen [22].

1.2.1 Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2

Insulinresistenz ist das Resultat von Signaldefekten im Insulinsignalweg und kann genetische und epigenetische Defekte als Grundlage haben, wird aber in hohem Maße durch Lebensstil- und Umweltfaktoren moduliert [11, 28]. Möglicherweise spielt der Transkriptionsfaktor ChREBP eine Rolle in der Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2. Einerseits könnte eine pathologisch starke Expression und/oder Aktivierung von ChREBP durch gesteigerte Synthese von Fettsäuren zu zellulärer Lipid-Akkumulation führen, welche die Wirkung von Insulin stören und somit eine Insulinresistenz fördern kann. Andererseits könnte eine bestehende Insulinresistenz auf folgendem Wege Expression und Aktivierung von ChREBP steigern: Bei Insulinresistenz kommt es zur Hyperglycämie, weil normale im Blut zirkulierende Konzentrationen von Insulin in diesem Fall nicht ausreichen, um den Einstrom von Glucose in insulinabhängige Zellen effektiv zu erhöhen und die hepatische Gluconeogenese zu supprimieren [28]. Die Hyperglycämie führt zur Steigerung der Insulinproduktion, sodass bei beginnender Insulinresistenz zugleich Hyperglycämie und Hyperinsulinämie vorliegen; diese lassen eine starke Induktion der Transkriptionsfaktoren ChREBP und SREBP-1c vermuten – und damit eine gesteigerte Lipogenese, welche wiederum die Insulinresistenz der Zellen verstärkt [96]. Die fördernde Wirkung von Insulin auf die Lipogenese ist bei Insulinresistenz weniger stark eingeschränkt als die hemmende Wirkung auf die Gluconeogenese.

Außerdem erhöhen Hyperglycämie und Hyperinsulinämie durch die Steigerung metabolischer Prozesse in der Zelle die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) [113]. ROS können DNA-Schäden verursachen, inhibieren die Insulinsignal-Kaskade, u. a. durch Blockade des Insulin-Rezeptors sowie von IRS, und aktivieren über bestimmte Mediatoren FOXO [113]. Die Störung

Einleitung

der Insulinkaskade hat einen verminderten Einstrom von Glucose in insulinabhängige Zellen und damit einen Schutz vor weiterem oxidativem Stress zur Folge [113]. FOXO schützt vor oxidativem Stress, indem es Enzyme induziert, die ROS detoxifizieren, und in Beta-Zellen die Insulinsekretion reduziert [113]. Offenbar überwiegt in insulinabhängigen Zellen die Störung der Insulinsensitivität durch oxidativen Stress die positive Wirkung des durch ROS induzierten FOXO auf die Insulinsensitivität [113]. Eine Studie postuliert, Insulinresistenz könne auf zellulärer Ebene als physiologischer Schutzmechanismus als Reaktion auf chronische Hyperglycämie aufgefasst werden, weil so in insulinabhängigen Zellen Glucose-Einstrom und dadurch induzierter oxidativer und nicht-oxidativer Schaden vermindert würden und außerdem, auch in Hepatocyten, ein Schutz vor Lipidüberladung der Zelle und vor Lipotoxizität entstehe [113]. Kurzfristig stellt Insulinresistenz einen adaptiven physiologischen Prozess dar und verlängert das Leben der einzelnen Zelle [113]. Wird die initiale Insulinresistenz aber durch langfristige Hyperglycämie chronisch, entsteht daraus ein im Hinblick auf den gesamten Organismus maladaptiver Prozess, der zu Diabetes mellitus Typ 2 mit seinen Folgen führen kann [113].

Möglicherweise führen Übergewicht und Akkumulation von Fett zu einer Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und in der Folge zu einer chronischen niedriggradigen Inflammation, welche den Insulin-Signalweg zusätzlich stört [60].

Wie in Abschnitt 1.1.4.4.6 beschrieben, wird FOXA2 durch IRS-1 und IRS-2 gehemmt, FOXO1 nur durch IRS-2 [116]. Zusätzlich scheint IRS-2 bei moderater Insulinresistenz stärker herunterreguliert zu werden als IRS-1 [96]. In diesem Fall wird daher die über FOXA2 vermittelte Oxidation von Fettsäuren stärker gehemmt als die über FOXO1 vermittelte Gluconeogenese, wodurch es zu weiterer Verstärkung der Hyperlipidämie und Hyperglycämie kommt [116].

Im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf des Diabetes mellitus Typ 2 kann es zur Erschöpfung der Insulinproduktion der Beta-Zellen und zu absolutem Insulinmangel kommen. Dann wäre theoretisch zu erwarten, dass die bestehende Hyperglycämie in Verbindung mit dem Insulinmangel hauptsächlich zu einer starken Induktion von ChREBP führt. Da Glucose in die Leber insulinunabhängig über den GLUT2 aufgenommen werden kann, im Gegensatz zu Skelettmuskel- und Fettzellen, die den insulinabhängigen GLUT4 exprimieren, wäre es möglich, dass ChREBP bei Diabetes mellitus Typ 2 aufgrund des erhöhten Glucose-Einstromes in Hepatocyten gerade dort eine Hochregulation erfährt, was zu hepatischer Steatose führen kann (siehe Abschnitt 1.2.2), und in anderen Geweben, in denen intrazellulärer Glucosemangel herrscht, eher eine Herunterregulation. SREBP-1c, das durch Insulin und LXR induziert wird, würde in dieser Phase in den meisten Geweben eher supprimiert werden.

Für pankreatische Beta-Zellen postuliert eine Studie einen „Stress des Endoplasmatischen Reti-

Einleitung

culums“, der durch Hyperglycämie und gesteigerte Proteinsynthese verursacht werden und Prozessierung und Aktivität von SREBP-1c induzieren soll [127]. In diesen Zellen führt der ständig erhöhte Glucose-Gehalt in Verbindung mit der durch ChREBP und SREBP-1c verursachten Akkumulation von Fettsäuren zur Dysfunktion und schließlich zur Apoptose; dieser Prozess wird als Glucolipotoxizität bezeichnet [44]. SREBP-1c scheint an der Glucolipotoxizität in höherem Maße beteiligt zu sein als ChREBP [127].

Zusammenfassend lässt sich die Hypothese aufstellen, dass in der Anfangsphase von Diabetes mellitus Typ 2 durch Hyperglycämie und Hyperinsulinämie möglicherweise ChREBP und SREBP-1c in der Leber induziert werden und zu hepatischer Steatose führen, während in späteren Phasen, die durch Hyperglycämie und Insulinmangel charakterisiert sind, hauptsächlich ChREBP induziert wird.

1.2.2 Nicht-alkoholische Fettleber-Erkrankung (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

Unter dem Begriff NAFLD werden verschiedene Erkrankungen zusammengefasst, die den histologischen Befund einer makrovesikulären hepatischen Steatose aufweisen und nicht durch Alkoholkonsum verursacht sind [33]. Hierzu zählen die einfache hepatische Steatose, die Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) mit Entzündung und Nekrose, die Leberfibrose, die zur Leberzirrhose fortschreiten kann, und das hepatozelluläre Karzinom [3, 19, 28].

NAFLD ist gekennzeichnet durch eine exzessive Akkumulation von Triacylglycerinen (TAG) in der Leber, die durch gesteigerte Synthese und/oder verminderte Beta-Oxidation von Fettsäuren zustande kommt und im Verlauf der Erkrankung über Lipotoxizität zur Apoptose von Hepatocyten, zu Entzündung und Leberschäden führen kann [53]. Die Diagnose einer NAFLD wird durch Anstieg der Transaminasen (ASAT, ALAT), das sonographische Bild einer Fettleber, Vorliegen eines hohen BMI und eines metabolischen Syndroms gestellt [28]. Die akkurate Diagnose einer NAFLD ist aufgrund der Vielzahl histopathologischer Sonderformen einer Fettleber und des Fehlens verlässlicher Krankheitsmarker schwierig zu stellen [11].

NAFLD ist die häufigste Ursache für chronische Lebererkrankungen in industrialisierten Ländern und in etwa 50-80 % der Fälle assoziiert mit Komponenten des metabolischen Syndroms, also mit Übergewicht/Adipositas, abdomineller Fettverteilung, arterieller Hypertonie, Hypertriglyceridämie, Hypercholesterinämie und Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus Typ 2 [3, 11, 19, 28, 33]. Eine Fettleber ist außerdem mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Leberzirrhose und Tumorerkrankungen assoziiert [11].

Die Entwicklung einer NAFLD ist in den meisten Fällen wahrscheinlich multifaktoriell bedingt,

Einleitung

sowohl durch genetische und epigenetische Faktoren als auch durch Umweltfaktoren.

In der Leber befindliche TAG können direkt aus der Nahrung stammen – aus dem Darm gelangen TAG als Chylomikronen in die Zirkulation –, werden von der Leber aus dem Pool an Nicht-esterierten Fettsäuren (NEFA) im Serum synthetisiert – der sich u. a. aus den aus peripherem Fettgewebe freigesetzten Fettsäuren speist – oder werden de novo in der Leber synthetisiert (DNL), wenn die Glycogen-Speicher der Leber bei hoher Kohlenhydrat-Zufuhr gefüllt sind.

In der DNL hergestellte TAG werden entweder als Fett-Tropfen in Hepatocyten gespeichert, als VLDL ins Blut abgegeben oder in der Beta-Oxidation abgebaut – wobei der letztere Weg bei gleichzeitiger DNL normalerweise supprimiert ist [28]. Eine exzessive Akkumulation von Fett in der Leber kann das Resultat sein von erhöhter Aufnahme von Lipiden in die Leber – welche durch fettreiche Ernährung oder durch erhöhten Fettsäure-Einstrom bei Lipolyse im Fettgewebe bedingt sein kann –, von erhöhter Synthese von Fettsäuren in der Leber, von reduzierter Beta-Oxidation oder von verminderter Synthese oder Sekretion von VLDL durch die Leber [28, 128]. Bei NAFLD spielen wahrscheinlich v. a. ein erhöhter Fluss von Fettsäuren aus der Peripherie zur Leber sowie eine gesteigerte DNL eine Rolle [28, 33]. Normalerweise ist die DNL im Fastenzustand reduziert und wird nach Aufnahme einer kohlenhydratreichen, fettarmen Mahlzeit gesteigert [129]. Bei NAFLD ist die DNL im Fastenzustand erhöht, und der postprandiale Anstieg der DNL fehlt, weil das lipogene Potential erschöpft ist [33, 130]. In der späten Phase des Diabetes mellitus Typ 2, bei Hyperglycämie und Insulinmangel, wird die Synthese von Fettsäuren in der Leber stärker als deren Sekretion stimuliert, was eine hepatische Steatose fördert [129].

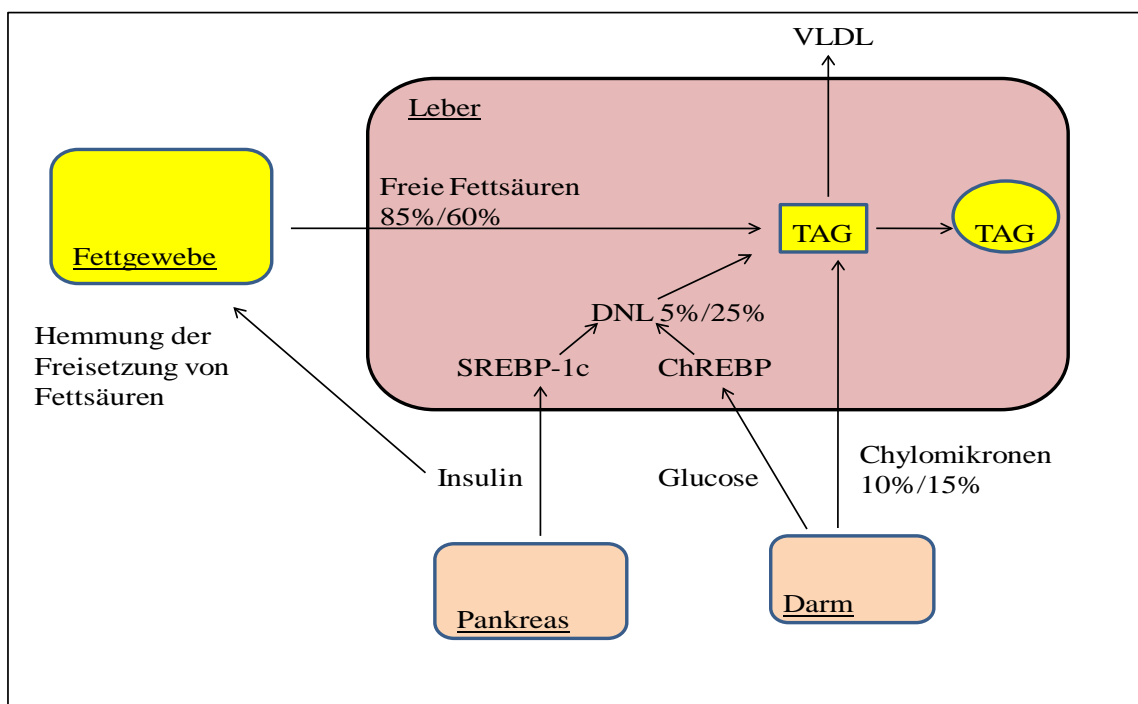


Abbildung 11: Herkunft von Fettsäuren für TAG in der Leber bei Gesunden (erste Zahl) und bei NAFLD (zweite Zahl) (nach [33]).

Fettgewebe speichert Fett grundsätzlich ohne Auftreten von Lipotoxizität, wie sie in anderen Geweben vorkommen kann, und es verhindert, dass potentiell schädliche Lipide in zu großer Menge in das Blut abgegeben werden [11]. Bei chronischer Überernährung ist die Pufferkapazität des Fettgewebes jedoch überlastet, sodass Fett in die Blutbahn gelangt, wo es zu Atherosklerose führen kann, und in anderen Organen wie der Leber abgeladen wird, wo es zur Verfettung, zu Schäden durch Lipotoxizität und zu Insulinresistenz führen kann [11].

NAFLD ist in der Mehrzahl der Fälle mit Insulinresistenz assoziiert [11]. Es gibt mehrere Hypothesen zur Rolle von Insulinresistenz in der Pathophysiologie der NAFLD. Ob Insulinresistenz oder die hepatische Steatose am Anfang steht, ist umstritten. Wahrscheinlich treten beide in zeitlichem und kausalem Zusammenhang auf und verstärken sich gegenseitig.

Bei Insulinresistenz wird hormonsensitive Lipase aktiviert, die im Fettgewebe zu Lipolyse führt, und Lipoprotein-Lipase deaktiviert, die normalerweise die Aufnahme von Fettsäuren in periphere Gewebe vermittelt, sodass sich der Strom von Fettsäuren zur Leber insgesamt erhöht [11]. Insulinresistenz soll Expression und Aktivität des Faktors SREBP-1c erhöhen, der eine hepatische Steatose begünstigt [3, 40, 96, 131]. Hepatische Insulinresistenz äußert sich v. a. in einer inadäquat unterdrückten hepatischen Glucoseproduktion, während die durch Insulin gesteuerte Induktion lipogener Enzyme weniger stark beeinträchtigt wird, sodass die mit Hyperglycämie einhergehende Hyperinsulinämie zu einer Induktion der hepatischen DNL, zur Reduktion der Beta-Oxidation und zur weiteren Steigerung des Blutzuckers führt [27, 60]. Alle diese von Insulinresistenz ausgehenden Prozesse bewirken eine Akkumulation von Fettsäuren in der Leber, was wiederum den Insulin-Signalweg stört [28, 57]. Die Insulinresistenz von Adipocytten und Hepatocytten kann als Schutz vor weiterer Überladung mit Fett, vor Lipotoxizität und Apoptose aufgefasst werden [11].

Für einige weitere Faktoren wird eine Beteiligung an der Entstehung von NAFLD vermutet. Ein Mangel an Leptin kann zu Übergewicht, Hyperglycämie, Insulinresistenz, Hyperlipidämie, gesteigerter hepatischer DNL und Fettleber führen [45, 100]. Defekte in Adipocytten können eine gestörte Fettspeicherung im Fettgewebe und z. B. erhöhte Lipolyse nach sich ziehen [11]. Mit Übergewicht und Insulinresistenz ist häufig eine chronische niedriggradige Entzündung assoziiert; möglicherweise führt eine Verfettung der Leber zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Diese chronische Entzündung kann einerseits die Expression von SREBP-1c und damit die DNL erhöhen, andererseits den durch Lipide verursachten Gewebeschaden verstärken, indem

Einleitung

sie zur Apoptose von Hepatocysten und Leberfibrose führt [71]. Außerdem soll sie die Insulinresistenz weiter fördern. Ein Ungleichgewicht zwischen NF- κ B und dem anti-inflammatorisch wirkenden PPAR verstärkt die Entzündung [71]. Es gibt einzelne Hinweise in der Literatur, dass Nahrungsmittel mit hohem Gehalt an Fructose die Entstehung einer Fettleber begünstigen.

Beispiele für Transkriptionsfaktoren, deren Regulationsstörungen theoretisch zu NAFLD beitragen könnten, sind ChREBP, LXR, SREBP-1c, PPAR α und FXR [73]. Eine Überexpression oder Überstimulation von ChREBP, LXR und SREBP-1c steigert die Lipogenese; eine Reduktion von PPAR α , welcher die Sekretion und die Oxidation von Fettsäuren fördert, oder von FXR, der LXR und SREBP-1c hemmt, erhöht die Lipid-Akkumulation [11]. Einige Studien berichten, v. a. eine Überexpression von SREBP-1c oder auch LXR, weniger von ChREBP, scheine zu hepatischer Steatose zu führen; bei NAFLD wurden geringere Expressionslevel von ChREBP, aber erhöhte von SREBP-1c und LXR beobachtet [3, 67]. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine Störung im Abbau von Glucose darstellen, die durch TAG-Akkumulation und Insulinresistenz der Hepatocysten hervorgerufen wird und eine geringere Transkription und Aktivierung von ChREBP zur Folge hätte [67].

In der Therapie von NAFLD spielen Diät, Gewichtsreduktion und Bewegung eine wichtige Rolle [28, 33]. Die Zufuhr von PUFAs und die Reduktion von Mono- und Disacchariden in der Nahrung sollen die Lipogenese senken [11, 53]. Thiazolidindione, selektive Agonisten von PPAR γ , sollen die Insulinresistenz, den chronischen Entzündungsstatus und dadurch die hepatische Steatose reduzieren [28]. Adiponectin verbessert anscheinend die Insulinsensitivität und senkt die hepatische Lipogenese und Steatose [69].

Für die zukünftige Entwicklung von gezielt angreifenden Pharmaka ist ein genaueres Wissen über Funktion und Regulation der Transkriptionsfaktoren nötig, die die Fettsäure-Synthese in der Leber modulieren – also z. B. ChREBP, LXR und SREBP-1c [28]. Möglicherweise könnte eine Reduktion von Expression und/oder Aktivität von ChREBP positive Effekte in der Behandlung von NAFLD und weiteren metabolischen Erkrankungen haben, die mit Hyperglycämie und Dyslipidämie assoziiert sind (siehe Abschnitt 1.2.4) [28].

1.2.3 Williams-Beuren-Syndrom (WBS)

Das Williams-Beuren-Syndrom (WBS) gehört zu den chromosomalen Mikrodeletions-Syndromen; durch spontane Mutation kommt es heterozygot zu Deletionen im Bereich des Chromosoms 7q11.23, von denen etwa 17 bis 20 benachbarte Gene, unter ihnen das Gen für ChREBP, betroffen werden [132].

Die Erkrankung wirkt sich auf verschiedene Gewebe wie Blutgefäße, Bindegewebe und ZNS

Einleitung

aus. U. a. treten häufig neurologische Entwicklungsstörungen, faziale Dysmorphien, Hörstörungen und kardiovaskuläre Veränderungen auf, insbesondere Herzfehler (supravalvuläre Aortenstenose) [132, 133]. Die Lebenserwartung ist normal, sofern nicht medizinische Probleme und organische Fehlbildungen zu einer Einschränkung führen [133].

Der Beitrag der meisten zerstörten Gene, inclusive WBSR14 alias ChREBP, zum Phänotyp des Williams-Beuren-Syndroms ist bisher noch nicht geklärt [36]. Einen Hinweis auf ChREBP könnte die Beobachtung liefern, dass etwa 75 % der Patienten mit WBS eine gestörte Glucosetoleranz oder einen subklinischen Diabetes entwickeln, was möglicherweise durch den teilweisen Verlust von ChREBP und damit durch eine Einschränkung der Fähigkeit, auf Glucose mit Glycolyse und Lipogenese zu reagieren, bedingt sein könnte [16, 55].

1.2.4 Experimente mit ChREBP-Knockout

Mehrere Studien – meistens mit Mäusen – beschäftigten sich mit einem Knockout von ChREBP. Ein Knockout wurde z. B. mit shRNA (auf Adenoviren basierende short-hairpin-RNA-Technologie) [19], ein Knockdown mit siRNA (small interfering RNA) erreicht [43].

Ein leberspezifisches Knockout von ChREBP führte in diesen Studien zur Reduktion der hepatischen Lipogenese, Steatose und Gluconeogenese, zur Steigerung der Beta-Oxidation und des Glycogengehaltes der Leber, zu reduzierter Fettmasse, zur Verbesserung der Insulinsensitivität in Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe sowie zu einer deutlichen Verbesserung von Hyperlipidämie, Hyperglycämie und Hyperinsulinämie [3, 19, 26-28, 134].

Die Steigerung der Beta-Oxidation bei Knockdown von ChREBP scheint durch die geringere Expression von ACC zustande zu kommen, wodurch CPT-1, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Beta-Oxidation, aktiviert wird [3]. Der erhöhte Glycogengehalt der Leber wird einer aufgrund der Reduktion der Glycolyse erhöhten Akkumulation von G6P zugeschrieben, welches dann vermehrt zur Glycogensynthese verwendet wird [45].

Es wurde beobachtet, dass die ChREBP-Knockout-Mäuse eine Intoleranz gegenüber der Aufnahme hoher Mengen an Mono- und Disacchariden aufwiesen, was auf die reduzierte Glycolyse und die Akkumulation von Glucose zurückgeführt wurde [6]. Fructose oder Saccharose führten zu Morbidität oder gar zum Tod der Tiere durch Hypothermie und Gewichtsverlust [6, 134]. Die Intoleranz gegenüber Fructose könnte dadurch bedingt sein, dass ChREBP die Enzyme Fructokinase und Triose-Kinase für den Eintritt von Fructose in die Glycolyse induziert und das Fehlen dieser Enzyme zu einer Akkumulation von Fructose führt [6].

Weiterhin wurde eine verbesserte Appetitkontrolle beobachtet, deren Ursache in einer geringeren Expression des appetitstimulierenden Neuropeptids Agouti-related protein im Hypothalamus

Einleitung

vermutet wurde [45].

Eine weitere Studie stellte nach ChREBP-Knockout eine Energiedefizienz der Leber fest [134]. Diese hing mit einem veränderten Verhältnis von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$, einem gestörten Redox-Status von Mitochondrien und Cytosol, niedrigen ATP-Konzentrationen und einem verminderten Potential für Oxidationsprozesse zusammen [134].

Bei ob/ob-Mäusen, also Mäusen mit Knockout von Leptin, waren zunächst Expression und nucleärer Gehalt von ChREBP sowie die Lipogenese in der Leber erhöht [27]. Zusätzliches Knockout von ChREBP führte auch hier zu den oben genannten positiven Effekten.

Bei Mäusen mit Knockout für SREBP-1c wurde sekundär eine verringerte Aktivität von ChREBP beobachtet, was durch verminderte Glycolyse und PPP erklärt werden könnte, da SREBP-1c GK induziert, die das Substrat G6P für diese Stoffwechselwege bereitstellt [43, 135]. Ob die Ergebnisse dieser tierexperimentellen Studien auf den Menschen übertragbar sind und zu neuen Therapiemöglichkeiten führen könnten, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

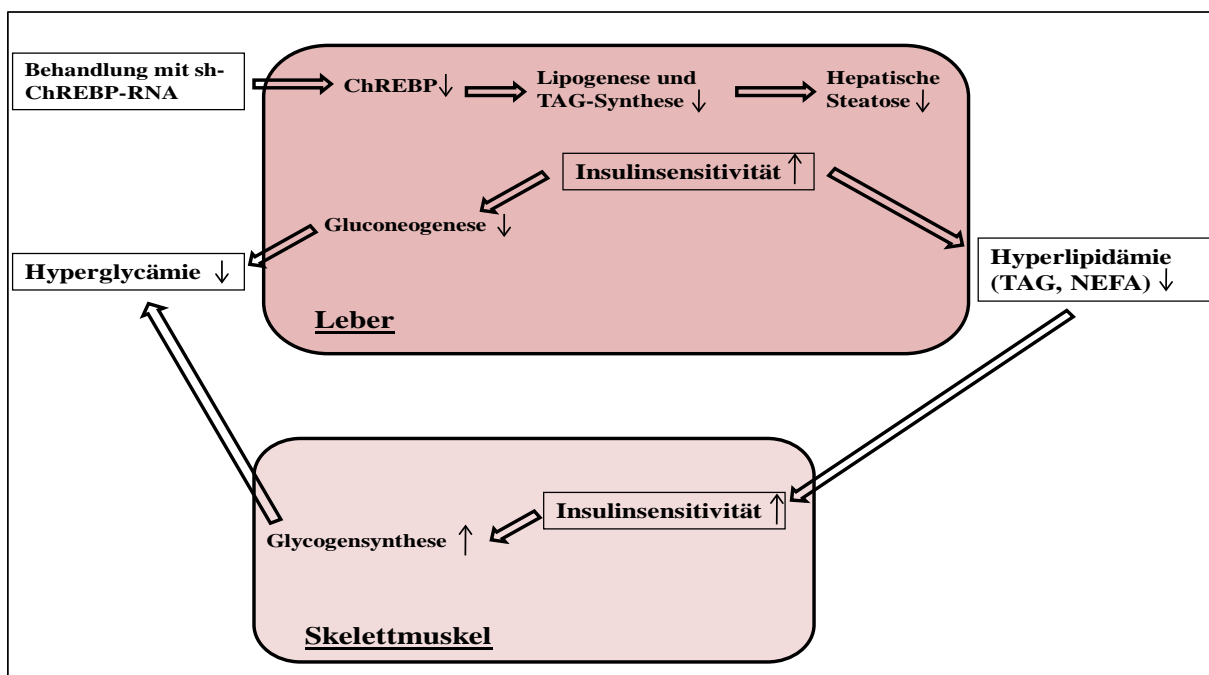


Abbildung 12: Experimente mit Knockout von ChREBP und Auswirkungen auf die Pathophysiologie im Rahmen des metabolischen Syndroms (nach [19]).

1.3 Aufgabenstellung

Aufgrund der geschilderten wichtigen Funktionen von ChREBP, v. a. der Induktion der Lipogenese, kommt diesem Transkriptionsfaktor wahrscheinlich eine große Bedeutung in Physiologie und Pathophysiologie von metabolischen Prozessen in der Leber zu. Es kann vermutet werden, dass ChREBP eine Rolle – bislang ungeklärten Ausmaßes – in der Entstehung von Übergewicht,

Einleitung

hepatischer Steatose und Insulinresistenz spielt. Dies wird v. a. in den vorgestellten Studien zur Ätiologie von NAFLD und in den tierexperimentellen Studien mit Knockout von ChREBP deutlich. Daher könnte dieser Transkriptionsfaktor in Zukunft einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Pharmakotherapie metabolischer Erkrankungen bieten, die durch Dysregulation von Glucose- und Lipid-Metabolismus charakterisiert sind; die Relevanz dieser Erkrankungen wird durch ihre weltweit hohe Prävalenz hervorgehoben [3, 22]. Eine Hemmung von ChREBP könnte eventuell die hepatische Lipogenese reduzieren, die Beta-Oxidation steigern, eine hepatische Steatose verringern und die Insulinsensitivität verbessern.

Voraussetzung für die Entwicklung von Pharmaka, die ChREBP zum Ziel haben, ist eine genaue Kenntnis der Mechanismen, die für Expression und Aktivierung von ChREBP verantwortlich sind [26]. Bisher ist über die Regulations-Mechanismen von ChREBP beim Menschen, gerade unter physiologischem und pathophysiologischem Einfluss von Ernährung und Hormonen, nur wenig bekannt. Künftige Studien sollten daher mögliche Einflussfaktoren auf die Regulation von ChREBP beim Menschen genauer erforschen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einiger Substanzen und Parameter, die an der Regulation von ChREBP in humanen Leberzellen beteiligt sein könnten. Es sollte erforscht werden, ob, wie und in welchem Umfang sie ChREBP beeinflussen. Dazu wurden Versuche mit Zellkulturzellen (humane Hep G2-Zellen) durchgeführt; es wurden humane und nicht murine Zellen ausgewählt, weil erstere die Regulation im menschlichen Organismus, die letztlich für die Entwicklung von Pharmaka bekannt sein müsste, am besten widerspiegeln. Zunächst sollte anhand von Stimulationen mit Glucose die Reaktion von ChREBP sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf posttranslationaler Ebene in den Hep G2-Zellen überprüft sowie deren Ausmaß festgestellt werden. Eine Unterscheidung zwischen mRNA- und Protein-Ebene sollte erfolgen, weil verschiedene Substanzen ChREBP auf den verschiedenen Ebenen in unterschiedlichem Umfang aktivieren können. Im Vergleich zu Glucose sollte Fructose untersucht werden, weil aufgrund der Beobachtung, dass Fructose-Konsum häufig mit verstärkter Lipogenese verbunden ist, ein Einfluss auf ChREBP vermutet wurde. Glucagon und Insulin als wichtige Hormone der Energiehomöostase des Organismus sollten ebenfalls auf eine Beeinflussung von ChREBP getestet werden. Ein weiteres Ziel war der Vergleich, ob und welche Unterschiede zwischen akuter und langfristiger Regulation von ChREBP, also bei kurzen und langen Expositionszeiten, bestehen.

Weiterführend beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe mit der Entwicklung von kloniertem ChREBP, das durch Kopplung mit „Green fluorescence protein“ nach Transfektion und Stimulation mikroskopisch in einzelnen Zellkompartimenten detektiert werden kann, sowie mit der Untersuchung menschlicher Leberzellproben aus Biopsien auf den Fettgehalt und auf ChREBP.

2 Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Agarose	Gibco BRL Life Technologies/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ammoniumperoxidsulfat	Merck (Darmstadt, D)
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Biotinylierte Protein-Leiter	Cell Signaling Technology (Frankfurt am Main, D)
Bovines Serum-Albumin	Dade Behring Marburg GmbH (Marburg, D)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Complete Mini, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
D-(-)-Fructose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
D-(+)-Glucose 99,5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Dithiothreitol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
DNA-Ladepuffer	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
DNA-Marker: GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, O'GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder, O'RangeRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
Dodecylsulfat-Natriumsalz	Merck (Darmstadt, D)
EDTA, 0,5 M	Merck (Darmstadt, D)
Essigsäure, 100 %	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol	Merck (Darmstadt, D)
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Fötales Bovines Serum	Biochrom AG (Berlin, D)
Glucagon, human	Calbiochem® (Darmstadt, D)
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Insulin solution human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, D)

Methodik

LumiGLO [®] Reagent	Cell Signaling Technology (Frankfurt am Main, D)
Magermilchpulver Sucofin	Trade Service International (Zeven, D)
Natriumchlorid, $\geq 99,5$ %, p. a.	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom AG (Berlin, D)
Ölsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Peroxid	Cell Signaling Technology (Frankfurt am Main, D)
Protein-Marker: BenchMark [™] Pre-stained Protein Ladder	Gibco BRL Life Technologies/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Pufferan [®] , ≥ 99 %, p. a.	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Recombinant RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor	Promega GmbH (Mannheim, D)
Roti [®] -Blue (Coomassie-Färbung)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Roti [®] -Nanoquant	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Rotiphorese [®] Gel 40 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Rotipuran [®] , $\geq 99,9$ %, p. a.	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Salzsäure, 1 mol/l	Merck (Darmstadt, D)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Tris Pufferan [®] $\geq 99,3$ %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
TrypLE [™] Express, Stable Trypsin-like Enzyme without Phenol Red	Invitrogen (Karlsruhe, D)
TWEEN [®] 20 (Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
Wasser, BioChemika, behandelt mit Diethylpyrocarbonat, steril filtriert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)

2.1.2 Restriktionsenzyme

FastDigest [™] PstI	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
PshA I	BioLabs [™] GmbH (Ulm, D)

2.1.3 Kulturmedien

Dulbecco's MEM (DMEM)	Dulbecco's modified Eagle's medium, mit 3,7 g/l NaHCO ₃ , ohne D-Glucose, ohne L-Glutamin; Biochrom AG (Berlin, D)
MEM-EARLE (EMEM)	MEM (Minimal essential medium) mit Earle's Salzen, mit 2,2 g/l NaHCO ₃ , mit stabilem Glutamin, mit niedrigem Endotoxin; Biochrom AG (Berlin, D)
PBS-Dulbecco	PBS-Dulbecco, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , mit niedrigem Endotoxin; Biochrom AG (Berlin, D)

2.1.4 Reaktionskits**2.1.4.1 DNA-Polymerasen**

AmpliTaQ Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems Deutschland GmbH (Darmstadt, D)
GoTaq [®] Green Master Mix	Promega GmbH (Mannheim, D)
Pfu FastStart high Fidelity	Promega GmbH (Mannheim, D)

2.1.4.2 Protein-Extraktion

Nuclear Extract Kit, Version C4	Active Motif Chromeon GmbH (Tegernheim, D)
---------------------------------	--

2.1.4.3 RNA-Extraktion und RT-PCR

High Pure RNA Isolation Kit, Version 12/2007	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
SV Total RNA Isolation System, Version 08/2005	Promega GmbH (Mannheim, D)
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen GmbH (Hilden, D)

2.1.4.4 DNA-Extraktion

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH (Hilden, D)
-----------------------------	-------------------------

2.1.5 Primer für RT-PCR

Die in der RT-PCR verwendeten Primer für ChREBP und HPRT wurden bei Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) bestellt, diejenigen für Beta-Actin und GAPDH bei Prologo (Hamburg, D).

Primername	Primersequenz	Lokalisation in cDNA
hChREBP1-1 up	5'-TCA CAC ACC AGC GTT TTG ACC-3'	E 15, BP 2273-2293
hChREBP1-1 lo	5'-GAT GAG GAT GCT GAA CAC CCA G-3'	E 15-16, BP 2352-2373
hChREBP1-2 up	5'-AGA TTG AGG AGC TCA ATG CCG-3'	E 14, BP 2207-2227
hChREBP1-2 lo	5'-CAT GTC TCG CAT CTG GTC AAA A-3'	E 15, BP 2286-2307
Beta-Actin up	5'-CAA GAG ATG GCC ACG GCT GCT-3'	E 4, BP 757-777

Methodik

Beta-Actin lo	5'-TCC TTC TGC ATC CTG TCG GCA-3'	E 5, BP 1011-1031
GAPDH up	5'-CCA CAT CGC TCA GAC ACC AT-3'	E 2, BP 85-104
GAPDH lo	5'-CCA GGC GCC CAA TAC G-3'	E 3, BP 139-154
HPRT up	5'-TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA-3'	E 6, BP 578-598
HPRT lo	5'-GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3'	E7, BP 651-671

Tabelle 3: Bei der RT-PCR verwendete Primer. BP = Basenpaare; E = Exon.

2.1.6 Antikörper für Western Blots

2.1.6.1 Erst-Antikörper

Antikörper-Bezeichnung	Firma	Wirt	Spezies-Reaktivität
Rabbit Polyclonal anti-ChREBP	Novus Biologicals (Hiddenhausen, D)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte
ChREBP Polyclonal Antibody	Cayman Chemical (Hamburg, D)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte
ChREBP [P-13]: sc-21189	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, D)	Ziege	Mensch, Maus, Ratte
A-Tubulin Antibody	Cell Signaling Technology (Frankfurt am Main, D)	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte, Affe, Rind
Anti-Lamin A/C, clone JoL2	Millipore GmbH (Schwalbach, D)	Maus	Mensch

Tabelle 4: Bei den Western Blots verwendete Erst-Antikörper.

2.1.6.2 Zweit-Antikörper

Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology (Frankfurt am Main, D)
Anti-biotin, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology (Frankfurt am Main, D)
Donkey anti-mouse IgG-HRP: sc-2314	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, D)
Donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, D)

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

384 Well Multiply [®] -PCR-Platten	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
96 Well Microplatte	Greiner Bio-One GmbH (Solingen, D)
Abdeckfolie für 384 Well-Platte	Applied Biosystems Deutschland GmbH (Darmstadt, D)

Methodik

Amersham Hybond Blotting Paper	GE Healthcare Europe GmbH (München, D)
Cellulosenitrat Protran BA85	Schleicher & Schuell GmbH (Dassel, D)
Cell-Scraper BD Falcon™	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Multidish 6 Wells Nunclon™ Δ	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden, D)
Nunc EasyFlasks™ Nunclon™ Δ	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden, D)
Quali-Filterpipettenspitzen	Gerlinde Kisker GbR (Steinfurt, D)
Spritzen 5 ml BD Discardit II™	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Sterican® Standardkanülen	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Sterilfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)

2.1.8 Geräte und Hilfsmittel

7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems Deutschland GmbH (Darmstadt, D)
Biometra® TGradient Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen, D)
Centrifuge 5402	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Dual Gel Caster Mighty Small SE 245	Hofer®, Inc./Novodirect GmbH (Kehl/Rhein, D)
Eppendorf Mastercycler 5330	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Eppendorf-Multistep-Pipette	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Eppendorfpipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Fujifilm Intelligent Dark Box	Fujifilm Europe GmbH (Düsseldorf, D)
GeneQuant™ 1300 Spectrophotometer	GE Healthcare Europe GmbH (München, D)
Gibco BRL Electrophoresis power supply, ST504/ST606	Gibco BRL Life Technologies/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Gibco BRL Horizon 58, 11-14 Gel Casting System	Gibco BRL Life Technologies/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Gibco BRL Horizon 58 Model 200	Gibco BRL Life Technologies/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Gibco BRL Model 200	Gibco BRL Life Technologies/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Glasplatten	Hofer®, Inc./Novodirect GmbH (Kehl/Rhein, D)

Methodik

Heidolph MR 2002 Mixer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, D)
Heizblock BIOER	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, D)
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus Instruments Administration and Management GmbH (Hanau, D)
Microplate Reader Mithras LB 940	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, D)
Mighty Small II, SE250/SE260	Hofer [®] , Inc./Novodirect GmbH (Kehl/Rhein, D)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin, D)
PMR-30 Platform rocker	Grant Instruments (Cambridge, UK)
Rainbow CCTV RMB 92	Rainbow CCTV (Costa Mesa, CA, USA)
Spacer	Hofer [®] , Inc./Novodirect GmbH (Kehl/Rhein, D)
Spritze	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, CH)
Sterilbank LaminAir HB 2448	Heraeus Instruments Administration and Management GmbH (Hanau, D)
TE 22 Mini Tank Transfer Gel Electrophoresis Unit	Hofer [®] /Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, D)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Transilluminator Reprostar II	CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Adsorptionstechnik AG & Co. GmbH (Berlin, D)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. (New York, USA)
Vortex Mixer VWR [™] International	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Zentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Zentrifuge Multifuge 3L-R	Thermo Scientific Heraeus/Fisher Scientific (Schwerte, D)
Zentrifuge Sigma 4K15C	Qiagen GmbH (Hilden, D)
Zentrifuge Universal 320	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, D)

2.1.9 Software

AIDA 2D Densitometry for Windows	Raytest GmbH (Berlin, D)
Excel 2007, Word 2007	Microsoft Deutschland GmbH (Unterschleißheim, D)
Fujifilm Image Reader LAS-1000	Fujifilm Europe GmbH (Düsseldorf, D)

Methodik

MikroWin 2000	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, D)
NCBI AceView, Entrez Gene, Entrez Nucleotide, Entrez Protein, Pubmed	National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA)
SDS 2.3 RT-PCR	Qiagen GmbH (Hilden, D)

2.1.10 Puffer und Lösungen

Die Prozent- und Mol-Angaben auf der rechten Seite beziehen sich stets auf die Endkonzentrationen der Substanzen in der fertigen Lösung.

2.1.10.1 Puffer und Lösungen für Agarose-Gele, Acrylamid-Gele und Gel-Elektrophorese

Agarose-Gel (0,8 %ig bzw. 2 %ig):

Agarose	0,8 %/2 %
TAE (siehe unten)	99,2 %/98 %
Ethidiumbromid	0,005 %

TAE (Tris-Acetat-Ethylendiamin-Tetraacetat-Säure):

Tris	0,05 % (40,3 mmol/l)
Eisessig	0,01 %
0,5 mol/l EDTA	0,2 % (1 mmol/l)
Aqua dest.	99,74 %

Trenngel 10 %ig:

Rotiphorese® Gel 40	24,61 %
TrisCl-Puffer 1,5 M, pH 8,8 (siehe unten)	24,61 % (0,37 mol/l)
Aqua dest.	49,22 %
Dodecylsulfat-Natriumsalz-Lösung 10 % (in Aqua dest.)	0,98 %
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, C ₆ H ₁₆ N ₂)	0,09 %
Ammoniumpersulfat 10 % (0,44 mmol/l)	0,49 % (2 µmol/l)

Sammelgel 4 %ig:

Rotiphorese® Gel 40	10 %
TrisCl-Puffer 0,5 M, pH 6,8 (siehe unten)	25 % (0,125 mol/l)
Aqua dest.	63,4 %
Dodecylsulfat-Natriumsalz-Lösung 10 % (in Aqua dest.)	1 %

Methodik

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, C ₆ H ₁₆ N ₂)	0,1 %
Ammoniumpersulfat 10 % (0,44 mmol/l)	0,5 % (2 µmol/l)

TrisCl-Puffer 1,5 M, pH 8,8:

Tris	18,2 %
Aqua dest.	81,8 %
HCl bis zum pH-Wert 8,8	

TrisCl-Puffer 0,5 M, pH 6,8:

Tris	6 %
Aqua dest.	94 %
HCl bis zum pH-Wert 6,8	

Overlay-Puffer:

1,5 mol/l TrisCl-Puffer pH 8,8	25 % (375 mmol/l)
Dodecylsulfat-Natriumsalz-Lösung 10 % (in Aqua dest.)	1 %
Aqua dest.	74 %

Proteinladepuffer 6x:

0,5 mol/l TrisCl-Puffer pH 6,8	58,7 % (350 mmol/l)
Dodecylsulfat-Natriumsalz	8,4 %
Glycerol (30 % v/v)	25,1 % (30 % v/v)
Dithiothreitol	7,8 % (600 mmol/l)
Bromphenolblau	0,01 % (0,175 mmol/l)

SDS-PAGE-Laufpuffer:

Tris	0,3 % (25 mmol/l)
Glycin	1,4 % (192 mmol/l)
Dodecylsulfat-Natriumsalz	0,1 %
Aqua dest.	98,2 %

2.1.10.2 Puffer und Lösungen für die Western Blots

Towbin-Puffer:

Tris	0,3 % (25 mmol/l)
Glycin	1,4 % (192 mmol/l)
Dodecylsulfat-Natriumsalz	0,1 %
Methanol	10 %

Methodik

Aqua dest.	88,2 %
------------	--------

Färbelösung:

Aqua dest.	60 %
Roti [®] -Blue	20 %
Methanol	20 %

Entfärbelösung:

Aqua dest.	80 %
Methanol	20 %

Blockierlösung:

Magermilchpulver	1 %
TBS-T (siehe unten)	99 %

TBS-T (Tris-buffered saline and Tween, Tris-gepufferte Salzlösung und Tween):

NaCl	0,88 %
KCl	0,02 %
Tris	0,3 % (25 mmol/l)
Tween-20	0,05 %
Aqua dest.	98,75 %
HCl bis zum pH-Wert 7,4	

Detektions-Lösung:

LumiGLO [®] Reagent A	5 %
Peroxid Reagent B	5 %
Aqua dest.	90 %

2.2 Methoden

2.2.1 PCR und Agarose-Gel-Elektrophorese (Vorversuche)

Zu Beginn der Arbeit wurde versucht, zu humaner ChREBP-mRNA der Isoform α komplementäre DNA (cDNA) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, zum Prinzip siehe Abschnitt 2.2.5.3) zu amplifizieren, mit dem Ziel, später daraus humanes ChREBP klonieren zu können. Dazu wurden verschiedene Primerpaare von TIB Molbiol Syntheselabor GmbH (Berlin, D), die unter Abschnitt 2.1.4.1 angegebenen DNA-Polymerasen und cDNA aus Hep G2-Zellen sowie aus einer Fettbiopsie verwendet. Die Durchführung der PCRs erfolgte im Eppendorf Master-

Methodik

cycler 5330 bzw. im Biometra® TGradient. Die PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese (zum Prinzip siehe Abschnitt 2.2.4.3) bei 75 V in 0,8 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Die Detektion der Banden erfolgte bei UV-Licht im Horizon 58 Model. Die DNA einzelner aus den Gelen ausgeschnittener Banden wurde mit QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt.

Es erfolgten auch Amplifikationsversuche einzelner kleinerer Abschnitte von ChREBP-cDNA mittels PCR. Restriktionsanalysen mit den unter Abschnitt 2.1.2 genannten Restriktionsenzymen, welche die cDNA an jeweils spezifischen Positionen schneiden, dienten zur Überprüfung, ob die richtigen Abschnitte amplifiziert wurden. Der Einsatz der Restriktionsenzyme erfolgte nach Anweisung des jeweiligen Herstellers zusammen mit FastDigest™ Buffer bzw. NEBuffer 4 und BSA sowie Wasser (Aqua ad iniectionem).

2.2.2 Zellkultur, Kulturbedingungen und Passagierung

Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß ChREBP durch verschiedene Substanzen stimulierbar ist und sich seine Lokalisation und Konzentration in der Zelle ändert, wurde in Zellkulturen der Gehalt an ChREBP-Protein in Hep G2 (humane Hepatomzellen) nach Stimulation mit unterschiedlichen Substanzen untersucht.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank unter Verwendung steriler Kulturmedien und Hilfsmittel durchgeführt. Für alle Experimente mit Zellkulturen wurde folgende Zell-Linie verwendet:

Hep G2, Human Caucasian hepatocyte carcinoma (Nummer 85011430), bezogen von European Collection of Cell Cultures (ECACC; Salisbury, UK).

Es wurden Gefrierkulturen der Zellen verschiedener Passagen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und ausgesät. Die Aussaat erfolgte bei den Protein-Experimenten in Kulturflaschen (T25) mit je 7 ml Kulturmedium, bei den mRNA-Experimenten in Six Well-Platten mit je 4 ml Kulturmedium. Als Kulturmedien wurde bei den Hauptversuchen MEM-EARLE eingesetzt, bei den Vorversuchen wurden MEM-EARLE und Dulbecco's MEM verwendet. Dabei erfolgte stets der Zusatz von je 1 % „Non Essential Amino Acids“ und 10 % „Fötalem Bovinem Serum“ (FBS, steril filtriert). Die Zellkulturen wurden in einem Inkubator bei 37 °C unter 5 % CO₂ kultiviert. Zweimal pro Woche erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums; bei Erreichen eines bestimmten Konfluenzgrades wurden die Zellen passagiert. Die adhärennten Zellen wurden mit „Tryp LE™ Express“ für 5 min bei 37 °C abgelöst, in Medium mit 10 % FBS resuspendiert und 5 min bei 500 x g (Erdschwerebeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen erneut resuspendiert und, nach Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer und eines Lichtmikroskops, auf neue Kulturflaschen oder Six Well-Platten verteilt.

2.2.3 Stimulation der Hep G2-Zellen

2.2.3.1 Vorversuche

In Vorversuchen wurden die Hep G2-Zellen mit Glucose, Glucagon, Insulin, Öl- und Palmitinsäure stimuliert. Die Stimulationsdauer betrug zwei Stunden und bei den Versuchen mit Glucose, Glucagon und Ölsäure zusätzlich 20 Stunden.

Substanz	Verwendete Endkonzentrationen						
	D-(+)-Glucose	g/l	0	1	2	3	4
	mmol/l	0	5,55	11,1	16,65	22,2	27,75
Humanes Glucagon	50 nmol/l						
Humanes Insulin	1 μ mol/l						
Ölsäure	0,4 %						
Palmitinsäure	0,4 %						

Die jeweiligen Substanzen wurden dem entsprechenden Kulturmedium (EMEM oder DMEM) zugesetzt. Im Anschluss an die Stimulation erfolgte die Proteinextraktion.

2.2.3.2 Hauptversuche

In den Experimenten für Western Blot-Analysen wurden die Hep G2-Zellen mit Glucose, Fructose und Glucagon für zwei und für 24 Stunden stimuliert.

Substanz	Verwendete Endkonzentrationen		
	D-(+)-Glucose	g/l	1
	mmol/l	5,55	11,1
D-(-)-Fructose	g/l	1	
	mmol/l	5,55	
Humanes Glucagon	50 nmol/l		

Da das Kulturmedium bereits 1 g/l Glucose enthielt, wurde für eine Endkonzentration von 2 g/l Glucose noch 1 g/l Glucose zugesetzt. Mit Glucose und Fructose wurden zunächst Stocklösungen einer Konzentration von 100 g/l hergestellt unter Verwendung von Aqua ad iniectabilia; die Lösungen wurden vor dem Einsatz steril filtriert. Glucagon wurde in 5 %iger Essigsäure gelöst;

Methodik

es wurde zunächst eine Stocklösung von 100 µmol/l hergestellt.

Glucose und Fructose wurden im Verhältnis 1:100, Glucagon im Verhältnis 1:2000 dem Kulturmedium zugesetzt. Im Anschluss an die Stimulation erfolgte die Proteinextraktion bei der Hälfte der Kulturflaschen nach zwei und bei der anderen Hälfte nach 24 Stunden.

Es ergaben sich also bei jedem Stimulationsvorgang vier Ansätze:

1. Kontrolle: 1 g Glucose/Liter (Glucose aus dem Kulturmedium)
2. Zugabe von 1 g Glucose/Liter => 2 g Glucose/Liter
3. Zugabe von 1 g Fructose/Liter => 1 g Glucose + 1 g Fructose/Liter
4. Zugabe von 50 nM/Liter Glucagon => 1 g Glucose + 50 nmol/l Glucagon/Liter.

In den Experimenten für qRT-PCR-Analysen wurden Glucose, Fructose, Glucagon und Insulin zur Stimulation eingesetzt. Die Stimulationszeit betrug vier sowie 24 Stunden.

Substanz	Verwendete Endkonzentrationen			
D-(+)-Glucose	g/l	1	2	4,5
	mmol/l	5,55	11,1	27,75
D-(-)-Fructose	g/l	1		
	mmol/l	5,55		
Humanes Glucagon	50 nmol/l			
Humanes Insulin	1 µmol/l			

Stocklösungen und Zusatzvolumina von Glucose, Fructose und Glucagon entsprachen denjenigen der Experimente für die Western Blot-Analysen. Insulin wurde in einer Stocklösung von 50 µmol/l angesetzt und diese im Verhältnis 1:50 dem Kulturmedium zugegeben. Im Anschluss an die Stimulation erfolgte die mRNA-Extraktion nach vier bzw. 24 Stunden.

2.2.4 Experimente mit ChREBP-Protein

2.2.4.1 Protein-Extraktion mit dem „Nuclear Extract Kit“ von Active Motif

Die Protein-Extraktionen aller Vor- und Hauptversuche wurden mit dem „Nuclear Extract Kit“ von Active Motif durchgeführt. Die benötigten Lösungen wurden entsprechend dem Abschnitt „Buffer preparation and Recommendations“ des Protokolls vorbereitet (siehe Appendix). Die Proteinextraktion erfolgte nach dem Abschnitt „Preparation of Nuclear Extract – Starting from Cells“ (siehe Appendix). Um den Proteinabbau in den Cytosol-Extrakten zu verhindern, wurde diesen im Verhältnis 1:10 eine Lösung aus einer Tablette Complete Mini, aufgelöst in 1 ml Aqua

ad iniectionabilia, zugesetzt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

2.2.4.2 Bestimmung der Protein-Konzentration

Zur Bestimmung der in den Western Blots einzusetzenden Proben-Mengen war die Messung der Protein-Konzentrationen der Proben nötig. Hierzu wurde die Methode der modifizierten Proteinbestimmung nach Bradford angewandt. Die dabei eingesetzten roten Coomassie-Farbstoff-Moleküle haben in ihrer freien Form ein Absorptionsmaximum bei ca. 450 nm. Durch Bildung von Komplexen mit Seitenketten von Proteinen kommt es zur Ausbildung der blauen Form des Farbstoffes, zu dessen Stabilisierung und zur Verschiebung des Absorptionsmaximums auf ca. 590 nm. Durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 590 nm und bei 450 nm und Bildung des Quotienten kann auf die Protein-Konzentration der Lösung geschlossen werden.

Zur Bestimmung der Protein-Konzentrationen der Proben wurden je 25 µl einer Standard-Verdünnungsreihe mit Bovinem Serum-Albumin (BSA) sowie je 25 µl der Proben in den Verdünnungen 1:20 und 1:40 auf 96 Well-Mikrotiterplatten pipettiert; es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Für die Standard-Verdünnungsreihe erfolgte eine Verdünnung von BSA mit Aqua dest. auf acht verschiedene Konzentrationen zwischen 0 µg/ml und 100 µg/ml. In jedes Well wurden 100 µl einer im Verhältnis 1:5 verdünnten Lösung aus Roti[®]Nanoquant und Aqua dest. hinzupipettiert, und die Platten wurden fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss folgte die Messung der optischen Dichte bei 590 nm und 450 nm in einem Microplate Reader, Mithras LB 940, mit dem Programm MikroWin 2000. Es wurden die Quotienten der optischen Dichte bei 590 nm und 450 nm gebildet und daraus die Mittelwerte für die Zweifachbestimmungen berechnet. Anhand der gemessenen Werte der Standard-Verdünnungsreihe wurde eine Regressionsgerade erstellt, mit deren Hilfe die Protein-Konzentrationen der Proben errechnet werden konnten.

2.2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden durch eine SDS-PAGE nach Laemmli aufgetrennt. Hierbei erfolgt die Auftrennung der Proteine in einem Polyacrylamid-Gel nach der Größe, unabhängig von der Ladung. Dies wird durch Zugabe von SDS erreicht, das die Eigenladungen der Proteine gleichmäßig überdeckt und eine konstante negative Ladungsverteilung der Proteine bewirkt. Das vorbereitende Erhitzen der Proben auf 95 °C führt zum Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine, der zugesetzte Ladepuffer mit Dithiothreitol zur Spaltung von Disulfidbrücken. Nach Auftragen der denaturierten Proben auf ein Gel aus Polyacrylamid in SDS-Pufferlösung bewirkt das Anlegen einer elektrischen Spannung eine Migration der negativ geladenen Proteine durch das Gel in Richtung Anode, wobei kleine Proteine schneller als große

Methodik

Proteine wandern und die Proteine der Probe somit ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Das dem Trenngel aufgelagerte Sammelgel führt zur Konzentrierung der Proben und erhöht die Schärfe der Banden. Die zusätzlich aufgetragenen Protein-Größenmarker ermöglichen eine Abschätzung der Größe der Proteine.

Für das Polyacrylamidgel wurde ein 10 %iges Trenngel in eine Gelkammer mit Glasplatten und Spacern pipettiert, darüber ein Overlay-Puffer, der nach 20 min abgegossen wurde. Ein 4 %iges Sammelgel wurde über das Trenngel pipettiert und mit einem Kamm zur Taschenbildung versehen. Nach weiteren 20 min erfolgte die Auftragung von jeweils 25 µg Protein pro Tasche. Vorbereitend wurden hierzu die entsprechenden Mengen der Proben mit Aqua dest. vermischt und fünf Minuten in einem Thermomixer bei 95 °C mit Proteinladepuffer im Verhältnis 1:5 gekocht. Zusätzlich wurden pro Gel 10 µl Biotinylierter Marker, der zwei Minuten bei 95 °C gekocht wurde, und 15 µl Prestained Marker in die Randtaschen pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde mit SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt. Zum Beladen der Geltaschen mit Proben und Markern diente eine Hamilton-Spritze. Die Elektrophorese erfolgte unter Wasserkühlung bei konstant 80 mA, bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte (ca. 90 Minuten).

2.2.4.4 Western Blot

Das Prinzip des Western Blots besteht in der elektrophoretischen Übertragung der im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran. Dazu wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die geladenen Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran wandern und gebunden werden, sodass sie mit verschiedenen Methoden detektiert werden können.

Hier wurde ein Tank-Blot-System für den Western Blot verwendet. Als Transferpuffer diente vorgekühlter Towbin-Puffer. Das Gel, eine auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene Nitrocellulose-Membran, zwei Blatt Blotting-Papier und zwei Schwämme für den Transfer wurden fünf Minuten mit Towbin-Puffer getränkt. Dann erfolgte der Zusammenbau der Transferkassette, indem ein dicker Schwamm, ein Blatt Blotting-Papier, die Nitrocellulose-Membran, das Gel, ein weiteres Blatt Blotting-Papier und ein dünner Schwamm aufeinandergelegt wurden. Die Transferkassette wurde in eine mit gekühltem Towbin-Puffer gefüllte Western Blot-Kammer eingesetzt. Der Elektro-Blot erfolgte zweieinhalb Stunden bei konstant 35 V unter ständiger Kühlung. Danach wurde das Gel zur Überprüfung der Vollständigkeit des Transfers mit Coomassie-Blau angefärbt.

Nach dem Transfer wurde die Membran eine Stunde in einer Blockierlösung mit Magermilchpulver (5 % in TBS-T) blockiert. Das Milchprotein maskiert freie Bindungsstellen auf der

Membran und verhindert eine unspezifische Bindung der Antikörper an diese Bindungsstellen; dadurch verbessert es Spezifität und Sensitivität der Immundetektion. Es folgten drei Waschschriffe mit TBS-T.

2.2.4.5 Immundetektion

Der Immundetektion von Proteinen liegt das Antigen-Antikörper-Prinzip zugrunde. Zunächst wird auf die Membran eine erste Lösung mit antigenspezifischen Primär-Antikörpern gegeben, die mit ihrer variablen Domäne an die Epitope ihres spezifischen Antigens auf dem zu detektierenden Protein binden. Durch Waschschriffe werden schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Eine zweite Lösung enthält Sekundär-Antikörper, die an die konstante Domäne der primären Antikörper binden und mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (Horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt sind. Die HRP katalysiert eine Chemilumineszenz-Reaktion: Durch eine chemische Reaktion, hier die Umsetzung von Luminol aus der Detektions-Lösung in seine oxidierte Form, wird elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts emittiert, die detektiert und quantifiziert werden kann.

2.2.4.5.1 Erst-Antikörper

Als Antikörper gegen humanes ChREBP wurde „Rabbit Polyclonal anti-ChREBP“ von Novus verwendet, der mit der humanen ChREBP-Proteinsequenz zwischen den Aminosäuren 800-852 reagiert. Er wurde im Verhältnis 1:2000 einer Lösung aus TBS-T und 0,02 % BSA zugesetzt. Die Inkubation der Membran erfolgte für ungefähr 14 Stunden bei 4 °C.

Im Rahmen von Vorversuchen wurden zusätzlich alle drei unter Abschnitt 2.1.6.1 genannten Antikörper gegen ChREBP, die laut Angaben der Hersteller auch mit murinem ChREBP reagieren sollten, an Mäuseleberproben getestet.

Bei allen Experimenten wurde die Protein-Konzentration konstitutiv exprimierter Gene, sogenannter Housekeeping-Gene, gemessen. Alle gemessenen Protein-Konzentrationen von ChREBP wurden auf diejenigen der Housekeeping-Gene mittels Bildung der Quotienten bezogen. Dies erfolgte, um mögliche Unterschiede in den auf das Gel aufgetragenen Proteinmengen auszugleichen und die Ergebnisse der gemessenen Protein-Konzentrationen von ChREBP vergleichbar zu machen. Bei den Hauptversuchen wurden für das Cytosol Alpha-Tubulin und für den Nucleus Lamin als Housekeeping-Gen gewählt. Der Antikörper gegen Alpha-Tubulin wurde im Verhältnis 1:1000 einer Lösung mit TBS-T und 5 % BSA zugesetzt, der Antikörper gegen Lamin im Verhältnis 1:200 einer TBS-T-Lösung. Die Inkubation (der entsprechenden Membranabschnitte) mit den Antikörpern gegen Tubulin und Lamin erfolgte für ungefähr 14 Stunden bei 4 °C.

2.2.4.5.2 Zweit-Antikörper

Nach drei Waschschritten mit TBS-T wurde als Zweit-Antikörper gegen die ChREBP- und Tubulin-Antikörper Anti-Rabbit-IgG-HRP im Verhältnis 1:2000 eingesetzt, gegen den biotinylierten Protein-Marker Anti-Biotin-HRP im Verhältnis 1:1000, in einer Lösung mit TBS-T und 5 % Magermilchpulver (siehe Abschnitt 2.1.6.2).

Für die Membranabschnitte mit Lamin-Antikörper wurden Anti-Mouse-IgG-HRP im Verhältnis 1:2000 sowie Anti-Biotin-HRP im Verhältnis 1:1000 in einer Lösung mit TBS-T und 5 % Magermilchpulver verwendet.

Mit den Zweitantikörpern wurden die Membranen eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und danach dreimal mit TBS-T gewaschen.

2.2.4.5.3 Protein-Detektion

Die Membranen wurden für eine Minute in Detektions-Lösung inkubiert. Die Detektion der Proteine erfolgte in der Kamera Fujifilm Intelligent Dark Box mit dem Programm Fujifilm Image Reader LAS-1000. Zur Bestimmung der relativen Protein-Konzentration der Banden auf den Western Blot-Membranen wurde das Computerprogramm AIDA/2D Densitometry verwendet.

2.2.5 Experimente mit ChREBP-mRNA

Da in den Western Blots nur die Lokalisation und in einigen Fällen tendenzielle Änderungen der Gesamtmenge von ChREBP-Protein bestimmt werden konnten, wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob sich der zelluläre Gehalt an messenger RNA (mRNA, Boten-RNA) von ChREBP durch Stimulation mit verschiedenen Substanzen ändert. Die mRNA stellt ein Maß für die (abge- laufene) Transkription des ChREBP-Gens und für die Neusynthese des ChREBP-Proteins dar, also für die Expression von ChREBP. Hep G2 wurden mit verschiedenen Substanzen stimuliert – siehe Abschnitt 2.2.3.2 –, die mRNA wurde aus den Zellen extrahiert, mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und als solche in einer quantitativen Real-Time-Polymerase-Ketten- reaktion (Real time polymerase chain reaction, RT-PCR, zum Prinzip siehe Abschnitt 2.2.5.4) amplifiziert. Dadurch konnte, normalisiert auf die mRNA bzw. cDNA des Housekeeping-Gens Actin, die relative Konzentration an ursprünglich vorhandener ChREBP-mRNA abgeschätzt werden.

2.2.5.1 mRNA-Extraktion

Für die Extraktion der RNA aus den Hep G2-Zellen wurden zwei verschiedene Kits verwendet: „High Pure RNA Isolation Kit“ von Roche und „SV Total RNA Isolation System“ von Promega.

RNA-Extraktion mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ von Roche

Vorbereitend wurden die noch im Stimulationsmedium befindlichen Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Six Well-Platten abgelöst, in Röhrchen überführt und 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt.

Die benötigten Lösungen wurden entsprechend dem Abschnitt „2. How to Use this Product – 2.1 Before You Begin – Preparation of Working Solutions“ im Protokoll vorbereitet (siehe Appendix). Die RNA-Extraktion erfolgte nach dem Abschnitt „2.2 Isolation of Total RNA from Cultured Cells“ (siehe Appendix). Die extrahierte mRNA wurde bei -80 °C gelagert.

RNA-Extraktion mit dem „SV Total RNA Isolation System“ von Promega

Die Vorbereitung der benötigten Lösungen wurde entsprechend dem Abschnitt „4.A. Preparation of Solutions“ im Protokoll vorgenommen, die Vorbereitung der Zellen entsprechend dem Abschnitt „8.F. Adherent Culture Cells“ (siehe Appendix). Die RNA-Extraktion erfolgte nach den Abschnitten „4.D. Lysis of Cultured Cells“ sowie „4.E. RNA Purification by Centrifugation (Spin)“ (siehe Appendix). Die extrahierte mRNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.5.2 Bestimmung der mRNA-Konzentration

Die RNA-Konzentrationen der Proben wurden mit dem Spectrophotometer GeneQuantTM 1300 bestimmt und mit DEPC-Wasser abgeglichen.

2.2.5.3 Testung der ChREBP-Primer für die qRT-PCR

Zur Testung der ChREBP-Primer wurde eine PCR durchgeführt (Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion). Die PCR ist eine Methode, um DNA in vitro zu vervielfältigen. Dazu notwendig sind die Original-DNA mit dem Abschnitt, der amplifiziert werden soll (Template, Vorlage), zwei Primer, die auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt für die DNA-Synthese markieren, eine thermostabile DNA-Polymerase, Desoxyribo-Nucleosid-Triphosphate als Bausteine für die neu synthetisierten DNA-Stränge sowie Pufferlösungen. Ein PCR-Zyklus besteht aus der Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Moleküle, die am Ende des vorhergehenden Zyklus vorliegen, der Anlagerung der Primer an den komplementären DNA-Abschnitt (Annealing, Primer-Hybridisierung) und der Elongation, bei der die DNA-Polymerase anhand des vorliegenden DNA-Einzelstranges den jeweils zweiten DNA-Strang synthetisiert. Durch zyklische Wiederholung dieser Schritte bei jeweils geeigneten Temperaturen kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten DNA-Abschnitte.

Die in Abschnitt 2.1.5 aufgeführten ChREBP-Primer wurden mit Nuclease-freiem Wasser auf 5 µmol/l verdünnt. Folgende Ansätze mit GoTaq[®] Green Master Mix wurden vorbereitet:

Methodik

Substanz	Endkonzentration
GoTaq [®] Green Master Mix	50 %
Nuclease-freies Wasser	6 %
Entsprechende Primerpaare	je 20 % (1 µmol/l)
cDNA-Proben aus Hep G2; für Non-template controls (Kontrollen ohne cDNA, NTCs) Wasser statt cDNA	4 %

Programm für die PCR mit 34facher Wiederholung der Schritte zwei bis vier:

0. Deckel auf 105 °C vorheizen.
1. 4 min 94 °C, Aktivierung der Taq-Polymerase.
2. 40 s 94 °C, Denaturierung der DNA-Doppelstränge.
3. 1 min 60 °C, Anlagerung der Primer an die DNA (Annealing).
4. 40 s 72 °C, Synthese der DNA anhand der vorliegenden Einzelstränge (Elongation).
5. 10 min 72 °C.

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese in einem 2 %igen Agarose-Gel. Die Ansätze wurden mit 6x DNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:5 vermischt. Neben den Proben wurden zwei DNA-Leitern aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 75 V. Die Detektion der Banden erfolgte bei UV-Licht im Horizon 58 Model.

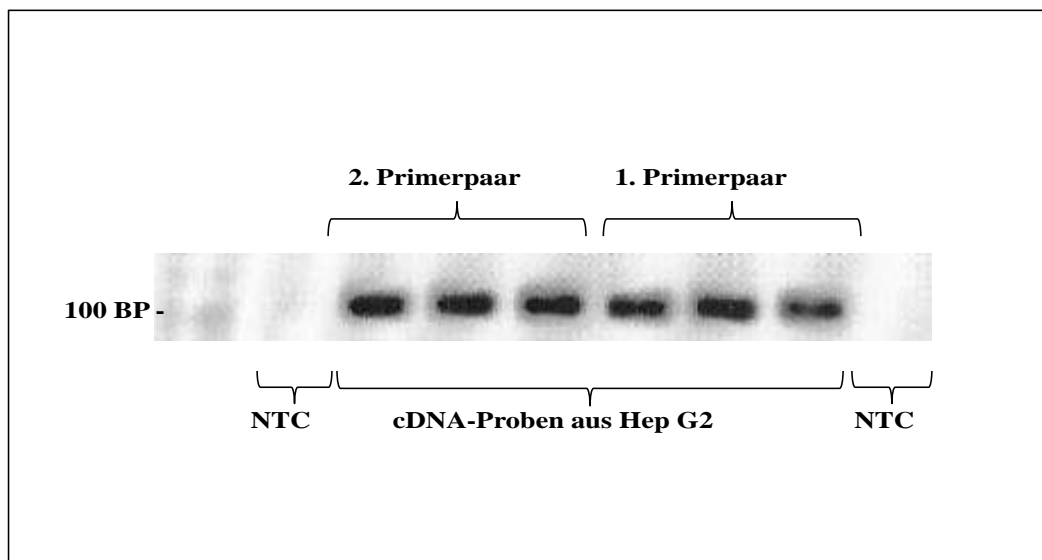


Abbildung 13: Ergebnis der Testung zweier Primerpaare für ChREBP-cDNA. Das Ergebnis liegt im erwarteten Bereich von 100 Basenpaaren. BP = Basenpaare; NTCs = Non-template controls.

Aufgrund des besseren Ergebnisses der Non-template-Kontrolle beim ersten Primerpaar wurde dieses für die qRT-PCRs verwendet.

2.2.5.4 Quantitative Reverse Transkriptase-Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Quantitative Reverse transcription-Real Time-Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)

Die mRNA-Proben wurden einer relativen Quantifizierung mittels quantitativer Reverse Transkriptase-Real Time-PCR unterzogen.

Die reverse Transkription ist der Prozess der Umschreibung von mRNA in cDNA (complementary DNA, komplementäre DNA). Katalysierendes Enzym ist die reverse Transkriptase, welche die mRNA als Vorlage verwendet, um einen komplementären cDNA-Strang zu synthetisieren. Bei einer Real-Time-PCR lagern sich in einem zyklischen Verfahren spezifische Primer vor und hinter dem zu amplifizierenden DNA-Abschnitt an, und dieser Abschnitt wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase wie bei einer normalen PCR exponentiell vervielfacht. Zur Quantifizierung der mRNA- bzw. cDNA-Menge wird ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, hier SYBR Green I, der bei Bindung an doppelsträngige DNA fluoresziert; die Stärke der Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus, also in „Echtzeit“ (Real Time), gemessen. In der ersten Phase der Amplifikation ist die Menge der als Vorlage dienenden cDNA begrenzt, sodass die Amplifikation zunächst langsam erfolgt. In der zweiten Phase nehmen die Anzahl der PCR-Produkte und proportional dazu die Stärke der Fluoreszenz exponentiell zu; nur in dieser exponentiellen Phase kann eine Quantifizierung der PCR-Produkte anhand der gemessenen Fluoreszenz erfolgen. Das Verhältnis zwischen der Anzahl der Primer und der Menge der als Vorlage dienenden cDNA nimmt mit fortlaufender Zykluszahl ab, und die entstehenden Produkte hemmen sich zunehmend gegenseitig, sodass der Kurvenverlauf in der dritten Phase in einem Plateau endet. Der Ct-Wert (Cycle threshold, Schwellenwert-Zyklus) gibt den Reaktionszyklus an, in dem das Fluoreszenz-Signal erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und die exponentielle Amplifikationsphase beginnt. Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten cDNA Menge und dem Ct; anhand einer Standardreihe kann daher eine Standardkurve als lineare Funktion erstellt werden, und anhand dieser Standardkurve kann die Menge der spezifischen mRNA/cDNA in den Proben berechnet werden. Die Normierung der Proben erfolgt durch Bezug auf die mRNA von Housekeeping-Genen.

Für die hier durchgeführten qRT-PCRs wurde der „QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR Kit“ verwendet. Das Vorgehen entsprach dem Abschnitt „Protocol for Quantitative, Real-Time, One-Step RT-PCR Using ABI Sequence Detection Systems and Other Real-Time Thermal Cyclers“ aus dem Protokoll.

Methodik

1. 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix, Proben, Primer und RNase-freies Wasser wurden aufgetaut und auf Eis gestellt.

2. Es folgte die Herstellung von Master-Mixen mit spezifischen Primerpaaren:

Substanz	Endkonzentration
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	75 %
QuantiTect RT Mix	1 %
RNase-freies Wasser	9 %
Entsprechende Primerpaare	je 7,5 % (0,375

Zusätzlich wurde der Lösung Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor zugefügt.

3. Die Master-Mixe wurden mit Hilfe einer Multistep-Pipette in eine 384 Well-Platte pipettiert.

4. Die Pipettierung der RNA-Proben zu den Master-Mixen erfolgte im Verhältnis 1:5. Für sämtliche Proben wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen. Als NTC wurde das RNase-freie Wasser aus dem Kit eingesetzt. Eine Standard-Verdünnungsreihe wurde aus einer der Proben durch Verdünnung hergestellt. Es folgte eine kurze Anzentrifugation der 384 Well-Platte.

5. Die Durchführung der qRT-PCRs erfolgte mit „ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System“ und dem Programm SDS2.3RT-PCR mit 40facher Wiederholung der Schritte drei und vier.

1. 30 min 50 °C, Umschreiben der mRNA in cDNA durch reverse Transkriptase (RT).
2. 15 min 95 °C, Inaktivierung der RT, Aktivierung der Taq-Polymerase.
3. 15 s 94 °C, Denaturierung der DNA-Doppelstränge.
4. 1 min 60 °C, Anlagerung der Primer an die DNA (Annealing) und Synthese der DNA anhand der vorliegenden Einzelstränge (Elongation).
5. 15 s 95 °C.
6. 15 s 60 °C.

Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte durch Bezug auf das Housekeeping-Gen Actin. Zum Vergleich wurden weitere Messungen mit GAPDH (Glyceral-3-Phosphat-Dehydrogenase) und HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) als Housekeeping-Genen durchgeführt. Zur Kontrolle der Aussagekraft der qRT-PCR-Ergebnisse wurden die spezifischen Schmelzkurven überprüft. Die DNA-Doppelstränge denaturieren bei einer für das jeweilige Fragment spezifischen Schmelztemperatur und setzen dabei den Fluoreszenzfarbstoff frei. Da SYBR Green I unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet und somit auch an möglicherweise entstehende Primerdimere, die einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen als die ChREBP-DNA-Doppel-

Methodik

stränge, erlaubt die Analyse der Schmelzkurven eine Aussage über die Spezifität der Reaktion. Die Bildung der Mittelwerte der Dreifachbestimmung, Auswertung und Korrektur der Ergebnisse erfolgten mit dem Programm SDS2.3RT-PCR.

2.2.5.5 Agarose-Gel-Elektrophorese von qRT-PCR-Proben

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurden einige Proben nach der qRT-PCR auf ein Agarose-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die Vorbereitung des Gels, Elektrophorese und Detektion erfolgten wie in Abschnitt 2.2.5.3 beschrieben. Als Proteinleitern dienten O'RangeRuler™ 100 bp DNA Ladder und GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder.

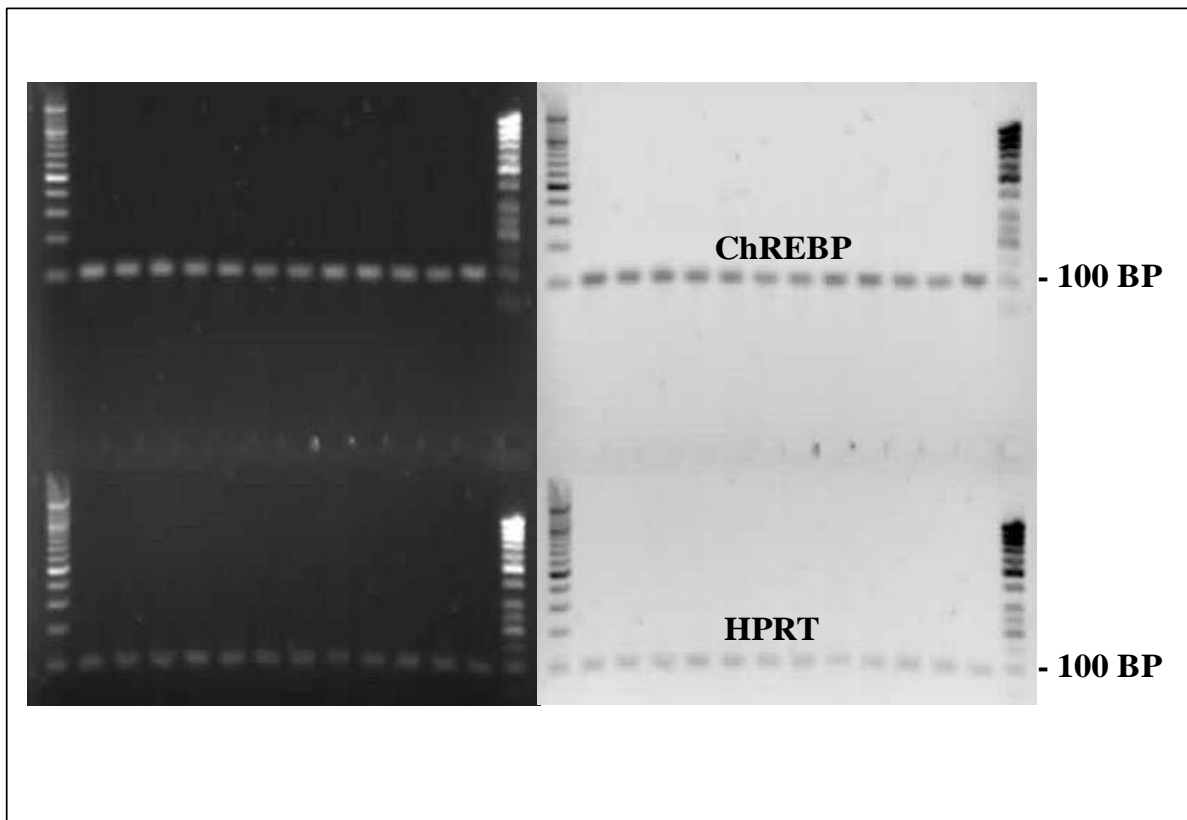


Abbildung 14: Originalbild (links) und inverses Bild (rechts) einer Agarose-Gel-Elektrophorese mit verschiedenen Proben nach Durchführung der qRT-PCR. Jeweils oben im Gel wurden Proben nach Einsatz der Primer für ChREBP, unten im Gel nach Einsatz der Primer für HPRT aufgetragen. Sowohl der in der qRT-PCR replizierte Abschnitt von ChREBP-cDNA als auch der von HPRT-cDNA umfasst erwartungsgemäß ca. 100 Basenpaare. Links wurde die DNA-Leiter „O'RangeRuler™ 100 bp“, rechts „GeneRuler™ 50 bp“ aufgetragen. BP = Basenpaare.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die Experimente mit Western Blots wurden drei Mal für das Cytosol und vier Mal für den Nucleus durchgeführt. Bei den Experimenten mit qRT-PCRs wurden die vierstündigen Stimulationen

Methodik

drei Mal, die 24stündigen Stimulationen vier Mal durchgeführt. Als statistische Maßzahlen wurden das arithmetische Mittel, die Standardabweichung – als Maß für die Streuung der Werte um den Mittelwert – und der Standardfehler des arithmetischen Mittels – als Maß für die durchschnittliche Abweichung des geschätzten vom wahren arithmetischen Mittel – berechnet.

Um die statistische Signifikanz zwischen den Messergebnissen der Kontroll-Ansätze und denjenigen der stimulierten Ansätze zu überprüfen, wurden die Ergebnisse im Programm „Microsoft Excel 2007“ einem t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz unterzogen, also einem Welch-Test. Als Voraussetzung für die Durchführbarkeit dieses Tests müssen Unabhängigkeit, ungleiche Varianz sowie Normalverteilung der Stichproben gegeben sein. Die Unabhängigkeit der Stichproben war stets vorhanden, da immer verschiedene Proben unabhängig voneinander stimuliert wurden; die Varianz der jeweiligen Stichproben war immer ungleich. Die Normalverteilung aller Messergebnisse wurde mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests bestätigt. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse bei einem p-Wert kleiner als 0,05 angesehen. Der p-Wert gibt die Höhe der Wahrscheinlichkeit an, dass die Mittelwerte zweier Stichproben aus einer Grundgesamtheit mit gleichem Mittelwert stammen und Unterschiede zwischen den Mittelwerten der zwei Stichproben allein auf einen Zufallsfehler zurückzuführen sind.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche, 1. Teil: Klonierung von ChREBP mittels PCR und Gel-Elektrophorese

Zunächst wurde versucht, die vollständige cDNA von ChREBP bzw. einzelne Abschnitte des ChREBP-Gens mittels PCR zu amplifizieren, um später ChREBP klonieren und ein Gen für „Green fluorescence protein“ mit einbauen zu können, wodurch die Lokalisation des ChREBP-Proteins in den Zellen sehr gut hätte beobachtet werden können. Trotz Verwendung verschiedener Primer und verschiedener zu amplifizierender Abschnitte von ChREBP blieb der Versuch der Klonierung von ChREBP hier erfolglos; er wird jedoch in unserer Arbeitsgruppe weitergeführt. Daher wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung von endogenem ChREBP auf Protein- und mRNA-Ebene durch Western Blots und qRT-PCRs übergegangen.

3.2 Vorversuche, 2. Teil: Testung der Antikörper gegen ChREBP an Mäuseleber-Proben

Bei der wiederholten Testung der drei unter Abschnitt 2.1.6.1 aufgeführten Antikörper gegen ChREBP an Mäuseleber-Proben waren in keinem der Western Blots Banden auf Höhe der erwarteten Proteingröße von ChREBP zu detektieren. Weil mit den ebenfalls verwendeten humanen Hep G2-Zellen ohnehin besser die Regulation von ChREBP bei der Spezies Mensch untersucht werden konnte, wurden die Versuche mit Mäuseleber-Proben nicht fortgeführt.

3.3 Vorversuche, 3. Teil: Western Blots

Die Ergebnisse der Western Blots der Vorversuche nach Stimulation von Hep G2-Zellen stellen Tendenzen dar, weil sie aufgrund der geringeren Zahl ihrer Wiederholungen nicht statistisch ausgewertet werden können.

Beobachtet wurde jeweils der Proteingehalt von ChREBP sowohl im Cytosol als auch im Nucleus nach Stimulationen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Als Kontrolle dienten bei allen Experimenten die Ergebniswerte derjenigen Zellen, die mit 1 g/l Glucose stimuliert wurden. In den Grafiken werden die aufgetragenen Werte stets in Prozent der Kontrolle angegeben. Da hier nur die relativen Proteinkonzentrationen von ChREBP im Vergleich zu den Kontrollwerten eines Kompartimentes und keine Absolutwerte bestimmt wurden, kann eine Aussage über den Gesamtgehalt der Zelle an ChREBP-Protein nur bei gleichsinnigem Abfall oder Anstieg in beiden Kompartimenten getroffen werden.

Ergebnisse

3.3.1 Stimulation mit Glucose

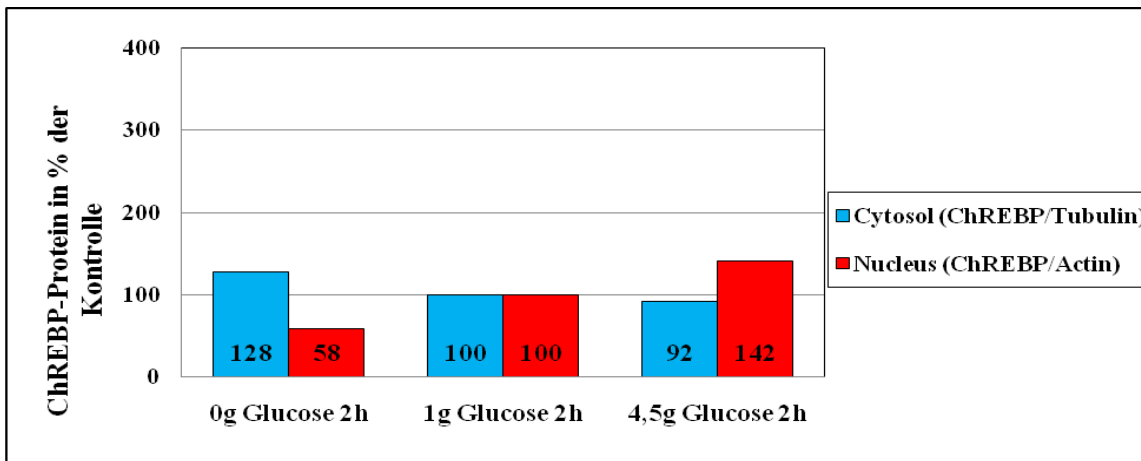


Abbildung 15: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 0 g, 1 g und 4,5 g/l Glucose im Medium DMEM. Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus Actin.

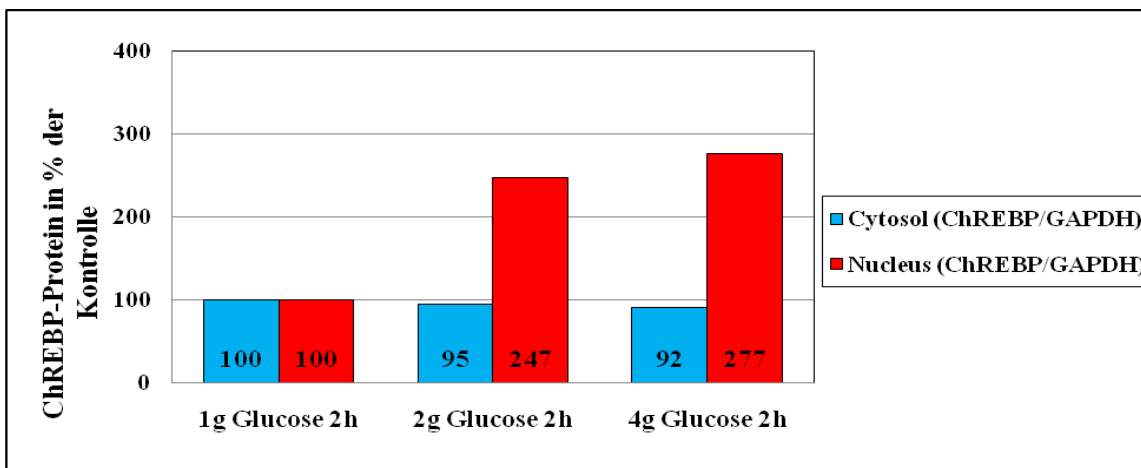


Abbildung 16: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 1 g, 2 g und 4 g/l Glucose im Medium EMEM. Housekeeping-Gen für beide Fraktionen GAPDH.

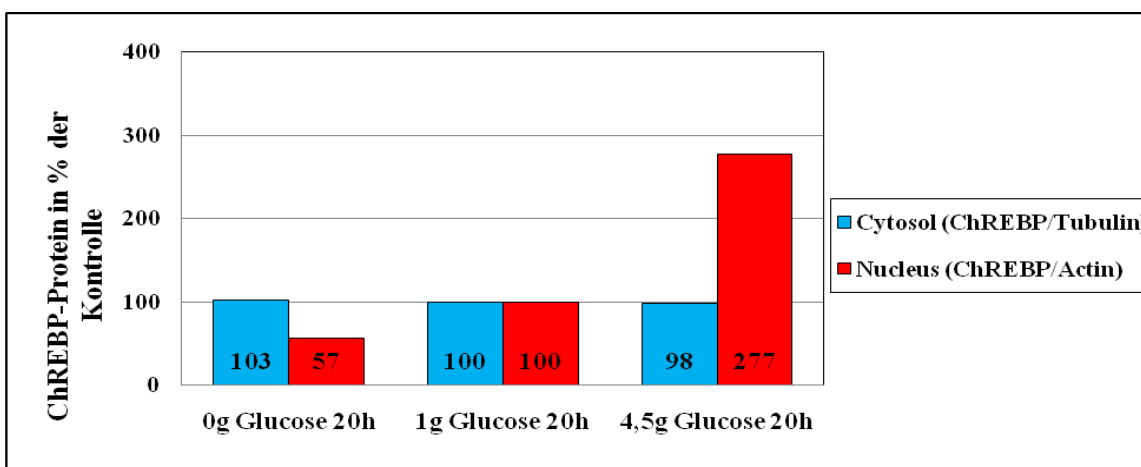


Abbildung 17: ChREBP-Protein in Hep G2 nach 20stündiger Stimulation mit 0 g, 1 g und 4,5 g/l Glucose im Medium DMEM. Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus Actin.

Ergebnisse

Bei Glucose-Entzug (0 g Glucose in der Mediumflüssigkeit) im Medium DMEM zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle ein Anstieg von ChREBP-Protein im Cytosol und ein Abfall im Nucleus. Der Anstieg im Cytosol schien nach 20 Stunden geringer zu sein als nach zwei Stunden.

Bei Stimulation mit 2 g, 4 g und 4,5 g Glucose über einen Zeitraum von zwei und von 20 Stunden waren in allen Fällen ein leichter Abfall des ChREBP-Proteingehalts im Cytosol sowie ein deutlicher Anstieg im Nucleus zu beobachten. Im Medium DMEM stieg der Kerngehalt an ChREBP nach zwei Stunden bei 4,5 g Glucose auf ca. 142 % und nach 20 Stunden weiter auf ca. 277 % des Kontrollwertes. Im Medium EMEM war bereits nach zwei Stunden eine Steigerung auf ca. 247 % bei 2 g Glucose und auf ca. 277 % bei 4 g Glucose zu sehen.

3.3.2 Stimulation mit Insulin

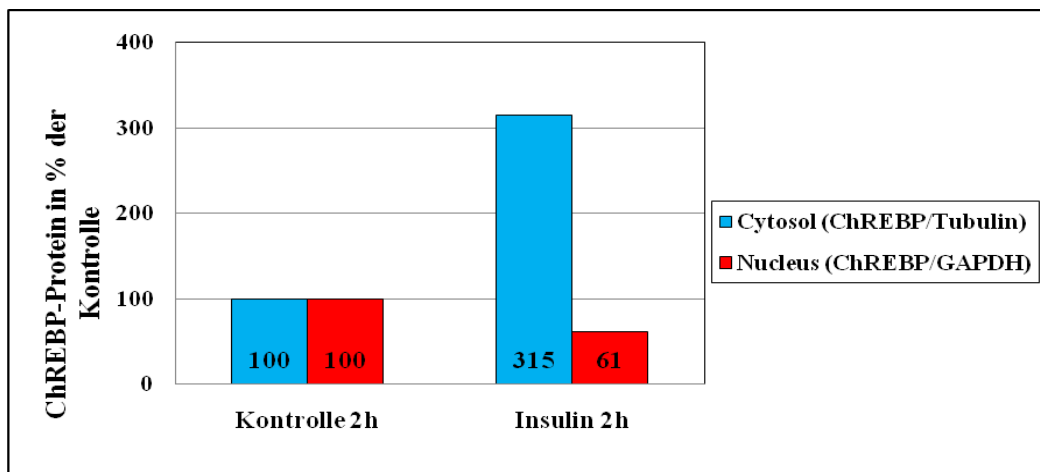


Abbildung 18: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 1 µmol/l Insulin im Medium EMEM. Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus GAPDH.

Zweistündige Stimulation mit 1 µmol/l Insulin führte zu einem starken Anstieg des ChREBP-Proteins im Cytosol und zu einem Abfall im Nucleus.

3.3.3 Stimulation mit Glucagon

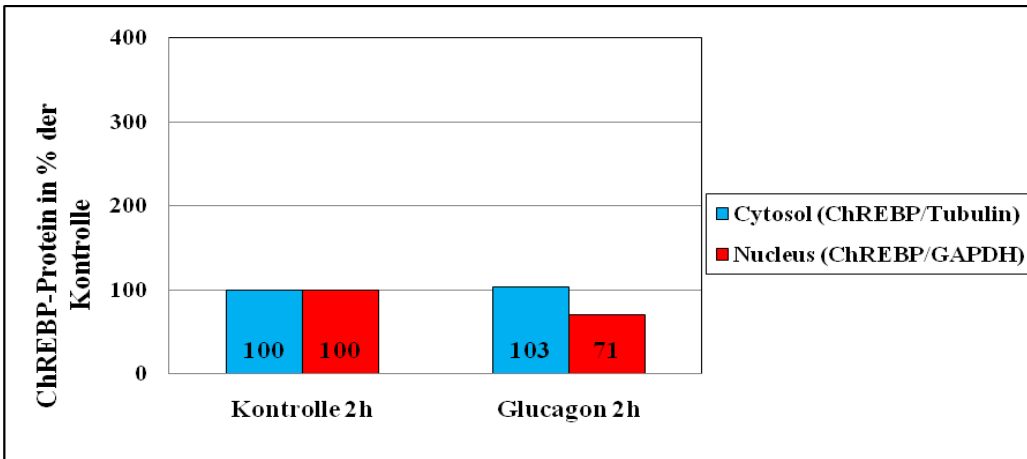


Abbildung 19: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon im Medium EMEM. Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus GAPDH.

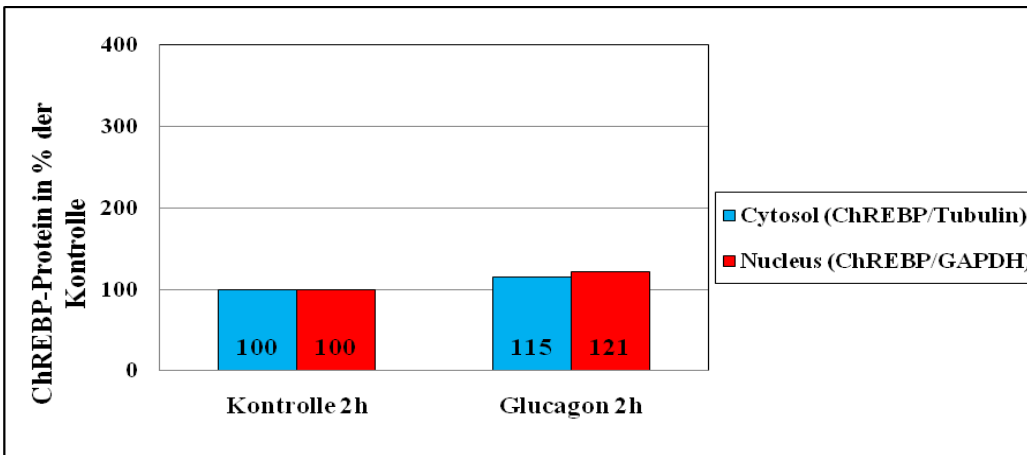


Abbildung 20: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon im Medium DMEM. Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus GAPDH.

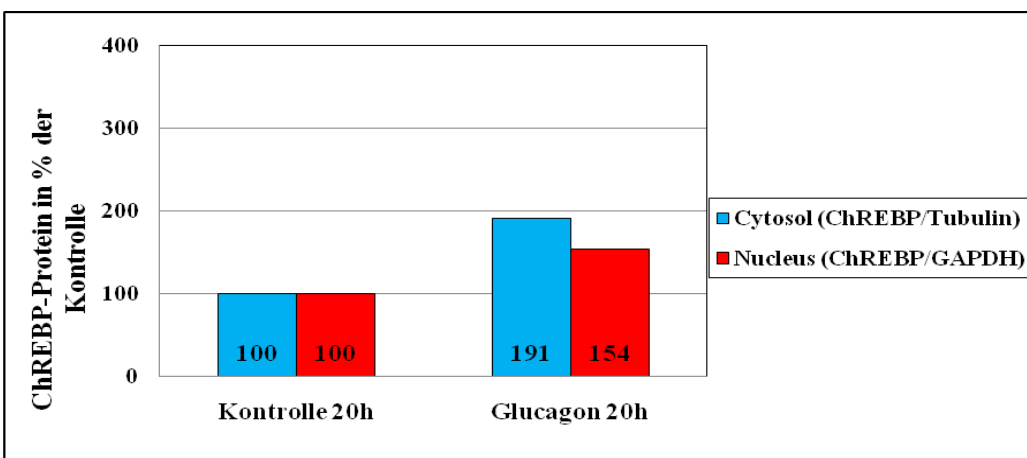


Abbildung 21: ChREBP-Protein in Hep G2 nach 20stündiger Stimulation mit 67 nmol/l Glucagon im Medium EMEM. Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus GAPDH.

Ergebnisse

Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon über zwei Stunden im Medium EMEM führte zu einem Abfall des ChREBP-Gehaltes im Nucleus bei etwa gleichbleibendem Gehalt im Cytosol. Der analoge Versuch im Medium DMEM erbrachte einen leichten Anstieg von ChREBP in beiden Kompartimenten und somit auch einen Anstieg des Gesamtproteingehaltes von ChREBP.

Stimulation mit 67 nmol/l Glucagon über 20 Stunden in EMEM zeigte eine Zunahme von ChREBP in beiden Kompartimenten, wobei die Zunahme im Cytosol stärker ausgeprägt war.

3.3.4 Stimulation mit Fettsäuren

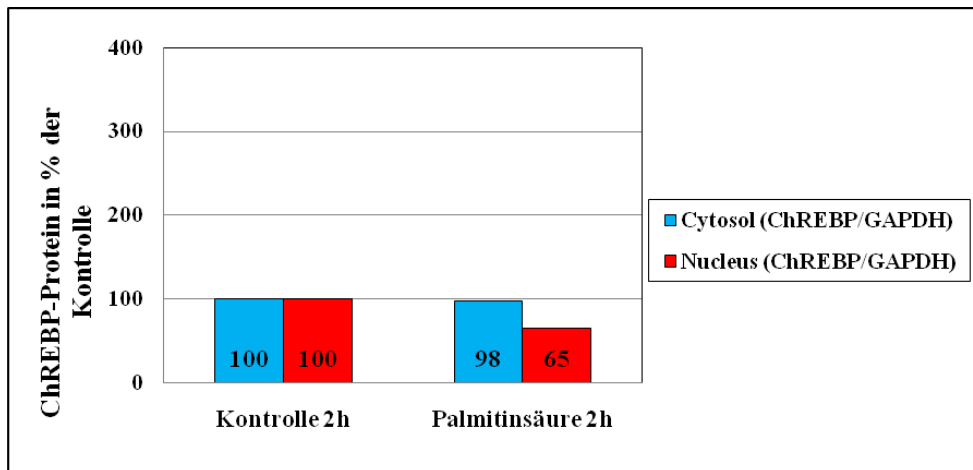


Abbildung 22: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 0,4 % Palmitinsäure im Medium EMEM. Housekeeping-Gen für beide Fraktionen GAPDH.

Der Einsatz von 0,4 % Palmitinsäure über zwei Stunden führte zu einer Abnahme von ChREBP im Nucleus bei etwa gleichbleibendem Gehalt im Cytosol.

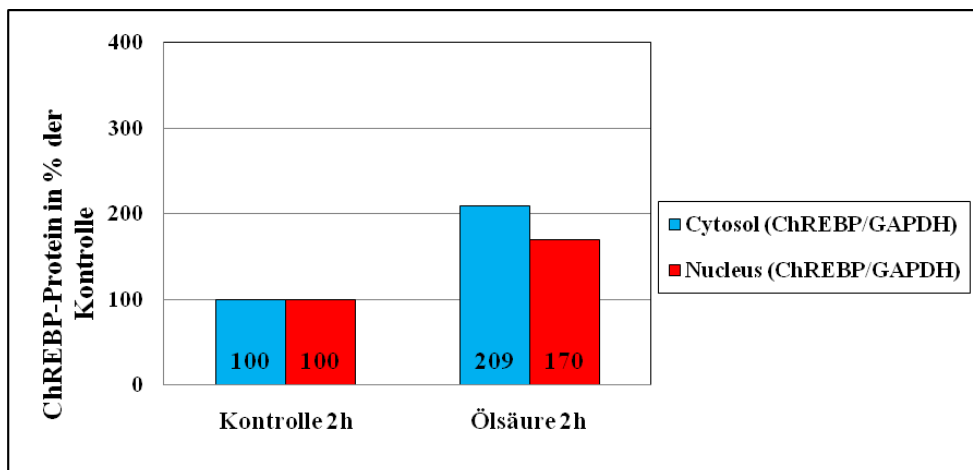


Abbildung 23: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 0,4 % Ölsäure im Medium EMEM. Housekeeping-Gen für beide Fraktionen GAPDH.

Der Einsatz von 0,4 % Ölsäure über zwei Stunden führte zu einem Anstieg der gesamten Proteinmenge von ChREBP, wobei die Zunahme im Cytosol mit ca. 209 % des Kontrollwertes

Ergebnisse

stärker ausgeprägt war als im Nucleus mit ca. 170 %.

3.4 Hauptversuche, 1. Teil: Western Blots

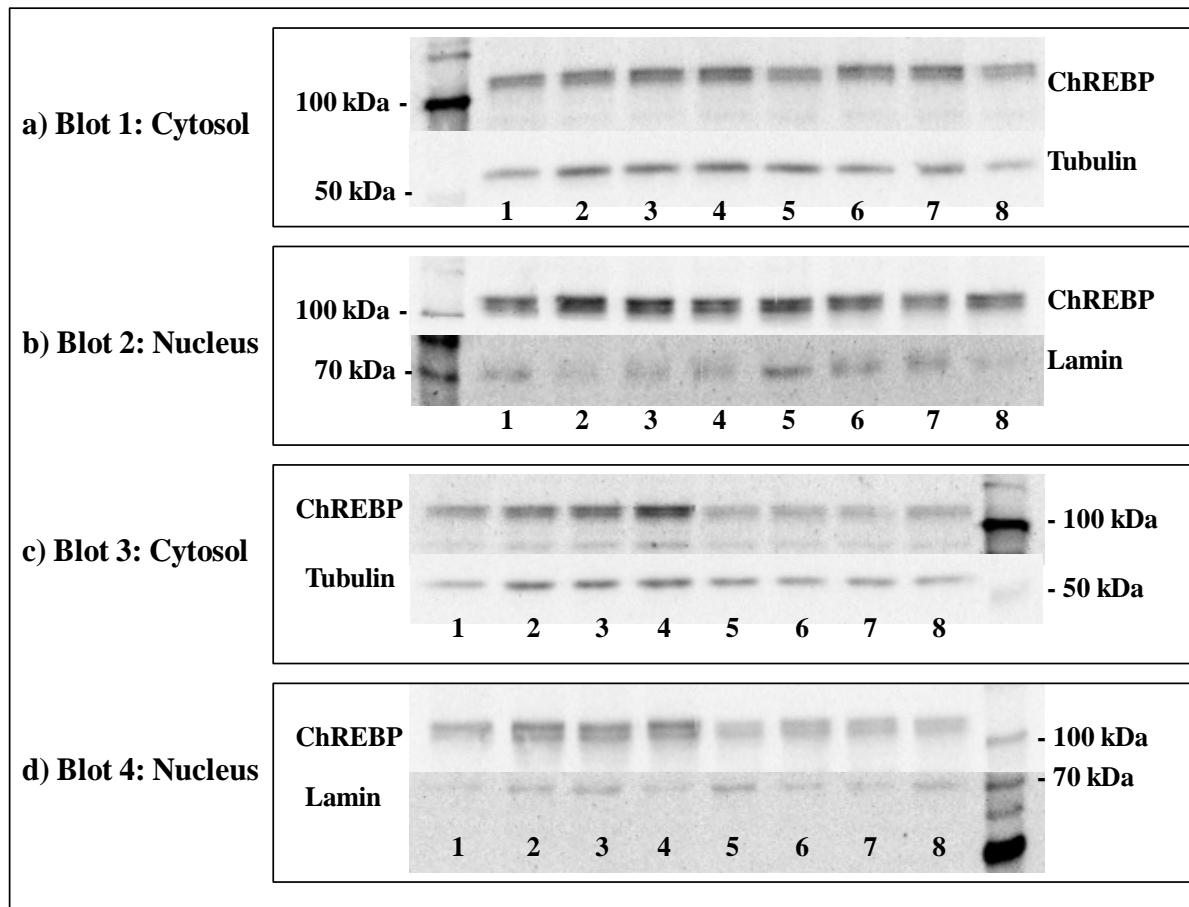


Abbildung 24: Beispiele für Ergebnisse der Western Blots. ChREBP und Tubulin im Cytosol – a) und c) – sowie ChREBP und Lamin im Nucleus – b) und d) – von Hep G2 nach verschiedenen Stimulationen (siehe unten). ChREBP liegt hier bei ca. 103 kDa (postuliert: 93 kDa), Tubulin bei ca. 55 kDa, Lamin bei ca. 70 kDa.

1 + 5 Kontrolle, 2 + 6 Glucose 2 g/l, 3 + 7 Fructose 1 g/l, 4 + 8 Glucagon 50 nmol/l.

1 bis 4: Stimulationszeit zwei Stunden. 5 bis 8: Stimulationszeit 24 Stunden.

In allen Hauptversuchen wurden die Zellen im Medium EMEM kultiviert, das bereits 1 g/l Glucose enthielt, sodass die Zugabe der weiteren Substanzen – Glucose, Fructose, Glucagon, Insulin – stets zusätzlich dazu erfolgte. Die Ansätze, die mit 1 g/l Glucose weiter kultiviert wurden, dienten als Kontrolle. Es wurden der Proteingehalt von ChREBP im Cytosol im Vergleich zur Kontrolle und der Proteingehalt im Nucleus im Vergleich zur Kontrolle betrachtet.

Weil auch hier, wie in den Vorversuchen, nur die relativen Proteinkonzentrationen von ChREBP im Vergleich zu den Kontrollwerten eines Kompartimentes und keine Absolutwerte bestimmt wurden, können Aussagen über den Gesamtgehalt der Zelle an ChREBP-Protein nur bei gleich-

Ergebnisse

sinnigem Abfall oder Anstieg in beiden Kompartimenten getroffen werden.

In den folgenden Grafiken dieses Abschnittes werden die aufgetragenen Werte stets in Prozent der Kontrolle angegeben. Signifikanz-Sternchen * zeigen einen statistisch signifikanten Wert mit p kleiner als 0,05 an. Die Fehlerindikatoren bezeichnen jeweils den Standardfehler des arithmetischen Mittels. Statistisch signifikante Werte sind zusätzlich gelb markiert.

3.4.1 Stimulation mit Glucose für zwei Stunden

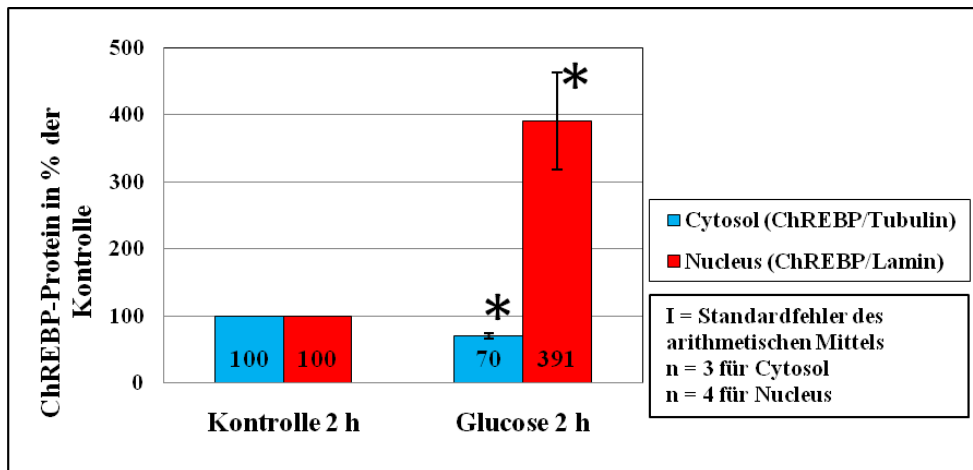


Abbildung 25: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 2 g/l Glucose.

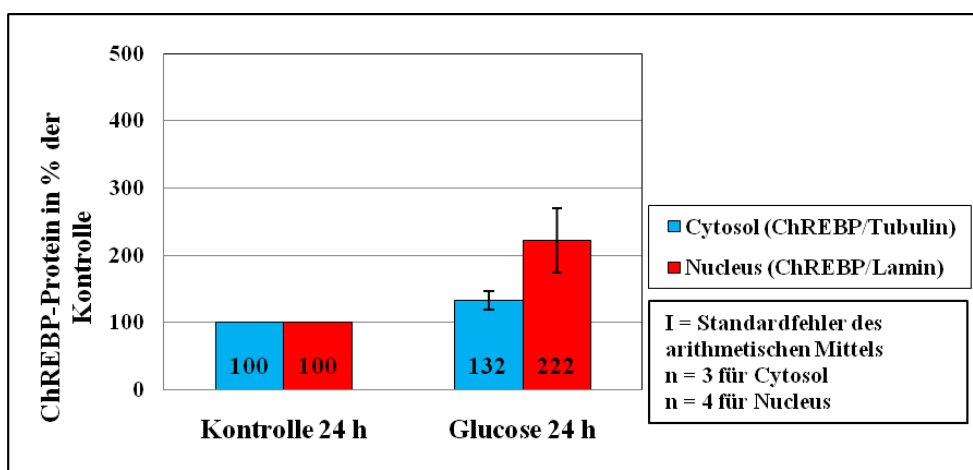
Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus Laminin.

Welch-Test für die Ergebnisse von 2 g/l Glucose im Vergleich zur Kontrolle:

Cytosol: $p = 0,0184$; Nucleus: $p = 0,0276$.

Durch die Stimulation mit 2 g/l Glucose über zwei Stunden kam es im Vergleich zum Kontrollansatz mit 1 g/l Glucose zu einem statistisch signifikanten Abfall der Konzentration des ChREBP-Proteins im Cytosol und zu einem ausgeprägten, ebenfalls statistisch signifikanten Anstieg des ChREBP-Proteins im Nucleus.

3.4.2 Stimulation mit Glucose für 24 Stunden



Ergebnisse

Abbildung 26: ChREBP-Protein in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 2 g/l Glucose.

Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus Lamin.

Welch-Test für die Ergebnisse von 2 g/l Glucose im Vergleich zur Kontrolle:

Cytosol: $p = 0,146$; Nucleus: $p = 0,084$.

Nach 24stündiger Stimulation mit 2 g/l Glucose zeigte sich im Cytosol ein leichter Anstieg von ChREBP, der jedoch nicht statistisch signifikant war.

Im Nucleus kam es, wie schon nach zwei Stunden Stimulation, ebenfalls zu einem Anstieg der ChREBP-Konzentration. Der Anstieg nach 24 Stunden war jedoch geringer ausgeprägt als derjenige nach zwei Stunden und wies im Welch-Test keine statistische Signifikanz auf.

Insgesamt zeigte sich hier eine Zunahme des gesamten zellulären Gehaltes an ChREBP-Protein.

3.4.3 Stimulation mit Fructose für zwei Stunden

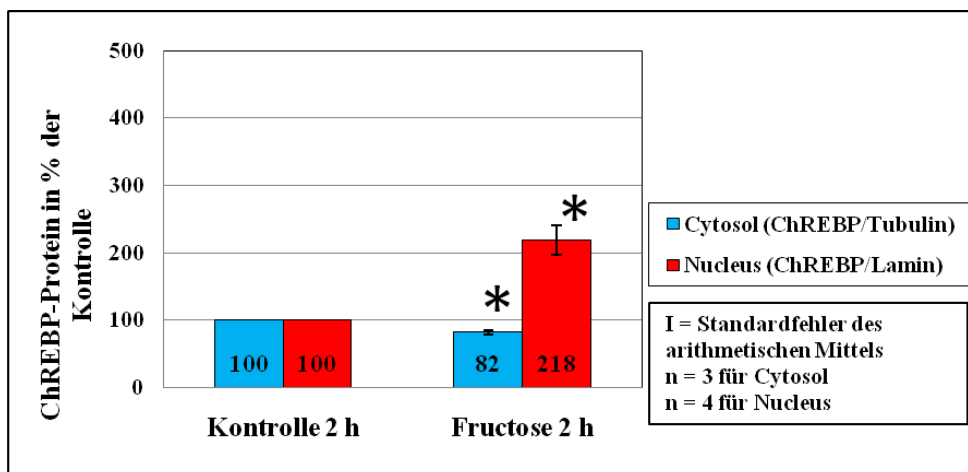


Abbildung 27: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 1 g/l Fructose.

Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus Lamin.

Welch-Test für die Ergebnisse von 1 g/l Fructose im Vergleich zur Kontrolle:

Cytosol: $p = 0,034$; Nucleus: $p = 0,012$.

Zweistündige Stimulation mit 1 g/l Fructose – zusätzlich zu 1 g/l Glucose – führte zu einem statistisch signifikanten Abfall der ChREBP-Konzentration im Cytosol. Dieser Abfall war geringer ausgeprägt als der durch zweistündige Stimulation mit 2 g Glucose verursachte Abfall.

Im Nucleus zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der ChREBP-Konzentration. Der Anstieg fiel geringer aus als der Anstieg im analogen Experiment mit Glucose.

Beide Effekte, sowohl der Abfall von ChREBP im Cytosol als auch der Anstieg im Nucleus, zeigten nach zweistündiger Stimulation mit Fructose also die gleiche Tendenz wie nach entsprechender Stimulation mit Glucose, waren aber schwächer ausgeprägt.

3.4.4 Stimulation mit Fructose für 24 Stunden

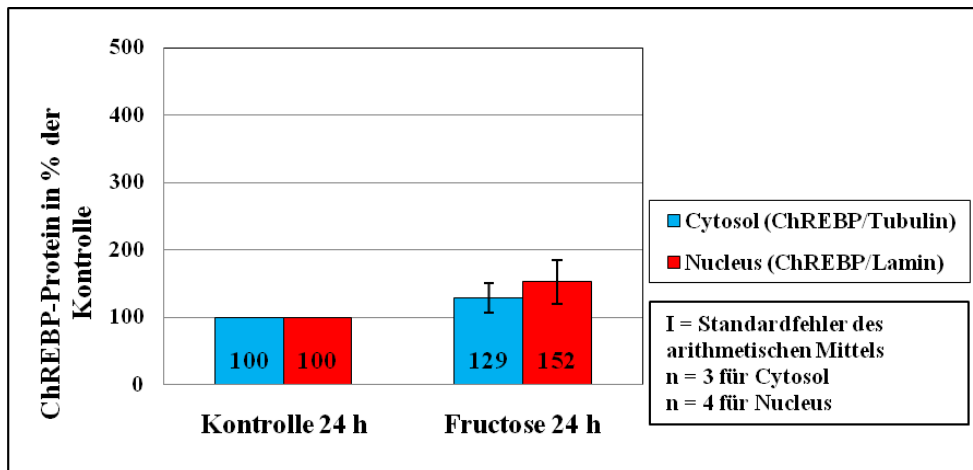


Abbildung 28: ChREBP-Protein in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 1 g/l Fructose.

Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus Lamin.

Welch-Test für die Ergebnisse von 1 g/l Fructose im Vergleich zur Kontrolle:

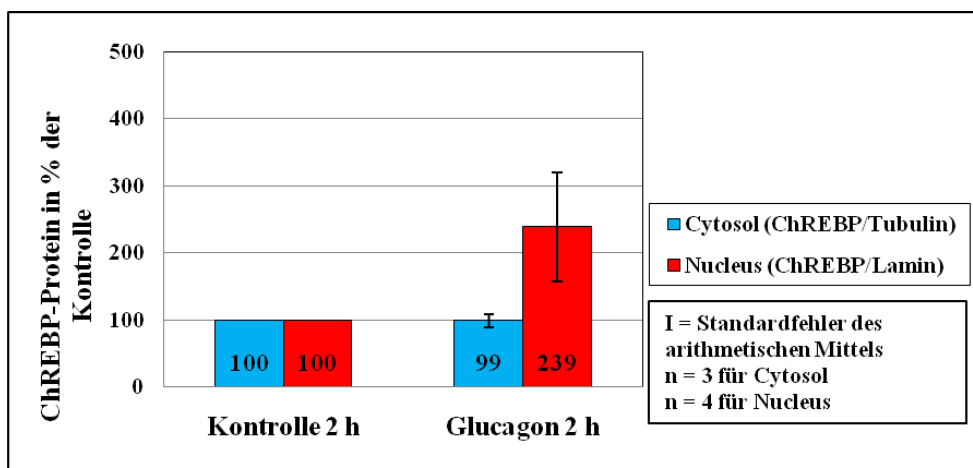
Cytosol: $p = 0,313$; Nucleus: $p = 0,201$.

Die Stimulation mit Fructose über 24 Stunden führte zu einem leichten Anstieg von ChREBP im Cytosol ohne statistische Signifikanz. Dieser Anstieg zeigte sich geringer ausgeprägt als der Anstieg nach Stimulation mit Glucose über 24 Stunden.

Auch im Nucleus kam es zu einem nicht signifikanten Anstieg der ChREBP-Konzentration. Dieser fiel größer aus als der Anstieg im Cytosol, aber geringer als der Anstieg nach zweistündiger Stimulation mit Fructose und geringer als nach 24stündiger Stimulation mit Glucose. Insgesamt kam es zu einem Anstieg des zellulären Gesamtproteingehaltes an ChREBP.

Wie nach Stimulation mit Fructose über zwei Stunden, kam es auch nach Stimulation über 24 Stunden zu tendenziell ähnlichen, aber schwächeren Effekten als nach Stimulation mit Glucose.

3.4.5 Stimulation mit Glucagon für zwei Stunden



Ergebnisse

Abbildung 29: ChREBP-Protein in Hep G2 nach zweistündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon. Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus Lamin.

Welch-Test für die Ergebnisse von 50 nmol/l Glucagon im Vergleich zur Kontrolle:

Cytosol: $p = 0,919$; Nucleus: $p = 0,186$.

Die Zugabe von Glucagon in der Konzentration 50 nmol/l führte im Cytosol zu keinem signifikanten Unterschied der ChREBP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle.

Im Nucleus kam es zu einem insgesamt starken, aber nicht signifikanten Anstieg von ChREBP.

3.4.6 Stimulation mit Glucagon für 24 Stunden

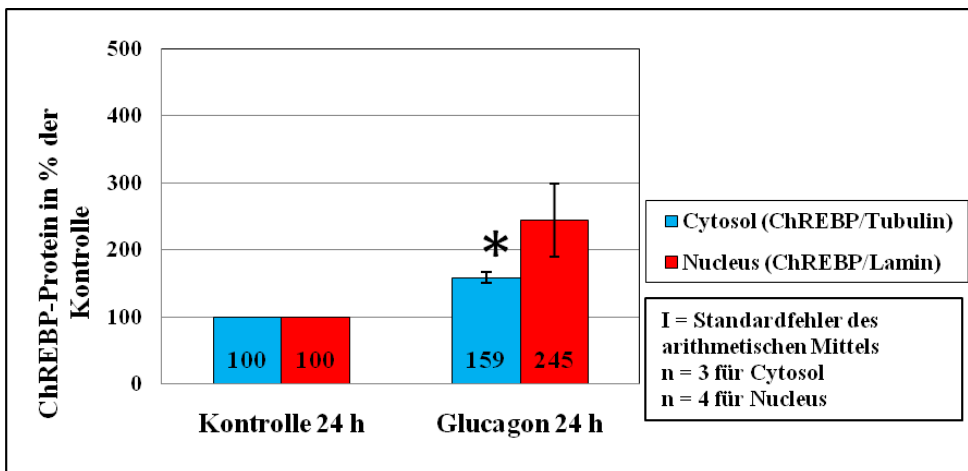


Abbildung 30: ChREBP-Protein in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon.

Housekeeping-Gen für das Cytosol Tubulin, für den Nucleus Lamin.

Welch-Test für die Ergebnisse von 50 nmol/l Glucagon im Vergleich zur Kontrolle:

Cytosol: $p = 0,019$; Nucleus: $p = 0,077$.

Bei der Stimulation mit Glucagon über 24 Stunden war im Cytosol ein statistisch signifikanter Anstieg von ChREBP zu beobachten.

Im Nucleus kam es zu einem deutlicheren ChREBP-Anstieg als im Cytosol, allerdings ohne Signifikanz, wobei diese nur knapp verfehlt wurde. Der Anstieg war etwas stärker ausgeprägt als bei der zweistündigen Stimulation. Insgesamt zeigte sich ein Anstieg des zellulären Gesamtprotein-gehaltes an ChREBP.

3.5 Hauptversuche, 2. Teil: RNA-Extraktion und RT-PCR

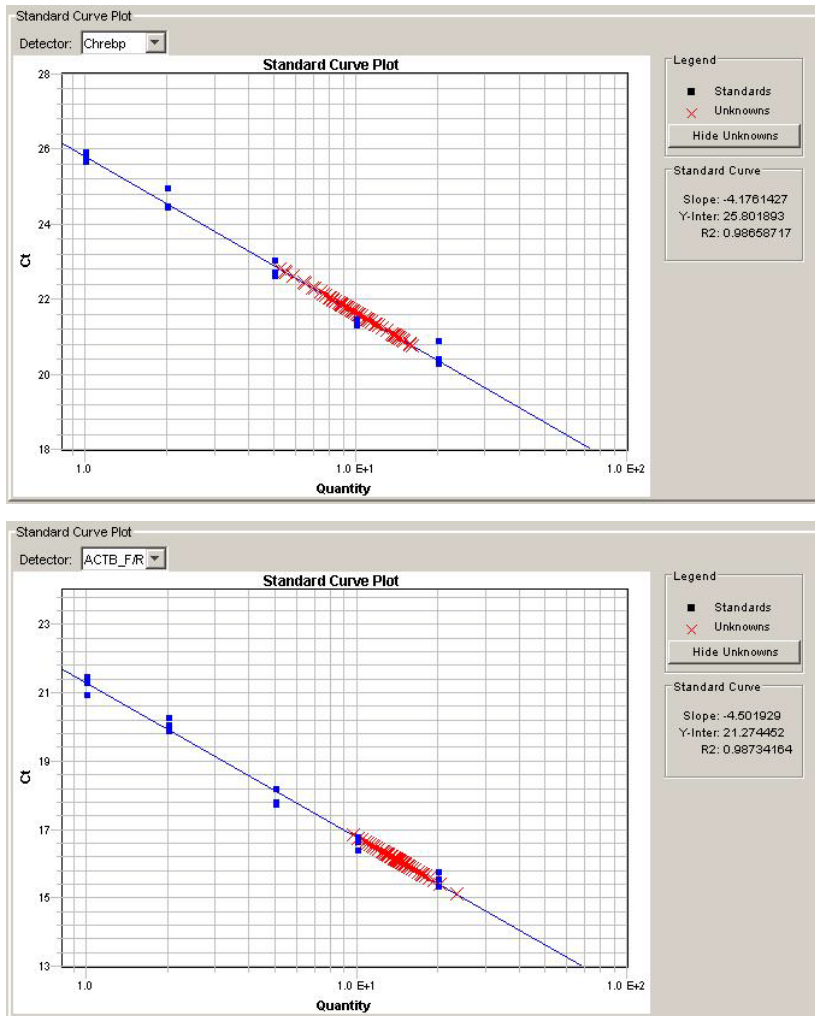
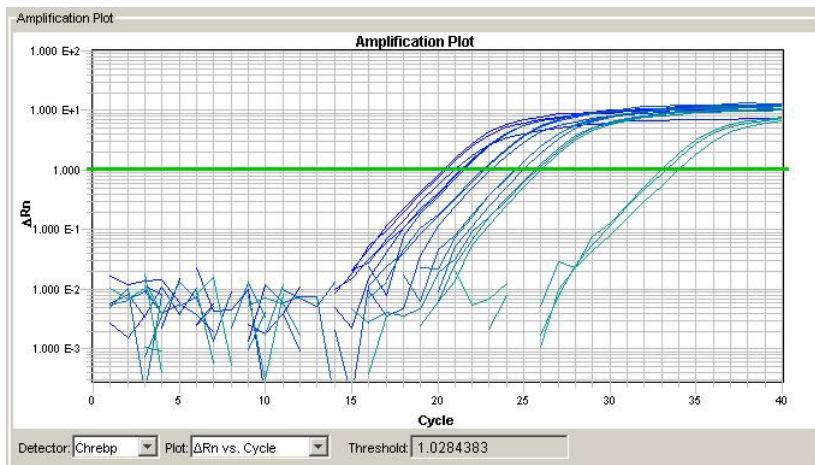


Abbildung 31: Beispiele für Standard-Kurven der mRNA von ChREBP (oben) und Actin (unten) in Hep G2.



Ergebnisse

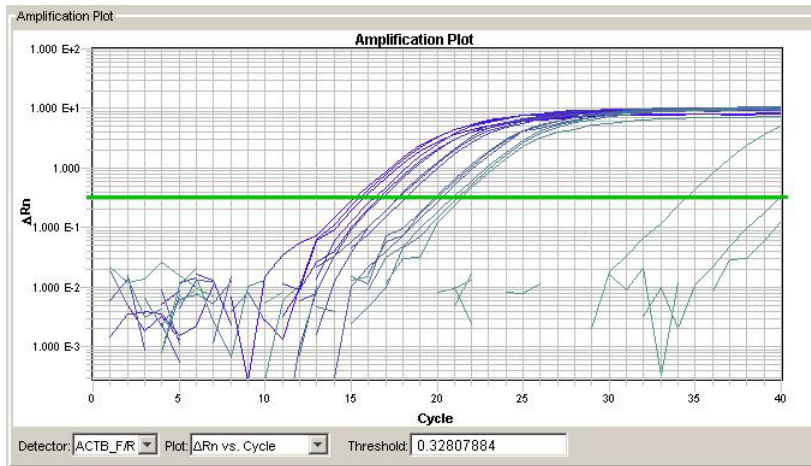


Abbildung 32: Beispiele für Amplifikations-Kurven der Standards und NTCs der mRNA von ChREBP (oben) und Actin (unten) in Hep G2.

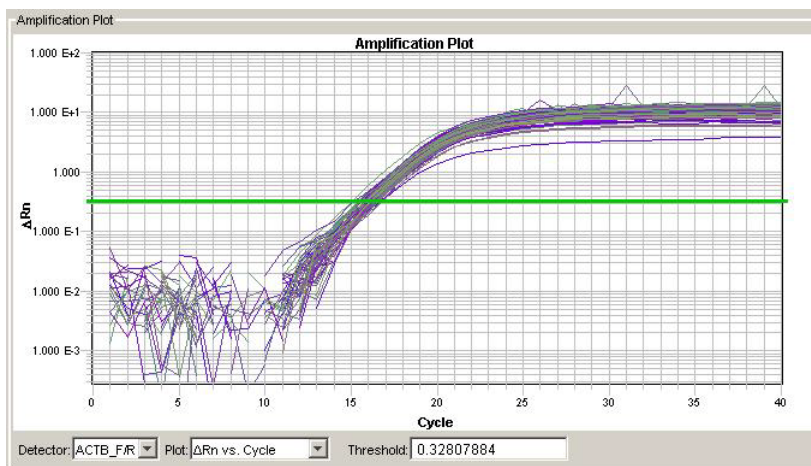
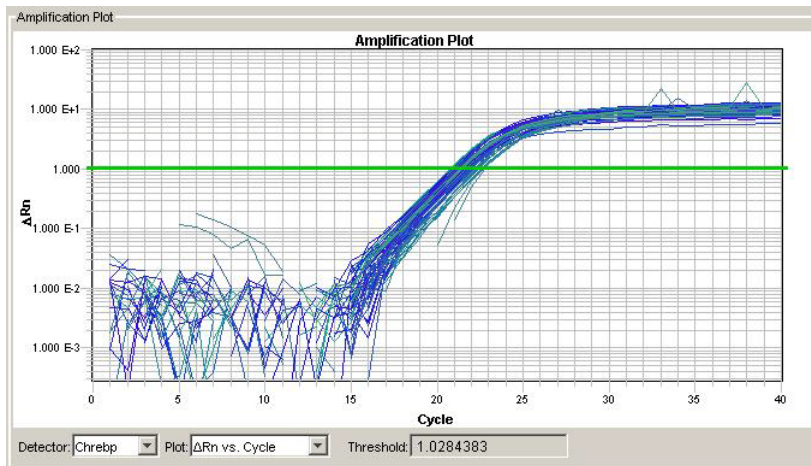


Abbildung 33: Beispiele für Amplifikations-Kurven der Proben der mRNA von ChREBP (oben) und Actin (unten) in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit verschiedenen Substanzen.

Ergebnisse

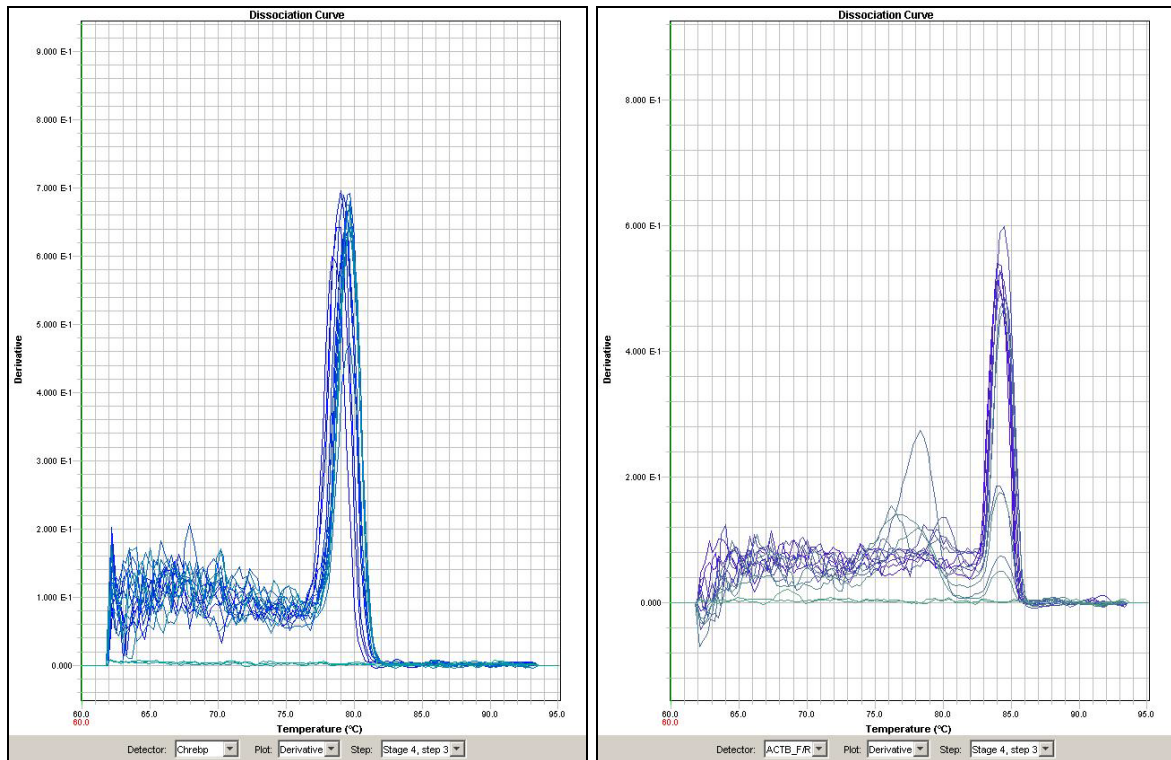


Abbildung 34: Beispiele für Dissoziations-Kurven der Standards und NTCs der mRNA von ChREBP (links) und Actin (rechts) in Hep G2.

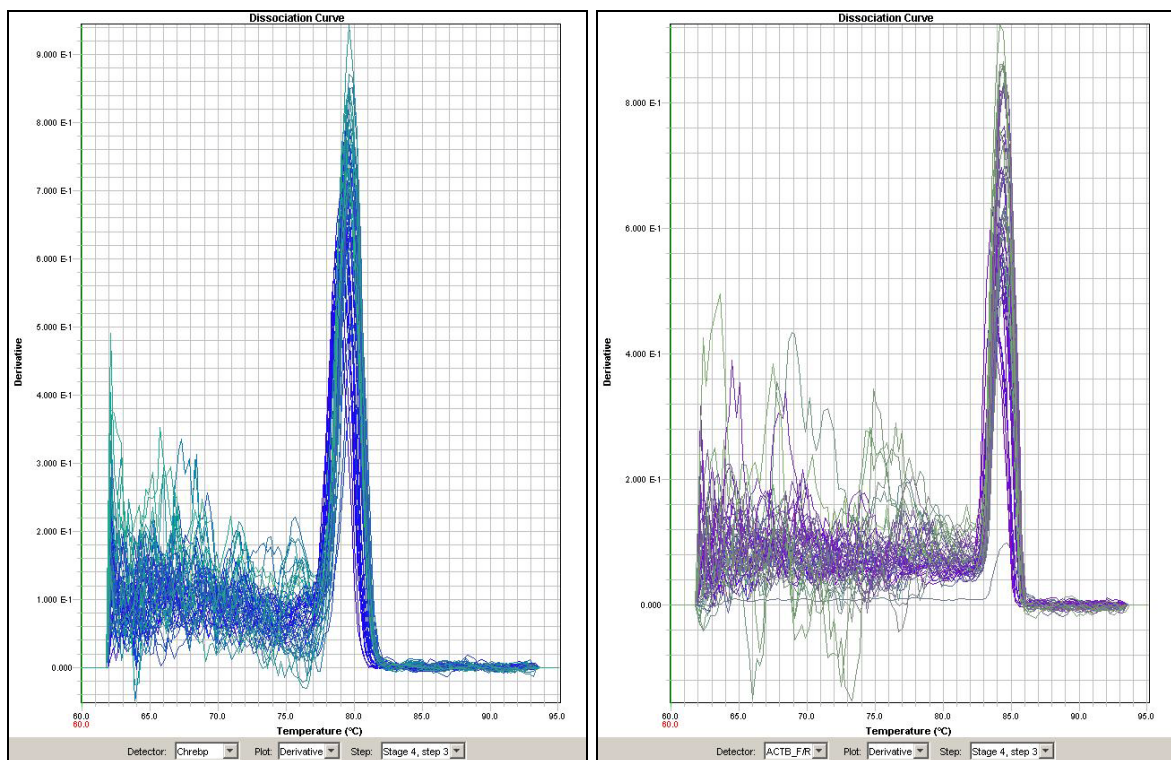


Abbildung 35: Beispiele für Dissoziations-Kurven der Proben der mRNA von ChREBP (links) und Actin (rechts) in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit verschiedenen Substanzen.

3.5.1 Stimulation mit Glucose für vier Stunden

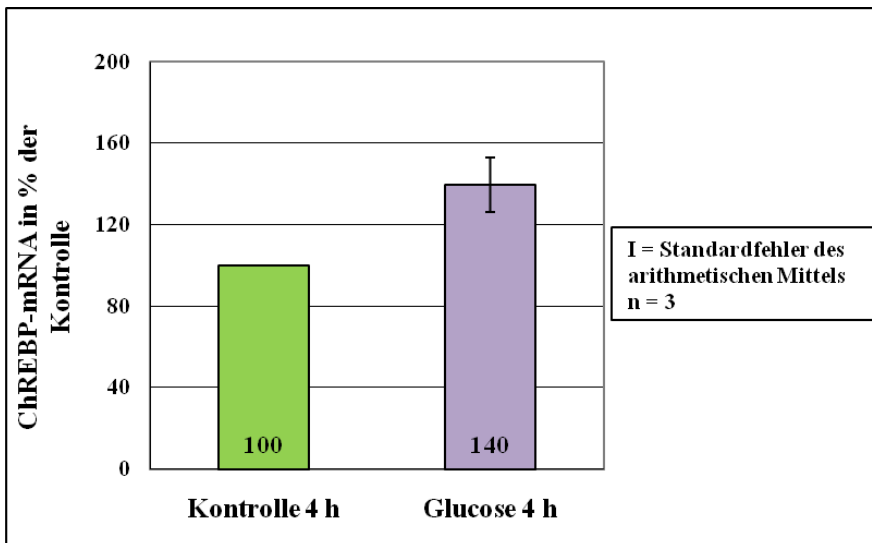


Abbildung 36: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach vierstündiger Stimulation mit 2 g/l Glucose. Housekeeping-Gen Actin.
Welch-Test für die Ergebnisse von 2 g/l Glucose im Vergleich zur Kontrolle: $p = 0,099$.

Die Stimulation der Hep G2-Zellen mit Glucose für vier Stunden führte zu einem Anstieg der Konzentration der mRNA von ChREBP.

3.5.2 Stimulation mit Glucose für 24 Stunden

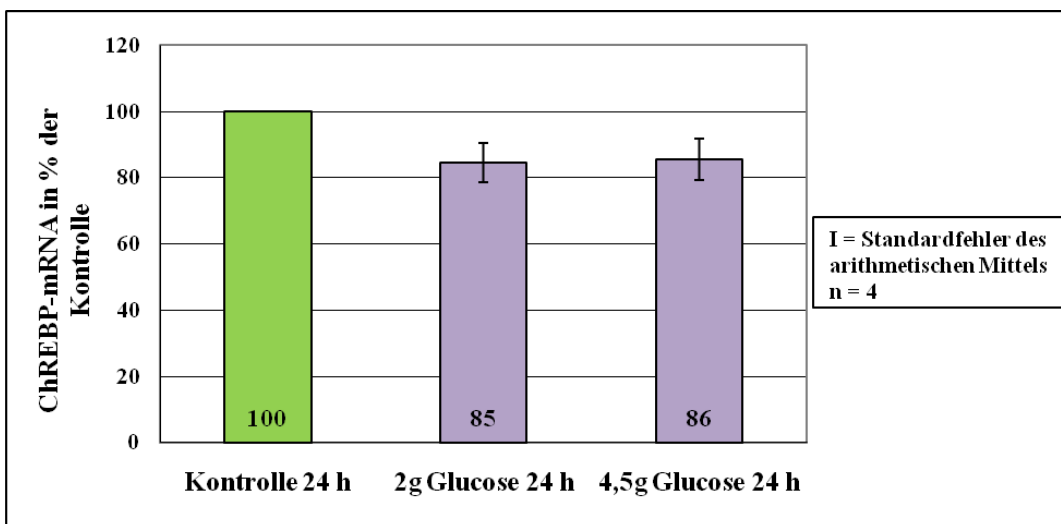


Abbildung 37: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 2 g und 4,5 g/l Glucose. Housekeeping-Gen Actin.
Welch-Test für die Ergebnisse von 2 g und 4,5 g/l Glucose im Vergleich zur Kontrolle:
Glucose 2 g/l: $p = 0,099$; Glucose 4,5 g/l: $p = 0,108$.

Bei Stimulation mit Glucose in den Konzentrationen 2 g/l und 4,5 g/l über 24 Stunden kam es zu

Ergebnisse

einer Abnahme der ChREBP-mRNA in den Zellen.

3.5.3 Stimulation mit Fructose für vier Stunden

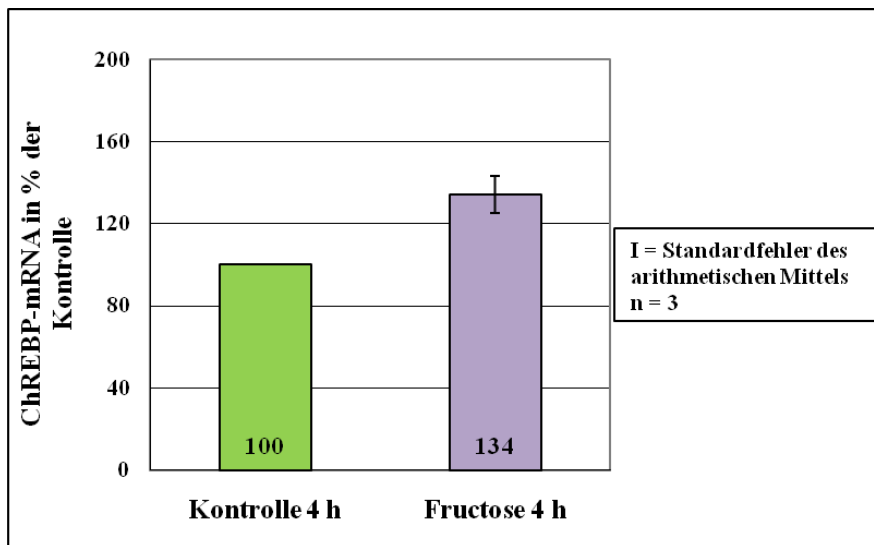


Abbildung 38: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach vierstündiger Stimulation mit 1 g/l Fructose. Housekeeping-Gen Actin.

Welch-Test für die Ergebnisse von 1 g/l Fructose im Vergleich zur Kontrolle: $p = 0,064$.

Die Stimulation mit Fructose für vier Stunden führte, ähnlich wie die Stimulation mit Glucose für vier Stunden, zu einem Anstieg der mRNA von ChREBP. Dieser Anstieg war etwas geringer ausgeprägt als der durch Glucose verursachte Anstieg.

3.5.4 Stimulation mit Fructose für 24 Stunden

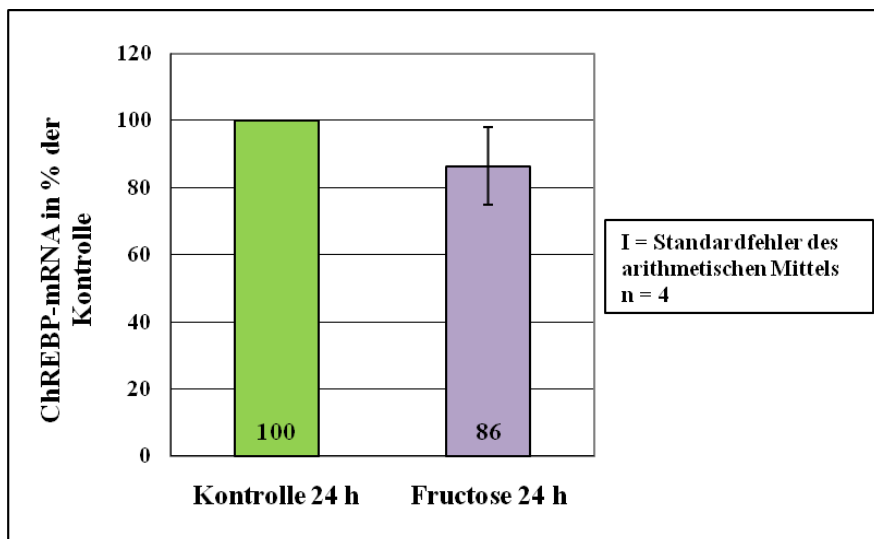


Abbildung 39: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 1 g/l Fructose. Housekeeping-Gen Actin.

Welch-Test für die Ergebnisse von 1 g/l Fructose im Vergleich zur Kontrolle: $p = 0,323$.

Ergebnisse

Wie bei dem analogen Experiment mit Glucose, führte auch die Stimulation mit Fructose für 24 Stunden zu einer Abnahme der ChREBP-mRNA.

3.5.5 Stimulation mit Glucagon für vier Stunden

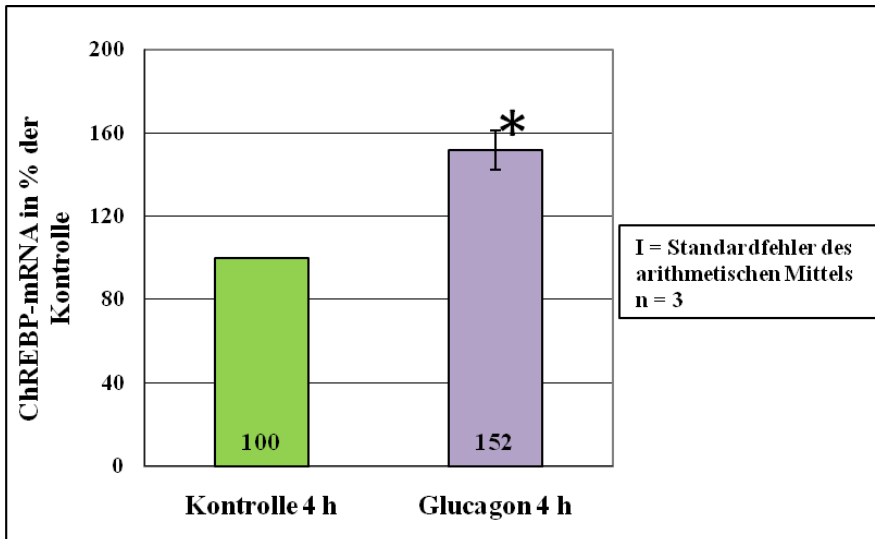


Abbildung 40: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach vierstündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon. Housekeeping-Gen Actin.

Welch-Test für die Ergebnisse von 50 nmol/l Glucagon im Vergleich zur Kontrolle: $p = 0,032$.

Vierstündige Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon führte zu einer deutlichen und statistisch signifikanten Zunahme der mRNA von ChREBP in den Hep G2-Zellen.

3.5.6 Stimulation mit Glucagon für 24 Stunden

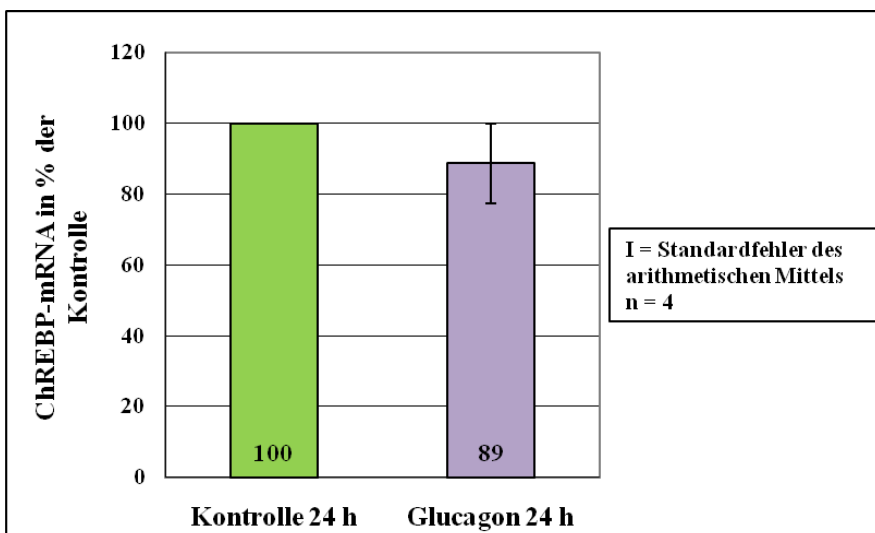


Abbildung 41: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon. Housekeeping-Gen Actin.

Welch-Test für die Ergebnisse von 50 nmol/l Glucagon im Vergleich zur Kontrolle: $p = 0,387$.

Ergebnisse

Bei 24stündiger Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon zeigte sich eine Abnahme der mRNA von ChREBP; diese fiel etwas geringer aus als bei Stimulation mit Glucose, Fructose oder Insulin.

3.5.7 Stimulation mit Insulin für vier Stunden

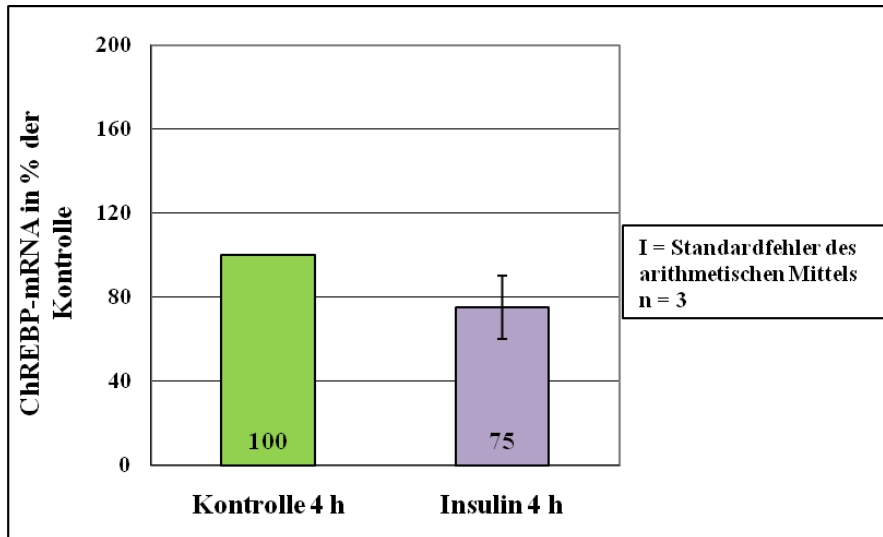


Abbildung 42: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach vierstündiger Stimulation mit 1 µmol/l Insulin.

Housekeeping-Gen Actin.

Welch-Test für die Ergebnisse von 1 µmol/l Insulin im Vergleich zur Kontrolle: $p = 0,240$.

Nach vierstündiger Stimulation mit 1 µmol/l Insulin zeigte sich eine deutliche Reduktion der mRNA von ChREBP.

3.5.8 Stimulation mit Insulin für 24 Stunden

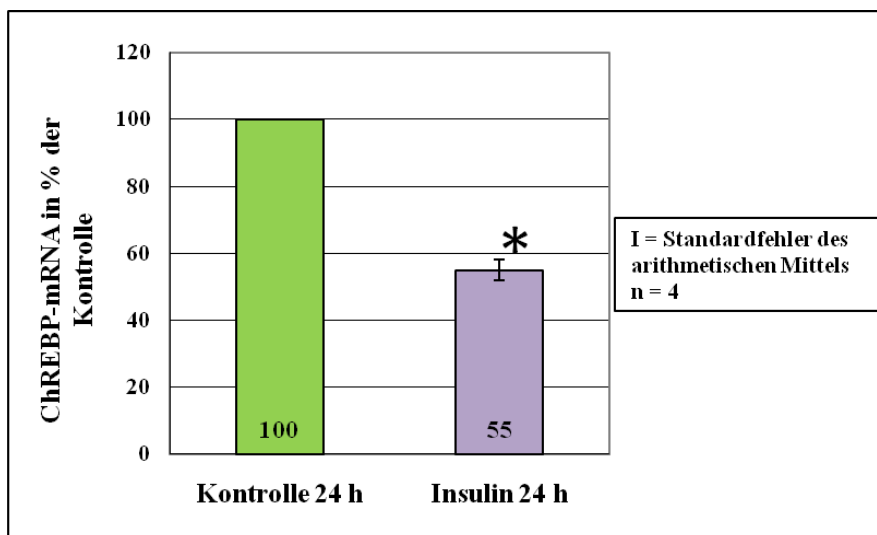


Abbildung 43: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit 1 µmol/l Insulin.

Housekeeping-Gen Actin.

Welch-Test für das Ergebnis von 1 µmol/l Insulin im Vergleich zur Kontrolle: $p = 0,001$.

Ergebnisse

Die 24stündige Stimulation der Hep G2-Zellen mit Insulin führte zu einer starken, statistisch signifikanten Abnahme der ChREBP-mRNA.

3.5.9 Vergleich der mRNA der Housekeeping-Gene Actin und GAPDH zur Quantifizierung von ChREBP-mRNA

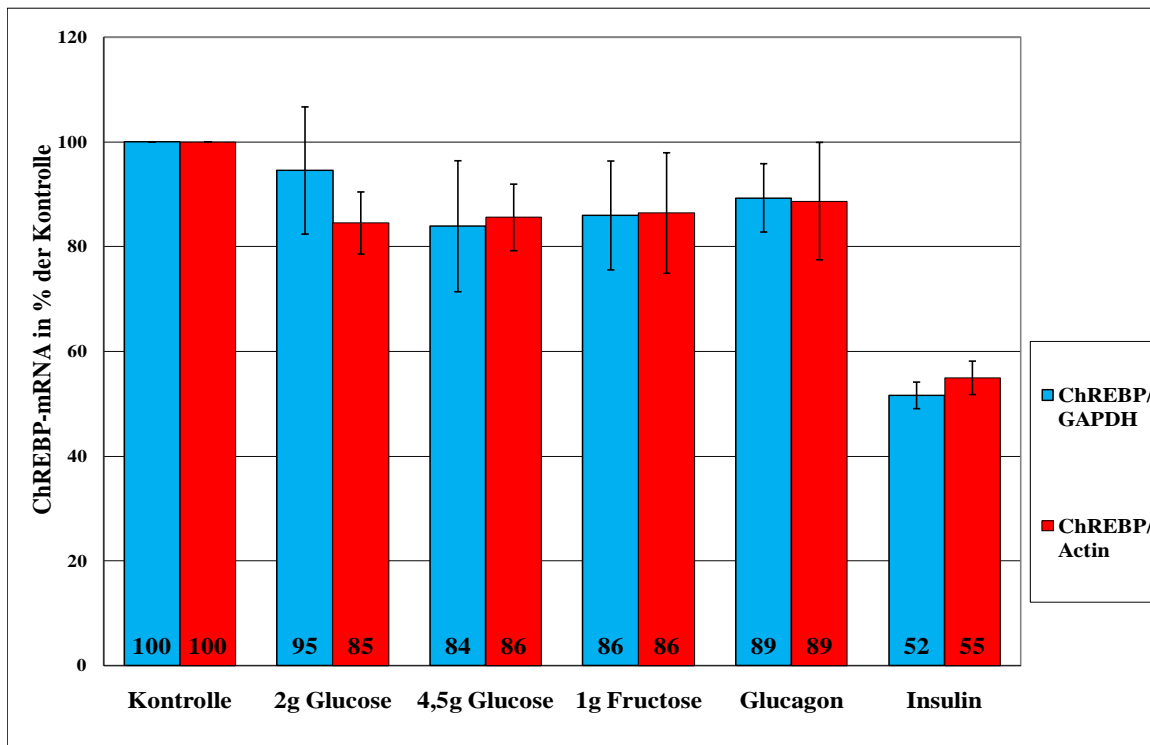


Abbildung 44: ChREBP-mRNA in Hep G2 nach 24stündiger Stimulation mit verschiedenen Substanzen, normalisiert auf die mRNA der Housekeeping-Gene Actin bzw. GAPDH.

Welch-Test für die Ergebnisse der Quotienten aus ChREBP und GAPDH im Vergleich zu den Quotienten aus ChREBP und Actin für jeweils dieselbe Stimulation:

Glucose 2 g/l: $p = 0,496$; Glucose 4,5 g/l: $p = 0,910$; Fructose 1 g/l: $p = 0,977$; Glucagon 50 nmol/l: $p = 0,964$; Insulin 1 $\mu\text{mol/l}$: $p = 0,445$.

In einem Experiment erfolgten die Messungen der mRNA von ChREBP im Vergleich zu der mRNA von zwei verschiedenen Housekeeping-Genen, GAPDH und Actin. Zwischen den Quotienten aus ChREBP und GAPDH im Vergleich zu den Quotienten aus ChREBP und Actin ergaben sich im Welch-Test für keine der jeweiligen Stimulationen statistisch signifikante Unterschiede.

4 Diskussion

Es folgt eine allgemeine Vorbemerkung zur Interpretation der Ergebnisse. Auf das ChREBP-Protein wirken sich verschiedene Einflüsse aus: Transkription, Translation, Translokation, Aktivierung und Protein-Abbau. Transkription und Translation führen zur Neusynthese von ChREBP und damit zu Änderungen des Gesamtproteingehaltes der Zelle. Zur Beurteilung der Auswirkungen von Substanzen auf die Transkription von ChREBP wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Durch Messung der relativen mRNA-Konzentration von ChREBP können Änderungen der Transkription gut abgeschätzt werden. Auf den Gesamtproteingehalt nehmen weitere Faktoren wie Translation oder Protein-Abbau Einfluss. Änderungen des Gesamtproteins können in den hier durchgeführten Western Blots allerdings aus mehreren Gründen nur eingeschränkt beurteilt werden: Die Proteine wurden stets in Cytosol- und Kern-Fraktion aufgetrennt, bei den Western Blots wurden immer möglichst gleiche Mengen an Protein aufgetragen, sodass die absoluten Protein-Konzentrationen unberücksichtigt blieben, und die Normalisierung erfolgte auf unterschiedliche Housekeeping-Gene in Cytosol und Nucleus. Daher können hier nur Aussagen zur relativen Proteinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle in jeweils einem Kompartiment getroffen werden. Bei gleichsinnigen Änderungen der Menge an ChREBP-Protein in beiden Kompartimenten kann allerdings mit Sicherheit eine entsprechende Änderung des Gesamtproteingehaltes festgestellt werden.

Neben der Transkription lag das Haupt-Augenmerk in den durchgeführten Experimenten auf der Translokation des ChREBP-Proteins, auf der Verteilung zwischen Cytosol und Nucleus. Dabei wurde angenommen, dass die Lokalisation von ChREBP im Nucleus für eine Aktivierung der Transkriptionstätigkeit spricht. Da außer dem Transport in den Nucleus, wie in der Einleitung erläutert, noch weitere Mechanismen die Aktivität von ChREBP beeinflussen, z. B. das GSM, sollte beachtet werden, dass allein die Lokalisation im Nucleus eine Transkriptions-Aktivität von ChREBP noch nicht beweist. Um Aussagen zur Aktivität von ChREBP treffen zu können, hätte letztendlich die Induktion der Zielgene von ChREBP untersucht werden müssen.

4.1 Effekte von Glucose auf ChREBP

4.1.1 Kurzzeit-Einfluss (zwei bzw. vier Stunden)

4.1.1.1 Proteinebene (zwei Stunden)

In dieser Arbeit führte eine Stimulation von Hep G2-Zellen mit Glucose für zwei Stunden, sowohl in den Hauptversuchen mit 2 g/l als auch in den Vorversuchen mit 1 g, 2 g, 4 g und 4,5 g/l,

Diskussion

zu einer Abnahme der Menge des ChREBP-Proteins im Cytosol und zu einer Zunahme im Nucleus, während es bei 0 g/l Glucose zu einem umgekehrten Bild, Zunahme von ChREBP im Cytosol und Abnahme im Nucleus, kam. Diese Ergebnisse stimmen mit der in der Literatur beschriebenen Hypothese überein, dass ChREBP durch Glucoseanstieg aus dem Cytosol in den Kern transloziert wird und umgekehrt durch Glucoseabfall aus dem Kern ins Cytosol.

Wie die hier beobachtete Translokation von ChREBP im Einzelnen abläuft – z. B. ob Dephosphorylierung eine Rolle spielt, wie in der Literatur größtenteils vermutet, manchmal aber auch angezweifelt wird – und ob es danach tatsächlich zu einer Aktivierung des ChREBP-Proteins und einer vermehrten Transkription der Zielgene kommt – was u. a. eine zweite Dephosphorylierung und eine Aktivierung des Glucose sensing module umfassen würde – konnte mit den hier verwendeten Methoden nicht festgestellt werden. Für eine Regulation von ChREBP durch Phosphorylierung gibt es allerdings Hinweise: In den Banden der Western Blots waren bei der Kernfraktion deutlich und bei der Cytosolfraction etwas weniger deutlich Doppelbanden zu sehen, was dafür spricht, dass ChREBP hier in verschiedenen Formen mit unterschiedlichem Molekulargewicht vorliegt (siehe Abbildung 24, Abschnitt 3.4). Es wäre möglich, dass die Bande mit dem jeweils höheren Molekulargewicht eine stärker phosphorylierte Form von ChREBP darstellt. Im Cytosol scheinen die Banden dichter beieinander zu liegen als im Kern; sie könnten den einfach und zwei- oder dreifach phosphorylierten Formen entsprechen. Die einfach phosphorylierten Formen könnten bereits an P1 dephosphorylierte, aber noch nicht in den Kern transportierte ChREBP-Proteine darstellen, und die zwei- oder dreifach phosphorylierten Formen könnten ins Cytosol transportierten, inaktivierten ChREBP-Proteinen entsprechen, die außer an P1 auch an P3 und eventuell P4 und/oder P2 phosphoryliert sind (siehe Abschnitt 1.1.4.1). Im Nucleus fällt eine sehr deutlich zu erkennende Doppelbande mit scheinbar weiter als im Cytosol auseinander liegenden Banden auf. Die untere Bande könnte die an P1, P3 und P4 dephosphorylierte, also die aktive Form von ChREBP darstellen – wobei sie aufgrund der schnelleren Wanderungsgeschwindigkeit im Gel stärker von der oberen Bande abgesetzt ist –, und die breitere obere Bande könnte der einfach phosphorylierten, das heißt der in den Kern transportierten, aber noch nicht aktivierten Form von ChREBP entsprechen (oder auch der gerade inaktivierten Form). Außerdem sind an der Entstehung der breiten oberen Bande im Kern möglicherweise auch zwei- oder dreifach phosphorylierte Formen von ChREBP beteiligt, die inaktivierte und zum Transport ins Cytosol gekennzeichnete ChREBP-Proteine darstellen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass ChREBP noch andere als die genannten Phosphorylierungsstellen aufweist, deren Funktion und Relevanz noch nicht geklärt sind, die aber die in den Western Blots zu sehenden Banden beeinflussen könnten [21].

Diskussion

Des Weiteren wurden folgende Beobachtungen gemacht: In den Vorversuchen nahm mit steigender Glucosekonzentration der ChREBP-Gehalt im Cytosol weiter ab und im Kern weiter zu; dies schien jedoch nicht im gleichen, sondern in einem geringeren Ausmaß zu erfolgen als die Steigerung der eingesetzten Glucosekonzentrationen. Demnach ergäbe sich für das Ausmaß der Translokation im Verhältnis zur Glucosekonzentration kein direkt proportionaler Zusammenhang, sondern eine Abschwächung des Effektes mit steigender Glucose. In den Vorversuchen sank die Konzentration des ChREBP-Proteins im Nucleus bei Mediumflüssigkeit ohne Glucose im Vergleich zu einem Glucosegehalt von 1 g/l auf ca. 55-60 % der Kontrolle ab, jedoch nicht stärker; zum Vergleich lag in den Hauptversuchen die ChREBP-Konzentration im Nucleus nach Stimulation mit 2 g Glucose im Verhältnis zu 1 g Glucose bei ca. 391 %. Diese Ergebnisse könnten auf eine besondere Stimulierbarkeit der Translokation von ChREBP durch Glucose in einem Konzentrationsbereich von ca. 1 g/l, eventuell auch schon von ca. 0,5 g/l, bis ca. 2 g/l Glucose hindeuten, was ungefähr den physiologischerweise im Blut vorkommenden Glucose-Konzentrationen entspricht. Eine besonders gute Stimulierbarkeit in diesem Bereich würde daher als „physiologisch sinnvoll“ einleuchten.

Möglicherweise stellt eine Abschwächung des Einflusses von Glucose auf ChREBP bei sehr hohen Glucosekonzentrationen einen Schutzmechanismus der Hepatocyten vor zu starker Induktion der Lipogenese und vor Lipotoxizität dar. Dies würde vom Prinzip her der Entwicklung einer Insulinresistenz ähneln, die bei insulinabhängigen Zellen einerseits als Schutz vor Lipotoxizität, andererseits als Schutz vor zu hohem Glucose-Einstrom und dadurch verursachtem oxidativem Stress gedeutet werden kann (siehe Abschnitt 1.2.1). Da ein Schutz von Hepatocyten gegen erhöhten Glucose-Einstrom – und damit gegen erhöhte Aktivierung von ChREBP – durch Insulinresistenz nicht möglich ist, weil Hepatocyten insulinunabhängige GLUT2 besitzen, könnte die beobachtete Abschwächung der Wirkung von Glucose auf ChREBP eine Alternative bieten. Über welche Mechanismen diese Abschwächung im Einzelnen zustande kommt, müsste in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

Bei der Interpretation der Experimente mit Glucose-freier Mediumflüssigkeit sollte bedacht werden, dass der Mangel an Glucose eine Belastung der Zellen darstellen und weitere Stoffwechselwege – z. B. Stress-Signalwege – induzieren könnte, die ihrerseits ChREBP beeinflussen. Dass ChREBP auch bei Mediumflüssigkeit ohne Glucose offenbar nicht zu 100 % ins Cytosol transportiert wird, könnte zum einen dadurch bedingt sein, dass ChREBP auch ohne Stimulation durch Glucose eine konstitutive Aktivität aufweist und Glucose „nur“ eine zusätzliche Stimulation von ChREBP hervorruft. Die physiologische Relevanz der durch ChREBP aktivierten Stoffwechselwege spricht für eine solche konstitutive Aktivität. Zum anderen könnte der Glucose-

Diskussion

mangel zur Gluconeogenese der Zellen und zur teilweisen Abgabe der neu synthetisierten Glucose in die Mediumflüssigkeit führen (da die verwendeten Zellen wahrscheinlich annähernd wie normale Leberzellen reagieren, die Glucose ins Blut abgeben). Die neu synthetisierte intra- und extrazelluläre Glucose könnte daraufhin mittelfristig eine Translokation von ChREBP in den Kern bewirken. Abgesehen davon wäre es möglich, dass ChREBP bei Zellen in Glucose-freiem Medium zwar teilweise im Kern vorliegt, aufgrund mangelnder Stimulation des GSM aber größtenteils inaktiv ist, die Zielgene also kaum stimuliert werden.

In den Vorversuchen war zu beobachten, dass der Gehalt von ChREBP im Nucleus nach zwei Stunden Stimulation mit 4,5 g/l Glucose in ursprünglich glucosefreiem Kulturmedium deutlich niedriger war, ca. 142 % des Kontrollwertes, als bei Stimulation mit 2 oder 4 g/l Glucose in Medium mit ursprünglich 1 g/l Glucose, wo nach zwei Stunden ca. 247 % bzw. 277 % erreicht wurden. Erst nach 20 Stunden Stimulation mit 4,5 g/l Glucose wurde bei den zunächst glucosefreien Ansätzen ebenfalls eine Steigerung von ChREBP im Nucleus auf ca. 277 % des Kontrollwertes erreicht. Möglicherweise hatten die über mehrere Tage in 0 g/l Glucose kultivierten Hep G2-Zellen ihren Metabolismus derartig an diesen Zustand angepasst, dass es zu einer starken Reduktion Glucose-abbauender Wege wie Glycolyse und PPP gekommen war und somit – weil der PPP über X5P zur Aktivierung von ChREBP führt – auch zu einem sehr niedrigen Gehalt und Aktivitätsgrad von ChREBP. Bei Zutreffen dieser Hypothese bräuchten ohne Glucose kultivierte Zellen nach Gabe von Glucose vermutlich erst Zeit, um die glycolytischen und lipogenen Stoffwechselwege wieder zu aktivieren und den Gehalt an ChREBP zu steigern.

Der prozentuale Anstieg von ChREBP im Nucleus nach Stimulation mit Glucose scheint weitaus größer zu sein als der prozentuale Abfall im Cytosol, wobei der Gesamtproteingehalt, wie eingangs erläutert, allein anhand der Proteinwerte nicht eindeutig beurteilt werden kann. Die nach Stimulation mit Glucose gesteigerte Menge an mRNA (siehe Abschnitt 4.1.1.2) lässt aber vermuten, dass hier tatsächlich auch die Gesamtproteinmenge ansteigt. Insofern würde Glucose neben einer gesteigerten Translokation also auch zu einer vermehrten Neusynthese von ChREBP führen. Für den akuten Einfluss von Glucose werden aber vermutlich Translokation und Aktivierung des ChREBP-Proteins die größere Rolle spielen, da eine Neusynthese längere Zeit benötigt.

4.1.1.2 mRNA-Ebene (vier Stunden)

Eine kurzzeitige Stimulation von Hep G2-Zellen mit 2 g/l Glucose führte zu einem Anstieg der Menge an ChREBP-mRNA, was eine Steigerung der Transkription von ChREBP als Reaktion auf Glucose vermuten lässt. Auch eine verminderte Degradation der ChREBP-mRNA könnte am Anstieg der mRNA beteiligt sein. Neben einer direkten Aktivierung der Transkription des

Diskussion

ChREBP-Gens könnten weitere Mechanismen eine Rolle spielen, beispielsweise eine Induktion von Co-Aktivatoren oder Inhibition von Co-Repressoren von ChREBP durch Glucose.

Es kam hier nach vier Stunden zu einer Zunahme der mRNA auf ca. 140 % der Kontrolle, während in den Western Blot-Experimenten eine Zunahme von ChREBP-Protein im Nucleus auf ca. 391 % der Kontrolle nach zwei Stunden (bei gleichzeitiger Abnahme im Cytosol auf ca. 70 %) und auf ca. 222 % nach 24 Stunden (bei gleichzeitigem Anstieg im Cytosol auf ca. 132 %) zu beobachten war. Einerseits muss berücksichtigt werden, dass die Gesamtproteinmenge, wie schon erwähnt, aus den Western Blots nicht eindeutig abgelesen werden kann, und andererseits, dass die Proteinextraktion nach zwei, die mRNA-Extraktion nach vier Stunden erfolgte und theoretisch bereits ein Abbau von mRNA stattgefunden haben könnte. Unter der Annahme, dass die Ausgangs-Konzentrationen von ChREBP-Protein in Cytosol und Nucleus in etwa vergleichbar sind und die mRNA-Menge innerhalb der vier Stunden nicht abgesunken ist, wäre eine mögliche Erklärung für den deutlich stärkeren Anstieg der Proteinmenge im Vergleich zur mRNA-Menge eine durch Glucose vermittelte Erhöhung der Translationsrate der ChREBP-mRNA. Weil sich ein Anstieg der mRNA aufgrund der Dauer des Translationsprozesses vermutlich erst verzögert auf die Proteinmenge auswirkt, sollte die nach vier Stunden vorhandene mRNA auch mit der Proteinmenge nach 24 Stunden verglichen werden: Hier zeigt sich ebenfalls eine Korrelation, da für die Proteinmenge im Nucleus nach 24 Stunden ein Anstieg auf ca. 222 % der Kontrolle festgestellt wurde, für die mRNA nach vier Stunden auf ca. 140 %.

Zur Klärung, wann genau eine Neusynthese von ChREBP einsetzt und wie sich ihr Verlauf zeitlich entwickelt, könnten weitere Experimente beitragen, die den Verlauf der mRNA-Konzentration innerhalb der ersten vier Stunden nach Stimulationsbeginn untersuchen.

4.1.2 Langzeit-Einfluss (24 Stunden)

4.1.2.1 Proteinebene

Unter 24stündigem Einfluss von Glucose zeigte sich in den Hauptversuchen mit 2 g/l Glucose eine Zunahme von ChREBP sowohl im Cytosol als auch im Nucleus, somit also eindeutig eine Zunahme der Gesamtproteinmenge in der Zelle. Der Anstieg im Cytosol war geringer ausgeprägt (Zunahme auf ca. 132 %) als der Anstieg im Nucleus (Zunahme auf ca. 222 %), und der Anstieg im Nucleus war nicht so stark wie nach zweistündiger Stimulation (Zunahme auf ca. 391 %).

Der Anstieg der gesamten Proteinmenge von ChREBP in der Zelle nach 24 Stunden zeigt, dass seit Beginn der Stimulation mit Glucose eine gesteigerte Transkription und eine Neusynthese von ChREBP stattgefunden haben müssen. Ob die Proteinmenge nach 24 Stunden im Vergleich zu zwei Stunden wieder abgesunken ist, kann anhand der Proteinebene nicht eindeutig beurteilt

Diskussion

werden, hierauf deuten die Ergebnisse aber zusammen mit der nach 24 Stunden abgesunkenen mRNA hin. Das könnte bedeuten, dass die anfänglich stark gesteigerte Transkriptionsrate des ChREBP-Gens im Zeitraum zwischen ca. zwei und 24 Stunden wieder absinkt, diese Form der Reaktion auf Glucose sich also abschwächt. Gleichzeitig ist ein partieller Abbau der ChREBP-Proteine zu vermuten. Bisher existieren wenige Studien zur Degradation des ChREBP-Proteins; ChREBP scheint aber ein eher labiles Protein zu sein, seine Halbwertszeit wird auf ca. 30 min geschätzt [16]. Insgesamt scheint der Proteingehalt von ChREBP unter Langzeit-Einfluss von Glucose jedoch (immer noch) gesteigert zu sein.

Der Anstieg von ChREBP im Cytosol im Vergleich zu zwei Stunden könnte zum einen auf eine gesteigerte Neusynthese von ChREBP hinweisen, wobei das Protein zunächst im Cytosol bleibt, um später nach Aktivierung in den Kern zu wandern. Zum anderen könnte ein Teil der ChREBP-Proteine, die nach Kurzzeit-Einfluss von Glucose im Nucleus vorhanden sind, phosphoryliert, inaktiviert und wieder ins Cytosol transloziert werden. Die Translokation ins Cytosol nähme also zu, während die Translokation in den Nucleus im Vergleich zu kurzzeitiger Stimulation absänke. Im Kern war der ChREBP-Gehalt nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontrolle immer noch gesteigert, im Vergleich zum Gehalt nach zwei Stunden aber verringert. Beide Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Steigerung der nucleären Translokation von ChREBP durch Glucose nach 24 Stunden immer noch besteht, sich aber inzwischen abgeschwächt hat.

Die beschriebene Abschwächung sowohl der Transkription als auch der nucleären Translokation von ChREBP könnte eine Gegenregulation der Zellen nach Langzeit-Exposition mit Glucose darstellen. Durch die nach zwei Stunden zunächst festgestellte starke Aktivierung von ChREBP kommt es wahrscheinlich zur Synthese von Fettsäuren und anderen Metaboliten, die mit der Zeit akkumulieren und die Aktivität von ChREBP hemmen. Diese Hemmung könnte allgemein durch verschiedene Mechanismen vermittelt werden; z. B. könnten Transkription und Translation von ChREBP verringert, der Abbau von ChREBP-mRNA und/oder ChREBP-Protein gesteigert, die Translokation in den Nucleus und die DNA-Bindung durch Phosphorylierung von ChREBP gehemmt oder die funktionelle Aktivität von ChREBP durch Beeinflussung des GSM reduziert werden. Der Zweck von Gegenregulations-Mechanismen, die nach langfristiger Stimulation der Zelle mit Glucose auftreten, könnte möglicherweise ein Schutz der Zelle vor Lipotoxizität sein.

Eine weitere Erklärung für die geringere Aktivierung von ChREBP nach 24 Stunden könnte aber auch die mit der Zeit vermutlich sinkende intra- und extrazelluläre Glucose-Konzentration liefern, die durch den Glucose-Verbrauch der Zellen verursacht wird.

In den Vorversuchen war nach langfristiger Stimulation mit 4,5 g/l Glucose eine weitere Steigerung des Gehaltes von ChREBP im Nucleus zu beobachten, von ca. 142 % nach zwei Stunden

Diskussion

auf ca. 277 % nach 20 Stunden, während der ChREBP-Gehalt im Cytosol nahezu gleich blieb. Allerdings waren die Zellen hierbei vorher in glucosefreiem Medium kultiviert worden, sodass die Steigerung des Gehaltes an ChREBP möglicherweise langsam angelaufen und innerhalb von zwei Stunden noch nicht abgeschlossen war. Bei dem Ansatz mit 0 g Glucose blieb der Gehalt von ChREBP im Cytosol etwa gleich, während der Gehalt im Nucleus auf ca. 57 % reduziert war – ähnlich dem Wert nach zwei Stunden.

Wie sich die funktionelle Aktivität von ChREBP verhält, ob sie nach 24 Stunden – wie das Translokationsverhalten – vielleicht immer noch erhöht, im Vergleich zu zwei Stunden aber zurückgegangen ist, oder ob sie sich sogar deutlich abgeschwächt hat, müsste in weiteren Experimenten durch Beobachtung der Induktion der Zielgene von ChREBP untersucht werden.

4.1.2.2 mRNA-Ebene

In den RT-PCRs wurde eine Abnahme der mRNA-Konzentration von ChREBP in Hep G2-Zellen nach Stimulation mit 2 g/l und 4,5 g/l Glucose über 24 Stunden gesehen. Demgegenüber wurde in den Western Blots mit 2 g/l Glucose über 24 Stunden, wie oben beschrieben, eine Zunahme der Menge an ChREBP-Protein beobachtet, und in den Experimenten mit vierstündiger Stimulation wurde eine Erhöhung der ChREBP-mRNA festgestellt. Ähnlich der in Abschnitt 4.1.2.1 geäußerten Hypothese könnte es auch auf mRNA-Ebene nach einiger Zeit durch Akkumulation von Fettsäuren und anderen Metaboliten der durch ChREBP eingeleiteten Stoffwechselwege zu einer Gegenregulation kommen, die eine Reduktion der Transkription des ChREBP-Gens und einen vermehrten Abbau der ChREBP-mRNA bewirkt. Hinzu kommt vermutlich ein Absinken des intra- und extrazellulären Glucosegehaltes, das aus dem Glucose-Verbrauch der Zellen resultiert. Beide Effekte würden schließlich nach 24 Stunden, im Vergleich zu vier Stunden, zu dem hier beobachteten Abfall der mRNA führen. Dass die Proteinmenge in den Zellen in diesem Experiment nicht so stark abgesunken ist wie die mRNA-Menge, könnte an einem sich im Vergleich zum mRNA-Abbau eher langsam vollziehenden Protein-Abbau von ChREBP liegen (– oder, weniger wahrscheinlich, an einer stark gesteigerten Translation der vorhandenen Menge an ChREBP-mRNA).

4.2 Effekte von Fructose auf ChREBP

4.2.1 Kurzzeit-Einfluss (zwei bzw. vier Stunden)

4.2.1.1 Proteinebene (zwei Stunden)

Nach Stimulation mit Fructose für zwei Stunden kam es in den Hep G2-Zellen tendenziell zu einem ähnlichen Bild wie nach Stimulation mit Glucose, nämlich zu einem Abfall des ChREBP-

Diskussion

Proteins im Cytosol und zu einem Anstieg im Kern, insgesamt also zu einer Translokation von ChREBP in den Nucleus. Diese Effekte waren allerdings schwächer ausgeprägt als nach Stimulation mit Glucose. ChREBP scheint auf Glucose also stärker mit Translokation – und eventuell Aktivierung – zu reagieren als auf Fructose.

In der Einleitung, Abschnitt 1.1.4.4.2, wurde eingehend erläutert, dass die beim Abbau von Fructose entstehenden Metabolite, Fructose-6-Phosphat und Glyceral-3-Phosphat, wahrscheinlich meistens in die Glycolyse eingeschleust werden, auf bestimmten Wegen aber auch durch Metabolisierung im Pentosephosphatweg zur Entstehung von X5P und damit zur Dephosphorylierung von ChREBP und zur Translokation in den Kern führen könnten. Die Annahme, dass der größere Teil der Metabolite von Fructose aber für die Glycolyse und nicht für den PPP verwendet wird und Glucose den PPP in stärkerem Umfang aktiviert als Fructose, weil G6P direkt als Substrat für den PPP verwendet werden kann, könnte die schwächere Translokation von ChREBP in den Nucleus durch Fructose im Vergleich zu Glucose begründen.

Man könnte aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse also eine geringere Aktivierung von ChREBP durch Fructose als durch Glucose annehmen. Andererseits könnte es sein, dass Effekte von Fructose auf ChREBP auch auf anderen Wegen als über X5P vermittelt werden, z. B. durch eine erhöhte DNA-Bindungsfähigkeit, wie in einer in vivo-Studie vermutet wird [62], durch Aktivierung des GSM und der Transkriptions-Aktivität oder durch Beeinflussung von Co-Regulatoren. Hierbei wäre u. a. zu untersuchen, ob und inwieweit andere Substanzen als Glucose überhaupt Einfluss auf das GSM nehmen können, also wie spezifisch das GSM für Glucose ist. Die genannten Mechanismen könnten theoretisch eine deutliche Aktivierung von ChREBP zur Folge haben; daher kann aus der schwächer gesteigerten Translokation durch Fructose nicht zwangsläufig auf eine geringere Aktivierung von ChREBP geschlossen werden. In zukünftigen Experimenten sollten aus diesem Grund die oben aufgeführten Aktivierungs-Mechanismen sowie die Expression der Zielgene von ChREBP nach Stimulation mit Fructose untersucht werden.

Es sollte bedacht werden, dass es in der heutigen Zeit zu einem breiten Einsatz von Saccharose und Maissirup gekommen ist, wie schon in der Einleitung unter Abschnitt 1.1.4.4.2 angesprochen. Aus dem Abbau des Disaccharids Saccharose entstehen im Organismus zu gleichen Teilen Glucose und Fructose; der Anteil von Fructose in Maissirup wird durch das Enzym Glucose-Isomerase häufig auf bis zu 90 % erhöht. Während die enthaltene Glucose zu einer Aktivierung von ChREBP über die Entstehung von X5P sowie über Einfluss auf das GSM führt, trägt Fructose vermutlich zumindest zur Bildung von X5P bei. Unter der Annahme, dass Fructose das GSM nicht stimuliert, könnte nur durch das Zusammenspiel mit Glucose, die z. B. aus Saccharose oder Maissirup stammt, eine effektive Aktivierung von ChREBP zustande kommen, während Fructo-

Diskussion

se allein ChREBP in diesem Fall nur in geringem Maße beeinflussen würde. Da in dieser Arbeit stets 1 g/l Glucose in der Mediumflüssigkeit vorhanden war, würde eine Stimulation nur mit Fructose, ohne jeglichen Zusatz von Glucose, möglicherweise zu anderen Ergebnissen führen; vielleicht wäre in diesem Fall eine deutlich geringere Stimulation von ChREBP zu beobachten.

Künftige Experimente sollten neben Fructose vielleicht auch andere Monosaccharide wie Mannose und Galactose oder sogenannte Zuckeraustauschstoffe wie z. B. Sorbit, Mannit oder Xylit hinsichtlich ChREBP untersuchen, weil diese in heutiger Zeit einen immer breiteren Einsatz in Lebensmitteln finden, ihre Auswirkungen auf Transkriptionsfaktoren wie ChREBP bisher aber kaum experimentell untersucht wurden.

4.2.1.2 mRNA-Ebene (vier Stunden)

Die hier durchgeführten Experimente zeigen eine Erhöhung der ChREBP-mRNA nach vierstündiger Stimulation mit Fructose, was auf gesteigerte Transkription des ChREBP-Gens (und verminderten Abbau der ChREBP-mRNA) hinweist. Die Steigerung der mRNA war etwas schwächer ausgeprägt als die nach Stimulation mit Glucose registrierte Steigerung. Dieser Befund passt gut zu der auf Proteinebene beobachteten Translokation von ChREBP in den Nucleus, da diese ebenfalls gesteigert war, aber in schwächerem Maße nach Fructose als nach Glucose. Zusammenfassend führen diese Beobachtungen zu der Hypothese, dass Fructose kurzfristig eine schwächere Transkription und nucleäre Translokation von ChREBP hervorruft als Glucose.

4.2.2 Langzeit-Einfluss (24 Stunden)

4.2.2.1 Proteinebene

Die 24stündige Stimulation der Hep G2-Zellen mit 1 g/l Fructose ergab ein ähnliches Bild wie die 24stündige Stimulation mit Glucose, zeigte aber schwächer ausgeprägte Effekte: Die Menge an ChREBP-Protein stieg sowohl im Cytosol als auch im Nucleus an, somit nahm auch der Gehalt an ChREBP-Gesamtprotein in der Zelle zu. Die Zunahme im Nucleus war mit ca. 152 % stärker ausgeprägt als die Zunahme im Cytosol mit ca. 129 %, war aber nicht mehr so stark wie nach zwei Stunden (Zunahme auf ca. 218 %). Der im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Gehalt an ChREBP im Nucleus deutet eine immer noch bestehende Stimulation von ChREBP durch Translokation in den Nucleus an; der im Vergleich zum zweistündigen Experiment geringere Gehalt lässt aber vermuten, dass diese Stimulation sich inzwischen abgeschwächt hat. Der erhöhte Gehalt an ChREBP im Cytosol könnte aus neu synthetisiertem und noch nicht in den Kern transloziertem ChREBP resultieren, könnte aber auch eine im Vergleich zur kurzfristigen Stimulation verstärkte Translokation von ChREBP ins Cytosol und somit ebenfalls eine Abnahme der Akti-

Diskussion

vierung von ChREBP anzeigen. Der Anstieg des ChREBP-Gesamtproteins weist auf eine Neusynthese von ChREBP seit Beginn der Stimulation mit Fructose hin. (Wie bei der Stimulation mit Glucose scheint die Menge an Gesamtprotein im Vergleich zum zweistündigen Wert abgenommen zu haben, was aber nicht eindeutig festzustellen ist.) Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass ein langfristiger Einfluss von Fructose eine Stimulation von ChREBP in Form einer Translokation in den Nucleus und einer Zunahme der Proteinmenge hervorruft, wobei beide Effekte schwächer ausgeprägt sind als nach langfristiger Stimulation mit Glucose und (vermutlich) beide im Vergleich zu kurzfristiger Stimulation mit Fructose abgenommen haben. Zusätzlich zu der Möglichkeit einer zunehmenden Hemmung von ChREBP durch Metabolite, die z. B. in der Lipogenese entstanden sind, könnte auch hier der wahrscheinlich gesunkene intra- und extrazelluläre Gehalt an Fructose zur Abschwächung der Aktivierung von ChREBP beitragen.

Im Folgenden soll auf mögliche Folgen einer langfristigen Zufuhr von Fructose eingegangen werden. Aufgrund klinischer Beobachtungen wird vermutet, ein hoher Fructose-Konsum trage zur epidemischen Verbreitung von Übergewicht und metabolischen Erkrankungen wie Insulinresistenz und Fettleber bei [60]. In früheren Zeiten erfolgte die Zufuhr von Fructose eher mäßig, v. a. aus frischem Obst; durch den hohen Zusatz von Fructose, Maissirup/Glucose-Fructose-Sirup und Saccharose in viele Lebensmittel wie Fertigprodukte und Softdrinks und durch erhöhten Verzehr von Früchten und Säften kam es in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten in den industrialisierten Ländern zu einem starken Anstieg des Fructose-Konsums in der Bevölkerung [60]. Gleichzeitig beobachtete man einen ähnlich hohen Anstieg der Inzidenz von Übergewicht und damit assoziierten Erkrankungen und brachte daher eine hohe Fructose-Aufnahme beim Menschen in Verbindung mit der Entwicklung des metabolischen Syndroms, das u. a. Übergewicht, Hypertriglyceridämie und Insulinresistenz beinhaltet und die Entstehung von NAFLD begünstigt [3, 60, 61]. Auch in vielen Tierstudien – mit Ratten, Hamstern, Hunden, Mäusen – führte ein hoher Fructose-Anteil der Nahrung zu ähnlichen Symptomen [3, 60-63]. Für diese Wirkungen von Fructose wird eine im Vergleich zu Glucose besonders starke Induktion der Lipogenese vermutet. Einige Überlegungen, wie es dazu kommen könnte, sollen hier erläutert werden.

Der Metabolismus von Fructose unterscheidet sich in einigen Punkten vom Metabolismus von Glucose; u. a. stehen weniger Stoffwechselwege zur Verfügung, da Glycogensynthese und PPP nur über Umwege zu erreichen sind [61]. Die durch den Abbau von Fructose in der Leber entstehenden Metabolite, Fructose-6-Phosphat und Glycerol-3-Phosphat, werden, wie in Abschnitt 1.1.4.4.2 angesprochen, anscheinend am häufigsten in die Glycolyse eingeschleust. Das in der Glycolyse entstehende Acetyl-CoA wird entweder über Citratzyklus und Atmungskette zur Energiegewinnung genutzt oder dient als Substrat für andere Stoffwechselwege, hauptsächlich

Diskussion

für die Lipogenese [60]. Weiterhin könnten die beim Abbau von Fructose entstehenden Triosen auch zu Glycerol umgebaut werden und dadurch zur Synthese von TAG dienen. Für Glucose existieren Abbaumöglichkeiten, welche Glycolyse und Lipogenese umgehen: Die Synthese von Glycogen sowie der Abbau von Glucose im PPP. Fructose kann diese Stoffwechselwege über Umwege erreichen, wird anscheinend aber weniger oft dafür verwendet [60]. Hierzu müssten Fructose-6-Phosphat und Glycerinal-3-Phosphat, die durch den Abbau von Fructose entstandenen Metabolite, anstelle ihres Abbaus in der Glycolyse über Teilschritte der Gluconeogenese in G6P umgewandelt werden, welches als Ausgangssubstrat für die Glycogensynthese oder den PPP dient. (Es wäre prinzipiell durchaus vorstellbar, dass die durch Abbau von Fructose entstehenden Metabolite für die Gluconeogenese genutzt werden, weil Fructose keine Ausschüttung von Insulin nach sich zieht und die Zellen sich daher nicht unbedingt in einer anabolen Stoffwechsellage befinden, die eine Gluconeogenese verhindern würde [60, 62].) Aus Fructose entstandenes Glycerinal-3-Phosphat könnte außerdem auch direkt im PPP metabolisiert werden, wie in Abschnitt 1.1.4.4.2 erörtert wurde.

Im Gegensatz zu Fructose wird der Glucose-Stoffwechsel durch Phosphofruktokinase I (PFK I), das Schrittmacherenzym der Glycolyse, gesteuert, dessen Aktivität durch viele Faktoren – z. B. Fructose-2,6-Bisphosphat – reguliert wird und sich dadurch dem Stoffwechsel der Zelle anpasst. So könnte im Fall von Glucose die Glycolyse – und in der Folge die Lipogenese – bei entsprechender Stoffwechsellage der Zelle durch Einflussnahme auf PFK I reduziert werden. Der Fructose-Stoffwechsel hingegen erfährt höchstens eine geringe Regulation durch die PFK I, da die Metabolite von Fructose z. T. „unterhalb“ dieses Enzyms, auf dem Triose-Level, in die Glycolyse eingeschleust werden [61]. Dadurch kann es im Fall von Fructose auch dann zum Abbau der Triosen und zur Synthese von Fettsäuren und TAG kommen, wenn der Abbau von Glucose in der Glycolyse durch Inhibierung von PFK I gehemmt wird.

Des Weiteren induziert Fructose ein etwas anderes Gen-Expressionsprofil als Glucose [61]. Fructose induziert u. a. Enzyme des Fructose-Metabolismus, der Glycolyse – darunter PFK I –, der Gluconeogenese und der Lipogenese sowie die Transkriptionsfaktoren SREBP-1c und ChREBP [61]. Eine Studie berichtet, Fructose induziere viele dieser Enzyme sowie SREBP-1c und ChREBP stärker als Glucose und führe dadurch in besonders hohem Maße zur Lipogenese [61]. Außerdem erhöhe Fructose die Aktivität von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD), welche das Schlüsselenzym des oxidativen, irreversiblen Teils des PPP darstellt, und könne so über die Bildung von X5P die Aktivität von ChREBP steigern [61].

Darüber hinaus soll Fructose, im Vergleich zu Glucose, kaum zur Einstellung eines Sättigungsgefühles führen. Dies könnte über zwei Mechanismen zustande kommen. Nach der sogenannten

Diskussion

glucostatischen Theorie entsteht ein Sättigungsgefühl durch eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels; Sensoren zur Messung der Glucose-Konzentration im Blut (Glucosensoren) werden u. a. im Hypothalamus und im Stammhirn vermutet [136]. Fructose dürfte den Blutzuckerspiegel eigentlich nur in geringem Umfang erhöhen, wenn nämlich Fructose-Metabolite über Schritte der Gluconeogenese in Glucose umgewandelt werden. Eine Reaktion der Glucosensoren auf Fructose ist nicht bekannt. Außerdem führt Fructose, im Gegensatz zu Glucose, nicht zur Sekretion von Insulin; es wird unabhängig von Insulin in Muskel- und Fettzellen aufgenommen und metabolisiert. Insulin soll zu einer Steigerung der Aufnahme von Tryptophan ins Gehirn und dadurch zu einer erhöhten Synthese von Serotonin führen; Serotonin wiederum bewirkt, vor allem im Hypothalamus, die Generierung von Sättigungssignalen [137]. Aufgrund der fehlenden Aktivierung von Glucosensoren durch Fructose sowie der fehlenden Sekretion des (sättigenden) Hormons Insulin könnte es sein, dass Fructose kein oder nur ein geringes Sättigungsgefühl hervorruft und dadurch zu weiterer Nahrungs- und Energieaufnahme mit deren Konsequenzen führt.

Die eingeschränkte Auswahl an alternativen Stoffwechselwegen, die mangelnde Regulation von Fructose über die PFK I, das andere Gen-Expressionsprofil als bei Glucose sowie die fehlende Erzeugung eines Sättigungsgefühls könnten Ursachen dafür darstellen, dass es nach Aufnahme von Fructose scheinbar zu einer stärkeren Lipogenese kommt als nach Aufnahme von Glucose. Die in der Lipogenese entstehenden Fettsäuren und daraus synthetisierten TAG könnten als VLDL ins Blut abgegeben werden und zur Hypertriglyceridämie führen; sie könnten auch im Fettgewebe gespeichert werden und zur Entwicklung von Übergewicht beitragen, welches langfristig eine Insulinresistenz nach sich ziehen kann. Wenn die Pufferfunktion des Fettgewebes nicht mehr ausreicht und/oder durch periphere Insulinresistenz eine Lipolyse hervorgerufen wird, gelangen Fettsäuren und TAG verstärkt ins Blut und können in der Folge in anderen Organen akkumulieren, v. a. in der Leber, wo sie zu NAFLD und hepatischer Insulinresistenz beitragen können (siehe Abschnitt 1.2.2). Zusätzlich wird für Fructose die Induktion einer chronischen hepatischen Inflammation und eine direkte Störung des Insulinsignalwegs beschrieben [60].

Im Gegensatz zu anderen Studien [61, 63] wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein geringerer Einfluss von Fructose auf die Translokation von ChREBP in den Kern sowie ein geringerer Proteingehalt von ChREBP als nach Stimulation mit Glucose beobachtet. Diese Diskrepanz könnte eventuell damit zusammenhängen, dass es sich in der vorliegenden Arbeit um eine Studie mit humanen Hep G2-Zellen und einen relativ kurzzeitigen Einfluss von Fructose handelt, bei den zitierten Studien hingegen um teilweise langfristig angelegte tierexperimentelle Studien. Möglicherweise führt Fructose erst bei einer längeren, über 24 Stunden hinausgehenden Expositionsdauer zu einer verstärkten Aktivierung von ChREBP. Die in der Literatur beschriebene starke

Diskussion

Erhöhung der Lipogenese nach Fructose könnte auch durch eine Steigerung der ChREBP-Aktivität über andere, hier nicht beobachtete Wege erfolgen, z. B. über das Glucose-sensing-module. Es könnte aber auch sein, dass Fructose ihre postulierte stark lipogene Wirkung nicht so sehr über ChREBP entfaltet, sondern durch die Aktivierung von anderen Transkriptionsfaktoren wie z. B. SREBP-1c oder über weitere in die Lipogenese involvierte Enzyme und Faktoren, von denen einige oben beschrieben wurden. Auf jeden Fall sollte aufgrund der klinischen Beobachtungen, die einen Zusammenhang zwischen Fructose und metabolischem Syndrom vermuten lassen, der Einfluss von Fructose auf ChREBP genauer untersucht werden.

4.2.2.2 mRNA-Ebene

Nach 24stündiger Stimulation mit Fructose kam es in den Hep G2-Zellen, verglichen mit der Kontrolle, zu einer Reduktion der ChREBP-mRNA, die ungefähr genauso stark ausgeprägt war wie die Reduktion der mRNA durch Glucose im analogen Experiment. Diese Reduktion nach 24 Stunden steht, ebenfalls wie bei Glucose, im Gegensatz zu der gesteigerten mRNA-Menge nach vier Stunden Stimulation. Sowohl für Glucose als auch für Fructose könnte man daher vermuten, dass zunächst eine Steigerung der Transkription von ChREBP stattfindet, begleitet von einer Akkumulation von Metaboliten aus den induzierten Stoffwechselwegen wie der Lipogenese, und dass bei langfristiger Stimulation eine Gegenregulation einsetzt und es zur Hemmung der Transkription von ChREBP und zum Abbau der mRNA kommt. Alternativ könnte wiederum der durch den Fructose-Verbrauch vermutlich reduzierte intra- und extrazelluläre Gehalt an Fructose die geringere mRNA-Menge erklären. Die immer noch erhöhte Proteinmenge von ChREBP nach 24 Stunden könnte darauf hinweisen, dass der Abbau der Proteine langsamer verläuft als der Abbau der mRNA und die Hemmung der Transkription.

4.3 Effekte von Glucagon auf ChREBP

4.3.1 Kurzzeit-Einfluss (zwei bzw. vier Stunden)

4.3.1.1 Proteinebene (zwei Stunden)

Die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zeigen folgendes Bild: In den Hauptversuchen mit 50 nmol/l Glucagon war nach zwei Stunden ein deutlicher Anstieg von ChREBP im Nucleus auf ca. 239 %, also eine gesteigerte Translokation in den Kern, zu beobachten; dabei veränderte sich die Konzentration von ChREBP im Cytosol so gut wie nicht (ca. 99 % der Kontrolle), sodass der Gesamtproteingehalt der Zelle als erhöht angesehen werden kann. Außer einer Translokation müssen daher auch eine gesteigerte Transkription und Neusynthese von ChREBP stattgefunden haben – dies wird durch den erhöhten mRNA-Gehalt (siehe

Diskussion

unten) bestätigt. Die nucleäre Translokation von ChREBP war nach Glucagon nicht so stark gesteigert wie nach Glucose (ca. 391 % der Kontrolle). Insgesamt scheint Glucagon hier also sowohl die Transkription und Proteinsynthese als auch die Translokation von ChREBP in den Kern zu erhöhen; eine gesteigerte Aktivität des ChREBP-Proteins wird dadurch ebenfalls wahrscheinlich. Dies sind eher überraschende Ergebnisse, da in der Literatur eine Hemmung von Transkription, Translokation und Aktivität von ChREBP durch Glucagon beschrieben wird. Auch die physiologische Rolle von Glucagon hätte eher für eine Hemmung von ChREBP gesprochen, da Glucagon als kataboles Hormon in der Leber Glycolyse und Lipogenese inhibiert und Gluconeogenese und Lipolyse stimuliert. Für die Korrektheit der in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse sprechen mehrere Punkte: Die Ergebnisse der Proteinebene nach kurzzeitiger Stimulation mit Glucagon korrelieren sowohl mit den Ergebnissen der mRNA-Ebene nach kurzzeitiger Stimulation als auch mit denen der Proteinebene nach Langzeit-Stimulation (siehe unten). Außerdem sind die Ergebnisse gegenläufig zu den nach Stimulation mit Insulin beobachteten Ergebnissen der Protein- und mRNA-Ebene, und eine Gegenläufigkeit von Insulin und Glucagon erscheint unter physiologischen Gesichtspunkten plausibel, weil diese Hormone funktionelle Antagonisten darstellen. Im Folgenden sollen Möglichkeiten diskutiert werden, die die Diskrepanz zwischen den hier gewonnenen Ergebnissen und der Erwartungshaltung erklären könnten.

In der Einleitung, Abschnitt 1.1.4.4.9, wurden die Mechanismen geschildert, über die einige Studien eine Hemmung der DNA-Bindung und Translokation ins Cytosol von endogenem ChREBP durch Glucagon postulieren – Erhöhung von cAMP, Aktivierung der PKA und Phosphorylierung von ChREBP an P1 und P3 [6, 18, 20, 26, 36, 47, 122]. Zunächst sollte erwähnt werden, dass diese Studien sich nur auf murines ChREBP beziehen und keine Studie über Einflüsse von Glucagon auf humanes ChREBP gefunden wurde, sodass eine unterschiedliche Regulation beim Menschen grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden kann. Die meisten dieser Studien berichten außerdem nur indirekt über eine Hemmung von ChREBP durch Glucagon, indem sie den Schluss ziehen, Glucagon führe zur Erhöhung von cAMP, das über die PKA eine Phosphorylierung und Inaktivierung von ChREBP bewirke, und daher müsse Glucagon ChREBP inhibieren. Nur in einer *in vivo*-Studie mit Mäusen wurde der Effekt einer Injektion von Glucagon auf die subzelluläre Lokalisation von ChREBP in Leberzellen direkt beobachtet [26].

Unter der Annahme, ChREBP werde durch Glucagon inhibiert, wie es in den erwähnten Studien interpretiert wurde, lassen sich mehrere Erklärungsmodelle für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnisse finden. Z. B. könnte das zugesetzte Glucagon in den Hep G2-Zellen zunächst eine Inhibition von ChREBP bewirken, gleichzeitig aber auch durch Förderung von Gluconeogenese und Glycogenolyse sowie Hemmung von Glycolyse und Glycogensynthese eine

Diskussion

gesteigerte Glucoseproduktion in Gang setzen. Die neu produzierte Glucose würde wahrscheinlich teilweise zunächst in den Zellen bleiben und teilweise von den Zellen in die umgebende Mediumflüssigkeit abgegeben, da die Zellkulturzellen vermutlich grundsätzlich ähnlich wie Leberzellen im Organismus reagieren, welche die neu synthetisierte Glucose ins Blut bzw. in die Umgebung sezernieren würden. Dadurch stiege im weiteren Verlauf des Experimentes der Glucosegehalt in den Zellen und in der Mediumflüssigkeit immer weiter an, und die Glucose würde schließlich, bei nachlassender Wirkung von Glucagon, zu einer Stimulation der Hep G2-Zellen führen – und somit zu der beobachteten Transkription und nucleären Translokation von ChREBP. Im Organismus käme es nach Stimulation mit Glucagon wohl nicht zu einer derartigen Akkumulation von Glucose in der Umgebung der Leberzellen; die intrazelluläre Glucosekonzentration wäre vermutlich zunächst ebenfalls erhöht, aber ein großer Teil der neu synthetisierten Glucose würde wahrscheinlich bald durch den Blutkreislauf abtransportiert und an andere Gewebe geliefert. Entsprechend dürfte der hier beobachtete Effekt bei in vivo-Experimenten theoretisch nur in abgeschwächtem Ausmaß auftreten.

Die erwähnte Reduktion der Wirkung von Glucagon könnte schon relativ kurze Zeit nach Zugabe des Glucagons zu den Zellen auftreten, da Glucagon im Organismus größtenteils durch die Leber abgebaut wird und im Blut eine Halbwertszeit von ungefähr drei bis sechs Minuten besitzt. Bei den Zellkultur-Experimenten wäre eventuell ein etwas langsamerer Abbau zu erwarten; spätestens zum Zeitpunkt der Proteinextraktion nach zwei Stunden sollte das Glucagon aber vollständig abgebaut sein. Durch das sinkende Glucagon würde der angenommene hemmende Effekt auf ChREBP sich immer stärker abschwächen. Leider wurden die hier beschriebenen Hypothesen erst später aufgestellt und konnten nicht mehr mittels Messung des Glucose- und Glucagon-Gehaltes in der Mediumflüssigkeit am Ende der Stimulationszeit überprüft werden. Um den hier postulierten Effekten zuvorzukommen, wären außerdem Experimente mit kürzeren Stimulationszeiten als zwei Stunden wünschenswert gewesen. Insgesamt könnte die Hypothese eines gesteigerten Glucose- und gesunkenen Glucagon-Gehaltes eine mögliche Erklärung für die hier beobachtete nucleäre Translokation von ChREBP nach Stimulation mit Glucagon liefern.

Eine andere Theorie zur Erklärung einer Stimulation von ChREBP durch Glucagon wäre, dass es möglicherweise zu den mittel- bis langfristigen Wirkungen von Glucagon gehört, für zukünftige Stress-Situationen Energiereserven in Form von Fettsäuren bzw. TAG aufzubauen. Kurzfristig werden durch Glucagon Energiereserven mobilisiert; eine Auffüllung dieser Reserven könnte daher vielleicht zu den langfristigen Aufgaben von Glucagon gehören. Unter dieser Annahme würde Glucagon nach einer akuten Hemmung von ChREBP im weiteren Verlauf eventuell eine Aktivierung von ChREBP bewirken. Zur Überprüfung dieser Theorie müsste der genaue zeitli-

Diskussion

che Verlauf der Wirkung von Glucagon auf ChREBP untersucht werden.

Weiterhin wäre es theoretisch möglich, dass Glucagon ChREBP zwar aktiviert, gleichzeitig aber andere Stoffwechselwege in Gang setzt, die insgesamt zu einer Abnahme von Glycolyse und Lipogenese führen und die Wirkung auf ChREBP damit überlagern. Allerdings erscheint diese Annahme in physiologischem Sinne eher weniger wahrscheinlich, weil normalerweise eine relativ einheitliche anabole oder katabole Stoffwechselsituation hergestellt wird. Eine andere Theorie könnte diejenige sein, dass Glucagon zwar die Translokation von ChREBP in den Kern und die Transkription, aber nicht die Aktivität von ChREBP erhöht, z. B. aufgrund eines mangelnden Einflusses auf das GSM. Bei ersterem Modell ließe sich eventuell ein Einfluss von Glucagon auf ChREBP-spezifische Zielgene nachweisen, beim zweiten nicht.

Außerdem könnte möglicherweise eine Besonderheit der hier verwendeten Zell-Linie vorliegen, die zu einem veränderten Ansprechen der Zellen auf Glucagon führt. Dies wäre in Erwägung zu ziehen, da einige Studien z. B. auch ein verändertes Ansprechen von Hep G2-Zellen auf Glucose postulieren, was durch geringere Expression von Glucokinase zustande kommen soll [19, 26].

Insgesamt wären zukünftig also weitere Experimente wünschenswert, die u. a. Messungen der Glucose- und Glucagon-Konzentration in der Mediumflüssigkeit am Ende der Stimulation, verschiedene kürzere Stimulationszeiten und die Untersuchung der Aktivität der Zielgene von ChREBP beinhalten sollten.

4.3.1.2 mRNA-Ebene (vier Stunden)

Eine Stimulation mit Glucagon führte hier nach vier Stunden zu einem statistisch signifikanten Anstieg der mRNA von ChREBP auf ca. 152 % der Kontrolle. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen auf der Proteinebene, die für zweistündige Stimulation mit Glucagon eine Steigerung der Proteinmenge von ChREBP zeigen. In diesem Experiment wurde ein stärkerer Anstieg der Proteinmenge nach zwei Stunden – auf ca. 239 % der Kontrolle – als der mRNA-Menge nach vier Stunden – auf ca. 152 % – gesehen, was eine zusätzlich gesteigerte Translation der mRNA vermuten lässt. Der Anstieg der mRNA korreliert ebenfalls mit dem Proteingehalt nach 24 Stunden, für den ein Anstieg auf 244 % beobachtet wurde. Da von der nach vier Stunden vorhandenen mRNA erst durch den Prozess der Translation Proteine entstehen können, wirkt sich der Anstieg der mRNA erst verzögert auf die Proteinmenge aus und lässt sich daher v. a. mit dem Proteingehalt zu diesem späteren Zeitpunkt vergleichen.

Die Steigerung der Transkription von ChREBP durch Glucagon entspricht nicht der ursprünglichen Erwartung, Glucagon rufe eine Hemmung von ChREBP hervor. Obgleich in der Literatur kein expliziter Einfluss von Glucagon auf die Transkription von ChREBP beschrieben wurde,

Diskussion

wäre doch zu erwarten gewesen, dass Glucagon als kataboles Hormon die Glycolyse und Lipogenese und somit auch ChREBP auf der Transkriptionsebene hemmen würde.

Zur Interpretation der hier beobachteten Ergebnisse sei auf die in Abschnitt 4.3.1.1 beschriebenen Erklärungsmodelle verwiesen.

4.3.2 Langzeit-Einfluss (24 Stunden)

4.3.2.1 Proteinebene

Nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden mit 50 nmol/l Glucagon war in den Hep G2-Zellen sowohl im Cytosol (159 % der Kontrolle) als auch im Nucleus (244 % der Kontrolle) ein Anstieg der Konzentration des ChREBP-Proteins zu beobachten. Auch im Vorversuch wurde bei Stimulation mit 67 nmol/l Glucagon über 20 Stunden ein Anstieg der Gesamtproteinmenge von ChREBP gesehen. Es ist daher von einer vermehrten Neusynthese des ChREBP-Proteins nach langfristiger Stimulation mit Glucagon auszugehen. Außerdem deutet der im Vergleich zur Kontrolle höhere Anteil von ChREBP im Nucleus auf eine immer noch bestehende nucleäre Translokation von ChREBP hin. Der Anstieg von ChREBP-Protein im Cytosol im Vergleich zu zwei Stunden könnte auf eine inzwischen begonnene Abschwächung des Aktivierungsprozesses von ChREBP hinweisen, da hier die Translokation von ChREBP ins Cytosol im Verhältnis zur Translokation in den Nucleus zugenommen hat. Der Anstieg im Cytosol könnte auch durch neu synthetisierte und noch nicht in den Kern transportierte ChREBP-Proteine zustande kommen. Die erwähnte Abschwächung der Aktivierung von ChREBP könnte eine Gegenregulation der Zellen als Reaktion auf durch Glucagon (– oder durch Glucose, siehe unten –) entstandene Stoffwechselprodukte darstellen; sie könnte aber auch, bei angenommener aktivierender Wirkung von Glucagon auf ChREBP, durch eine sinkende Konzentration von Glucagon infolge des mit der Zeit fortschreitenden Glucagon-Abbaus zu erklären sein.

Wie bei den Ergebnissen der kurzfristigen Stimulation mit Glucagon sind auch die Ergebnisse nach Langzeit-Stimulation eher überraschend, da zunächst von einer Hemmung von ChREBP durch Glucagon ausgegangen wurde. Zur Interpretation der Ergebnisse sei auf die unter Abschnitt 4.3.1.1 vorgestellten Erklärungsmodelle verwiesen. Herausgegriffen seien an dieser Stelle drei der dort beschriebenen Theorien. Die hier bei der langen Stimulationszeit von 24 Stunden beobachteten Ergebnisse, die den Ergebnissen der analogen Experimente mit Glucose ähneln, könnten die Vermutung erhärten, Glucagon wirke zunächst hemmend auf ChREBP, lasse mit der Zeit aber den Glucose-Gehalt in den Zellen und in der Mediumflüssigkeit durch Induktion der Gluconeogenese ansteigen, und die entstandene Glucose führe schließlich zur Induktion von ChREBP. Ähnliches gilt für die Vermutung, es komme mit der Zeit zu einem Abbau von Gluca-

gon, der (erst recht) nach 24 Stunden vollständig abgeschlossen sein dürfte. Auch die oben genannte Theorie, zu den mittel- bis langfristigen Wirkungen von Glucagon könne der Aufbau von Energiereserven durch Induktion der Lipogenese gehören, wird durch die hier bei langer Stimulationsdauer gewonnenen Ergebnisse unterstützt.

4.3.2.2 mRNA-Ebene

Nach 24 Stunden Stimulation mit Glucagon war die Menge der mRNA von ChREBP in den Zellen auf ca. 89 % der Kontrolle abgefallen. Zum Vergleich hatte sich nach vier Stunden eine Zunahme der mRNA auf etwa 152 % der Kontrolle ergeben. Im Gegensatz zu der gesunkenen mRNA-Menge steht die bereits diskutierte Zunahme der Konzentration des ChREBP-Proteins in der Zelle, was insgesamt zeigt, dass temporär eine Steigerung der Transkriptionsrate stattgefunden haben muss, die inzwischen jedoch zurückgegangen ist, während die Proteine noch nicht abgebaut sind. Nimmt man eine aktivierende Wirkung von Glucagon auf ChREBP an, so könnte der Rückgang der mRNA durch den vermutlich gesunkenen Glucagon-Gehalt in Zellen und Medium verursacht sein; er könnte aber auch eine Gegenregulation der Zellen als Reaktion auf durch Glucagon und ChREBP eingeleitete Stoffwechselprozesse darstellen. Wenn man, wie oben beschrieben, einen Anstieg der Glucose-Produktion durch Glucagon und eine dadurch stimulierende Wirkung auf ChREBP voraussetzt, könnte das Absinken der mRNA durch ähnliche Mechanismen wie nach langfristiger Stimulation mit Glucose verursacht sein, z. B. durch einen inzwischen gesunkenen intra- und extrazellulären Glucose-Gehalt und/oder eine durch Glucose und lang anhaltende Aktivierung von ChREBP verursachte Gegenregulation.

4.4 Effekte von Insulin auf ChREBP

4.4.1 Kurzzeit-Einfluss (zwei bzw. vier Stunden)

4.4.1.1 Proteinebene (zwei Stunden)

Der Einfluss von Insulin auf die Proteinebene von ChREBP wurde nur in den Vorversuchen untersucht, daher können hier nur tendenzielle Aussagen gemacht werden. Es kam nach Insulingabe zu einem starken Anstieg von ChREBP im Cytosol auf ca. 315 % der Kontrolle und zu einem Abfall im Nucleus auf ca. 61 %, insgesamt also zu einer deutlichen Translokation von ChREBP ins Cytosol; das spricht für eine Inaktivierung von ChREBP. Der gesamte Proteingehalt kann hier nicht direkt beurteilt werden, aber die nach vier Stunden Stimulation mit Insulin abgesunkene mRNA ließe eine Reduktion des Proteingehaltes vermuten.

Weil Insulin und ChREBP ähnliche physiologische Ziele haben, Glycolyse und Lipogenese, und weil Insulin überdies LXR und SREBP-1c aktiviert, die beide eine Stimulation von ChREBP

Diskussion

bewirken sollen, wäre eher eine Aktivierung von ChREBP durch Insulin erwartet worden als eine Translokation ins Cytosol. Da mit Hepatocyten experimentiert wurde, die den insulinunabhängigen Glucose-Transporter GLUT2 exprimieren, hätte Insulin zwar nicht die Glucose-Aufnahme in diese Zellen erleichtern oder beschleunigen können – und darüber die Aktivierung von ChREBP fördern können –, aber im Rahmen der für Insulin postulierten Induktion von Glycolyse und Lipogenese wäre – z. B. über SREBP-1c, siehe unten – eine Aktivierung von ChREBP zu vermuten gewesen.

In der Literatur wurde ein direkter Einfluss von Insulin auf ChREBP nur auf dessen Expression beschrieben (siehe Abschnitte 1.1.4.4.3 und 4.4.1.2). Indirekte Einflüsse von Insulin auf die Aktivität von ChREBP werden über die Transkriptionsfaktoren LXR und SREBP-1c vermittelt. Insulin steigert Aktivität und Expression von LXR, und LXR stimuliert vermutlich die Transkription von ChREBP, aber anscheinend kaum dessen Translokation in den Nucleus und funktionelle Aktivität. Insulin und LXR aktivieren SREBP-1c, das über die Stimulation der GK eine Aktivierung von Glycolyse und PPP bewirkt und damit letztendlich zur Bildung von X5P und zu Dephosphorylierung, Translokation in den Nucleus und Aktivierung von ChREBP führen soll.

Um die Diskrepanz zwischen Ergebnissen und Erwartungshaltung zu erklären, entstanden die folgenden Modelle.

Ähnlich dem für die Aktivierung von ChREBP durch Glucagon unter Abschnitt 4.3.1.1 vorgestellten Erklärungsansatz könnten durch Insulin zunächst LXR und SREBP-1c und deren Zielgene aktiviert werden, und möglicherweise käme es auch zu einer Induktion und Aktivierung von ChREBP – wobei sich die Zielgene von ChREBP, LXR und SREBP-1c überschneiden, wie in Abschnitt 1.1.3 erläutert wurde. Aufgrund der Stimulation der für Insulin charakteristischen Stoffwechselwege, also Glycolyse, Glycogensynthese und Lipogenese – eventuell teilweise über ChREBP vermittelt –, käme es im weiteren Verlauf einerseits zum Abbau der Glucose in der Glycolyse und Glycogensynthese und andererseits zur Entstehung von Stoffwechselprodukten wie z. B. Fettsäuren. Der erste Effekt, der Abbau von Glucose, könnte nach und nach zu einem Verbrauch der Glucose in den Zellen und in der Mediumflüssigkeit führen, sodass es nach einer bestimmten Stimulationszeit zu einem Glucosemangel käme; anders als im Organismus würde hier natürlich keine weitere Glucose mit dem Blutkreislauf zugeführt werden können. Der zweite Effekt, die Entstehung von Fettsäuren durch die induzierte Lipogenese, könnte über die Aktivierung von AMPK zur Phosphorylierung und damit Hemmung von ChREBP führen, wie in Abschnitt 1.1.4.4.10 geschildert wurde. Allerdings ist eine Hemmung von ChREBP durch gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren, wie sie in der Lipogenese zunächst entstehen würden, umstritten; einige Studien sprechen für eine solche Hemmung [53, 57, 67], andere dagegen [123].

Diskussion

Zusätzlich könnten die im Laufe des Experimentes entstandenen Metabolite eventuell auch SREBP-1c inhibieren und so dessen indirekte Aktivierung von ChREBP verhindern. Diese zwei Effekte, der Glucosemangel und die Entstehung von Metaboliten wie Fettsäuren, könnten also eine Hemmung von ChREBP hervorrufen. Dadurch käme es zur Translokation von ChREBP aus dem Nucleus ins Cytosol und zur Hemmung der Transkription. Der Zeitraum, in dem es von einer eventuellen Aktivierung von ChREBP zu einer Hemmung kommt, müsste angesichts der Western Blot-Ergebnisse mit unter zwei Stunden angenommen werden.

Außerdem würde das eingesetzte Insulin mit der Zeit vermutlich abgebaut werden – die physiologische Halbwertszeit von Insulin beträgt im Blut etwa fünf Minuten, wobei es zum Teil durch die Leber und zum Teil nach Aufnahme in andere Zielzellen degradiert wird. Auch wenn der Abbau des Insulins bei den Zellkultur-Experimenten länger dauern würde, wäre das Insulin vermutlich am Ende der Stimulationszeit von zwei Stunden und spätestens nach vier oder 24 Stunden vollständig abgebaut, sodass der postulierte anfangs aktivierende Einfluss von Insulin auf ChREBP immer mehr verloren ginge. Leider wurden in diesen Experimenten Glucose- und Insulingehalt der Mediumflüssigkeit am Ende der Stimulation nicht untersucht. In zukünftigen Experimenten sollten diese Messungen vorgenommen und zusätzlich auch kürzere Stimulationszeiten gewählt werden, um eventuelle frühe Effekte von Insulin erfassen zu können.

Im Organismus liegen Glucose und Insulin physiologischerweise gleichzeitig vor, da es bei erhöhtem Blutzuckerspiegel beim Gesunden reaktiv zu erhöhter Insulinsekretion kommt. Sollte ChREBP also durch Insulin tatsächlich gehemmt werden, würde das in vivo durch die Glucose vermutlich zu einem großen Teil wieder ausgeglichen.

4.4.1.2 mRNA-Ebene (vier Stunden)

Nach vierstündiger Stimulation der Hep G2-Zellen mit Insulin kam es zu einem Abfall der mRNA von ChREBP auf ca. 75 %. Das weist auf eine Hemmung der Transkription von ChREBP durch Insulin hin. Dieses Ergebnis korreliert sowohl mit den Ergebnissen der Proteinebene, die nach Insulingabe eine Translokation von ChREBP ins Cytosol und somit vermutlich eine Inaktivierung von ChREBP zeigen, als auch mit der Beobachtung einer starken Reduktion der mRNA von ChREBP nach 24 Stunden Stimulation mit Insulin. Für die Korrektheit der beobachteten Ergebnisse spricht außerdem die Gegenläufigkeit der Ergebnisse nach Insulin-Stimulation im Vergleich zu denjenigen nach Glucagon-Stimulation. Eine Inaktivierung von ChREBP durch Insulin und eine Aktivierung durch Glucagon würden hinsichtlich des funktionellen Antagonismus von Insulin und Glucagon im Organismus zueinander passen.

Allerdings wäre aufgrund der physiologischen Rolle von Insulin eher eine Steigerung der Tran-

skription von ChREBP durch Insulin erwartet worden. Hinzu kommt, dass in der Literatur sowohl über eine direkte Stimulation der Transkription von ChREBP durch Insulin berichtet wurde – die durch die Reduktion der Expression von „Octamer transcription factor-1“ (Oct-1) zustande kommen soll [65] – als auch über eine indirekte Stimulation der Transkription, die einerseits durch LXR [25, 26], andererseits eventuell auch durch SREBP-1c vermittelt werden soll [103]. Zur Interpretation der hier vorgestellten Ergebnisse sei auf Abschnitt 4.4.1.1 verwiesen.

4.4.2 Langzeit-Einfluss (24 Stunden)

4.4.2.1 mRNA-Ebene

24stündige Stimulation der Zellen mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Insulin führte zu einer deutlichen, statistisch signifikanten Reduktion der mRNA von ChREBP auf ca. 55 % der Kontrolle; somit war die Reduktion der mRNA noch stärker ausgeprägt als diejenige nach vier Stunden (auf ca. 75 %).

Dieses Ergebnis zeigt eine langfristige Herunterregulation der Expression von ChREBP nach Stimulation mit Insulin. Demnach würde Insulin also nicht nur akute, sondern auch lang andauernde Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel haben. Es sollten aber auch die in Abschnitt 4.4.1.1 genannten Erklärungsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden; denn gerade die lange Stimulationszeit von 24 Stunden würde z. B. erstens für einen zunehmenden Glucosemangel der Zellen sprechen, der durch den normalen Verbrauch der Zellen entsteht und zusätzlich durch die Insulingabe verstärkt wird, zweitens für den Abbau von Insulin aufgrund von dessen relativ kurzer Halbwertszeit und drittens für eine Beeinflussung von ChREBP durch inzwischen entstandene Metabolite, die aus von Insulin und eventuell von ChREBP aktivierten Stoffwechselwegen stammen.

4.5 Effekte von Fettsäuren auf ChREBP

Ein Einfluss von Fettsäuren auf ChREBP wurde nur in den Vorversuchen und nur für die Proteinebene untersucht; die Ergebnisse können daher nur als Tendenzen betrachtet werden. Es wurden die Effekte der gesättigten Palmitinsäure (16:0) bei Stimulation über zwei Stunden und der einfach ungesättigten Ölsäure (18:1) bei Stimulation über 20 Stunden beobachtet.

4.5.1 Kurzzeit-Einfluss (zwei Stunden)

4.5.1.1 Proteinebene, Palmitinsäure

Nach Stimulation mit Palmitinsäure blieb die Konzentration an ChREBP-Protein im Cytosol ungefähr gleich, während es im Nucleus zu einer Abnahme von ChREBP auf ca. 65 % der Kontrolle kam. Das könnte durch eine Translokation von ChREBP aus dem Nucleus ins Cytosol und

Diskussion

einen Protein-Abbau erklärt werden. Diese Annahme spräche also für eine hemmende Wirkung von Palmitinsäure auf ChREBP.

Wie in Abschnitt 1.1.4.4.10 beschrieben wurde, führen nach Aussage mehrerer Studien gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren über eine Erhöhung der AMP-Konzentration zur Aktivierung der AMPK, zur Phosphorylierung von ChREBP an P4 und zur Hemmung der DNA-Bindungsfähigkeit und Transkriptionsaktivität [35, 53, 57]. Andere Studien bestreiten einen Einfluss von gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren auf ChREBP [80, 123]. Allerdings wurde in den zuerst erwähnten Studien nur ein Einfluss dieser Fettsäuren auf die Transkriptionsaktivität von ChREBP beschrieben und kein Einfluss auf die Translokation von ChREBP oder die Expression des ChREBP-Gens erwähnt. PUFAs sollen auf zusätzlichen Wegen zur Hemmung von ChREBP führen, z. B. über einen Abbau der ChREBP-mRNA und eine Hemmung der Translokation in den Nucleus. Die hier beobachteten Ergebnisse sprechen dafür, dass eventuell auch gesättigte Fettsäuren, z. B. Palmitinsäure, ChREBP auf ähnlichen Wegen wie PUFAs hemmen könnten, also neben einer Reduktion der Transkriptionsaktivität durch AMPK eventuell auch eine Hemmung des Transports in den Kern und einen Abbau von mRNA und/oder Proteinen initiieren. Möglicherweise wären die beobachteten Effekte bei PUFAs stärker ausgeprägt gewesen. Da Fettsäuren nur in den Vorversuchen untersucht wurden, müssten für eine genaue Interpretation dieser Ergebnisse weitere Experimente erfolgen.

4.5.2 Langzeit-Einfluss (20 Stunden)

4.5.2.1 Proteinebene, Ölsäure

Nach Stimulation mit Ölsäure über 20 Stunden war ein Anstieg des ChREBP-Proteins sowohl im Cytosol als auch, in geringerem Ausmaß, im Nucleus zu verzeichnen. Die Translokation ins Cytosol scheint somit die Translokation in den Nucleus zu überwiegen, was auf einen hemmenden Effekt von Ölsäure auf ChREBP hindeutet. Weiterhin scheint es zu einer gesteigerten Neusynthese von ChREBP gekommen zu sein, die weniger in das Bild einer Hemmung von ChREBP passt. Allerdings wurde der Effekt von Ölsäure nur in den Vorversuchen und nicht systematisch untersucht.

Für Ölsäure als einfach ungesättigte Fettsäure wäre theoretisch eine stärkere Hemmung von ChREBP als durch die gesättigte Palmitinsäure zu erwarten gewesen. Möglicherweise reagiert ChREBP aber auf verschiedene Fettsäuren individuell, und es spielen außer dem Sättigungsgrad der Fettsäuren auch weitere Faktoren wie die Kettenlänge eine Rolle. Zukünftige Experimente sollten den Einfluss einzelner Fettsäuren systematisch untersuchen und versuchen zu klären, ob die bisher nur für PUFAs postulierten Wege einer Hemmung von ChREBP – Translokation ins

Cytosol und mRNA-Abbau – auch durch gesättigte oder einfach ungesättigte Fettsäuren eingeleitet werden.

4.6 Einfluss der Stimulationszeit auf die Regulation von ChREBP

Bei der kurzfristigen Regulation von Transkriptionsfaktoren stehen laut Literaturangaben posttranslationale Mechanismen im Vordergrund. Dazu zählen z. B. Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Mechanismen, Änderungen der subzellulären Lokalisation durch Translokation sowie – u. a. über die Steuerung von Cofaktoren oder Bindungspartnern – die Beeinflussung von DNA-Bindungsaktivität und Transkriptionsaktivität. Die langfristige Regulation betrifft v. a. die Expression des jeweiligen Transkriptionsfaktors und führt über Transkription und Translation zu Änderungen der mRNA- und der Proteinmenge. Transkription und Neusynthese von Proteinen benötigen mehr Zeit als posttranslationale Mechanismen. Für ChREBP werden kurzfristig eine Regulation der Translokation – wahrscheinlich über Phosphorylierungsprozesse –, eine Regulation der DNA-Bindung und Aktivität – durch Phosphorylierung sowie weitere Mechanismen wie das GSM – und langfristig eine Regulation durch Beeinflussung der Transkription angenommen.

In dieser Arbeit ergaben sich Unterschiede zwischen der kurz- und langfristigen Regulation von ChREBP, die diese Annahmen prinzipiell zu bestätigen scheinen. Nach zweistündiger Stimulation mit Glucose oder Fructose war v. a. eine deutliche Translokation von ChREBP vom Cytosol in den Nucleus zu beobachten; der Proteingehalt im Cytosol nahm ab und derjenige im Nucleus zu, sodass für die kurzzeitige Stimulation zunächst eine Verschiebung von bereits vorhandenen Proteinen zu vermuten ist. Auf eine Rolle von Phosphorylierungs-Prozessen deuten, wie in Abschnitt 4.1.1.1 erläutert, die in den Western Blots beobachteten Bandenkonformationen hin. Nach vierstündiger Stimulation wurde eine Zunahme des mRNA-Gehaltes beobachtet; bereits zu diesem Zeitpunkt war es also zur Steigerung der Transkription von ChREBP gekommen. Der mRNA-Gehalt wurde nach vier Stunden bestimmt und nicht schon nach zwei Stunden, weil angenommen wurde, erst nach dieser Zeit könnten Veränderungen der mRNA-Menge deutlich zu beobachten sein. Möglicherweise wäre der Anstieg der mRNA nach zwei Stunden Stimulation noch nicht so ausgeprägt gewesen. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass für die kurzfristige Regulation von ChREBP die Translokation vorhandener Proteine eine große Rolle spielt, aber relativ früh auch schon die Transkription des ChREBP-Gens beeinflusst wird. Aussagen über Änderungen der DNA-Bindungsfähigkeit und der Transkriptionsaktivität, die vermutlich kurzfristig ebenfalls beeinflusst werden, können anhand der durchgeführten Versuche nicht getroffen werden.

Diskussion

Nach 24stündiger Stimulation mit aktivierenden Substanzen war die Proteinmenge von ChREBP im Kern zwar immer noch höher als im Cytosol, im Vergleich zur kurzfristigen Stimulation aber gesunken, während die Proteinmenge im Cytosol angestiegen war. Die Translokation von ChREBP in den Kern hatte sich also abgeschwächt, während die Translokation ins Cytosol zugenommen hatte. Im Gegensatz zur kurzfristigen Stimulation war hier außerdem eine eindeutige Zunahme des gesamten zellulären Proteingehaltes an ChREBP festzustellen, die darauf hinweist, dass seit Stimulationsbeginn eine Neusynthese von ChREBP durch Transkription und Translation stattgefunden haben muss. Zu diesem Zeitpunkt war die mRNA von ChREBP im Vergleich zur kurzfristigen Stimulation und zur Kontrolle wieder abgesunken, sodass nach einer zwischenzeitlichen Steigerung der Transkription, der mRNA- und der Protein-Menge ein Abbau der mRNA bei gleichzeitig noch erhöhter Proteinmenge erfolgt sein muss. Langfristig scheint sich also v. a. die durch vorherige Steigerung der Transkription erhöhte Proteinmenge von ChREBP auf dessen Aktivitätszustand in der Zelle auszuwirken, daneben scheint aber auch hier noch eine Regulation von ChREBP über die Translokation zu bestehen.

Vermutlich beeinflussen verschiedene Faktoren ChREBP nicht auf allen Ebenen gleichermaßen, sondern einige Substanzen beeinflussen stärker die Transkription, andere stärker die Aktivität oder Translokation. Demnach würden sich einige Faktoren eher langfristig, andere eher kurzfristig auf ChREBP auswirken. Da die hier untersuchten Hormone, Glucagon und Insulin, im Körper insbesondere schnelle Reaktionen der Zellen hervorrufen sollen und kurze Halbwertszeiten haben – Glucagon ca. drei bis sechs, Insulin ca. fünf Minuten im Blut –, hätte man vermuten können, dass bei ihnen v. a. die kurzfristige Regulation von ChREBP wichtig ist. Allerdings waren in dieser Arbeit ebenfalls deutliche Langzeit-Effekte von Glucagon und Insulin zu beobachten, sodass sie auch langfristig eine Rolle für die Regulation von ChREBP zu spielen scheinen.

4.7 Vergleich der Housekeeping-Gene Actin und GAPDH

Versuchsweise wurden bei den mRNA-Experimenten über 24 Stunden zwei Housekeeping-Gene getestet, Actin und GAPDH, um herauszufinden, ob beide zu ähnlichen Ergebnissen führten oder ob eines vom anderen abweichen und möglicherweise durch die bei der Stimulation eingesetzten Substanzen selbst reguliert würde. Zwischen den Quotienten von ChREBP und Actin und denen von ChREBP und GAPDH zeigten sich nur minimale Unterschiede, die statistisch nicht signifikant waren. Daher erscheinen Actin und GAPDH beide gleichermaßen als Housekeeping-Gene geeignet zu sein, sodass die Ergebniswerte der mRNA von ChREBP auf die mRNA beider Gene bezogen werden könnten. Es kam zwar weder bei Actin noch bei GAPDH zu einer offensichtli-

Diskussion

chen Regulation durch Glucose, Fructose, Glucagon oder Insulin; nicht ganz auszuschließen wäre es allerdings, dass die genannten Substanzen beide Gene gleichsinnig herauf- oder herunterregulieren, was sich beim Vergleich der Quotienten nicht zeigen würde.

4.8 Eignung von Hep G2-Zellen

Hep G2-Zellen entstammen einer humanen Hepatom-Zell-Linie, in der die Expression von Glucokinase (GK), dem ersten Enzym der Glycolyse, laut einiger Literatur-Angaben gering ausgeprägt sein soll. Daher wird postuliert, Hep G2-Zellen würden im Vergleich zu anderen Zell-Linien eher schwach auf Glucose reagieren und sich nicht so gut für Experimente mit Glucose-Stimulationen eignen [19, 26]. Trotzdem wurden in dieser Arbeit gute Reaktionen von Hep G2-Zellen auf Glucose gefunden; möglicherweise würden aber Unterschiede in der Zellreaktion z. B. auf Glucose und Fructose bei Verwendung anderer Zellarten anders ausfallen und vielleicht deutlicher sein. Daher wäre die Durchführung weiterer Experimente mit anderen Zell-Linien und letztlich natürlich auch in vivo in Betracht zu ziehen.

Da die hier nach Stimulation mit Glucagon und Insulin gewonnenen Ergebnisse von den nach Studium der Literatur erwarteten Ergebnissen abweichen, sollte eine spezielle Reaktion von Hep G2-Zellen auf Glucagon und Insulin als Erklärungsmöglichkeit in Erwägung gezogen werden.

4.9 Zusammenfassende Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente unterstützen die in der Literatur vertretene Hypothese, eine steigende Glucosekonzentration führe in Leberzellen zur Translokation des ChREBP-Proteins in den Nucleus und eine sinkende Glucosekonzentration zur Translokation ins Cytosol. Außerdem wurde beobachtet, dass eine weitere Erhöhung der Glucosekonzentration zwar zu einer weiteren Steigerung der nucleären Translokation führt, dass allerdings zwischen der Glucosekonzentration und dem Ausmaß der Translokation offenbar kein direkt proportionaler Zusammenhang besteht, sondern der Effekt sich mit steigender Glucosekonzentration abschwächt. Möglicherweise ist ChREBP besonders gut stimulierbar in einem Konzentrations-Bereich von ca. 0,5 bis 2 g/l Glucose, was ungefähr der physiologischerweise vorkommenden Glucosekonzentration im Blut entspricht. Die Abschwächung des Effektes bei steigendem Glucosegehalt könnte einen Schutz vor Lipotoxizität darstellen, die durch eine gesteigerte Aktivität von ChREBP potentiell induziert werden könnte.

Auch in glucosefreiem Medium war ChREBP zu einem kleinen Teil im Nucleus lokalisiert, so dass eine konstitutive Aktivität von ChREBP vermutet werden kann. Nach Kultivierung in glucosefreiem Medium war allerdings eine langfristige Stimulation mit Glucose notwendig, um die

Diskussion

reduzierte Translokationsrate in den Kern wieder zu steigern.

In den Western Blots wurden Doppelbanden für das ChREBP-Protein beobachtet, die möglicherweise für unterschiedliche Phosphorylierungszustände des Proteins und damit für eine Regulation von ChREBP durch Phosphorylierung sprechen könnten.

Weiterhin konnte in den durchgeführten Experimenten nach kurzzeitiger Stimulation mit Glucose eine Erhöhung der ChREBP-mRNA beobachtet werden, was eine gesteigerte Transkription des ChREBP-Gens und/oder einen verminderten Abbau der ChREBP-mRNA vermuten lässt. Auch für eine gesteigerte Translation der ChREBP-mRNA gab es Hinweise, da der Gehalt an ChREBP-Protein stärker erhöht war als der Gehalt an ChREBP-mRNA.

Bei langfristiger Stimulation mit Glucose war der mRNA-Gehalt von ChREBP im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt; der zelluläre Gesamtgehalt an ChREBP-Protein war zu diesem Zeitpunkt erhöht, aber vermutlich niedriger als nach zwei Stunden. Dies spricht für eine temporäre Steigerung der Transkription in den ersten Stunden nach Stimulationsbeginn und für eine anschließende Reduktion der Transkription sowie einen Abbau der mRNA. Langfristige Stimulation mit Glucose führte außerdem zu einer gesteigerten Translokation von ChREBP ins Cytosol, während die Translokation in den Nucleus im Vergleich zur Kontrolle noch erhöht, aber im Vergleich zu kurzfristiger Stimulation erniedrigt war. Beide Effekte – die gesunkene Transkriptionsrate und die gesunkene nucleäre Translokationsrate – deuten auf eine nach einiger Zeit einsetzende Abschwächung des aktivierenden Effektes von Glucose auf ChREBP hin. Der Zweck einer solchen Abschwächung könnte, wie auch die Abschwächung des Effektes von Glucose auf ChREBP bei steigender Glucose-Konzentration, ein Schutz vor Lipotoxizität sein. Ausgelöst werden könnte diese Abschwächung durch Metabolite, die in den durch ChREBP induzierten Stoffwechselwegen entstanden sind, wie z. B. Fettsäuren. Außerdem könnte der inzwischen vermutlich abgesunkene Glucose-Gehalt der Zellen und der Mediumflüssigkeit dazu beitragen.

Die Stimulation mit Fructose zeigte ähnliche Effekte wie die Stimulation mit Glucose: Bei kurzer Stimulationszeit kam es zur Translokation des ChREBP-Proteins in den Nucleus und zu erhöhter Konzentration an ChREBP-mRNA, vermutlich durch gesteigerte Transkription des ChREBP-Gens und/oder durch reduzierten Abbau der ChREBP-mRNA. Bei langer Stimulationszeit waren im Vergleich zur kurzen Stimulationszeit eine Abschwächung der noch erhöhten nucleären Translokation, eine Reduktion der ChREBP-mRNA (durch reduzierte Transkription des ChREBP-Gens und/oder gesteigerten mRNA-Abbau) sowie ein gesteigerter Gesamtgehalt an ChREBP-Protein zu beobachten, wobei letzterer für eine zwischenzeitlich erhöhte Transkription und Translation von ChREBP sowie für einen langsameren Abbau des ChREBP-Proteins als der ChREBP-mRNA spricht.

Diskussion

Sämtliche Effekte waren unter Fructose schwächer ausgeprägt als unter Glucose, sodass davon ausgegangen werden kann, dass Fructose ChREBP in schwächerem Ausmaß aktiviert als Glucose, zumindest im Zeitraum bis 24 Stunden. Die Unterschiede zwischen den kurz- und langfristigen Effekten von Fructose – wie die Abschwächung der als Reaktion auf Fructose auftretenden nucleären Translokation nach 24 Stunden – könnten auf ähnliche Weise erklärt werden wie bei Glucose, nämlich durch eine Gegenregulation der Zelle aufgrund von Metaboliten der durch ChREBP induzierten Stoffwechselwege und/oder durch den sinkenden Fructose-Gehalt in Zellen und Medium.

In den hier durchgeführten Experimenten erfolgte die Zugabe von Fructose stets zusätzlich zu der im Medium enthaltenen Glucose. Ein alleiniger Einsatz von Fructose würde eventuell andere Ergebnisse liefern – z. B. nur eine geringe Steigerung von Transkription und Translokation – da durch den gleichzeitigen Einsatz von Glucose bestimmte möglicherweise fehlende Wirkungen von Fructose, z. B. auf das GSM von ChREBP, kompensiert werden könnten.

Darstellungen in der Literatur, wonach Fructose in besonderem Maße an der Entstehung von Übergewicht, Insulinresistenz und NAFLD beteiligt ist, scheinen nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht durch eine stärkere Transkription oder nucleäre Translokation von ChREBP bedingt zu sein. Ein Einfluss auf andere Aktivierungsmechanismen von ChREBP wie beispielsweise das GSM wäre aber weiterhin vorstellbar. Die in der Literatur beschriebene stark lipogene Wirkung von Fructose könnte auch mit dem Metabolismus von Fructose, der mangels alternativer Wege in stärkerem Umfang als Glucose zu Glycolyse und Lipogenese führt, mit einer mangelnden Hemmung des Fructose-Abbaus in der Glycolyse über das Enzym Phosphofruktokinase I, mit einer stärkeren Induktion lipogener Enzyme (eventuell über Induktion von SREBP-1c) und/oder mit einem mangelnden Sättigungsgefühl durch Fehlen des Blutzuckeranstiegs und Fehlen der damit gekoppelten Insulinsekretion zusammenhängen.

Für die kurzzeitige Stimulation der Hep G2-Zellen mit Glucagon wurde in dieser Arbeit eine Translokation des ChREBP-Proteins in den Nucleus und eine Steigerung des Gesamtproteingehaltes an ChREBP festgestellt sowie, anhand der erhöhten mRNA-Menge, eine Steigerung der Transkription des ChREBP-Gens vermutet. Aufgrund der geringeren Erhöhung der mRNA im Vergleich zum Protein kann zusätzlich von einer durch Glucagon induzierten gesteigerten Translation der ChREBP-mRNA ausgegangen werden. Zur Erklärung der Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen und der nach Studium der Literatur und aufgrund der katabolen Rolle von Glucagon entwickelten Erwartung, Glucagon bewirke eine Hemmung und Inaktivierung von ChREBP, wurden mehrere Theorien entwickelt. Zunächst beziehen sich andere Studien nicht auf humanes ChREBP und berichten fast alle nur indirekt über eine hemmende Wirkung von Glucagon auf

Diskussion

ChREBP. Weiterhin wäre es möglich, dass Glucagon in den Hep G2-Zellen zur Produktion von Glucose und zum Anstieg der zellulären Glucose-Konzentration führt. Ein Teil der Glucose wird vermutlich in die Mediumflüssigkeit sezerniert und kann zu einem späteren Zeitpunkt wieder in die Zellen aufgenommen werden. In Verbindung mit der nachlassenden Wirkung von Glucagon (die Halbwertszeit im Blut beträgt drei bis sechs Minuten) könnte die neu produzierte Glucose schließlich zur Stimulation von ChREBP führen. Eine andere Erklärung wäre, dass die mittelfristige Wirkung von Glucagon in einem Aufbau von Energiereserven besteht und die Aktivierung von ChREBP beinhalten könnte. Glucagon könnte auch weitere Stoffwechselwege in Gang setzen, die trotz Aktivierung von ChREBP insgesamt Glycolyse und Lipogenese hemmen. Denkbar wäre auch, dass Glucagon zwar Transkription und nucleäre Translokation von ChREBP steigert, nicht aber dessen DNA-Bindungsfähigkeit und Aktivität, oder dass Hep G2-Zellen im Vergleich zu normalen Leberzellen in veränderter Weise auf Glucagon reagieren.

Auch nach 24stündiger Stimulation mit Glucagon zeigten sich eine weiterhin erhöhte Translokation von ChREBP in den Nucleus sowie eine Zunahme der ChREBP-Proteinmenge, was eine immer noch bestehende Aktivierung von ChREBP vermuten lässt und eine zwischenzeitlich gesteigerte Transkription und Neusynthese von ChREBP anzeigt. Nach 24 Stunden war allerdings der Gehalt an ChREBP-mRNA wieder gesunken, was auf einen nach einiger Zeit einsetzenden gesteigerten Abbau der mRNA und eine sinkende Transkription hinweist, und die Konzentration des ChREBP-Proteins im Cytosol war erhöht, was eine Abschwächung des aktivierenden Effektes von Glucagon (bzw. Glucose) wahrscheinlich macht. Diese Effekte könnten auf eine Gegenregulation der Zellen hinweisen, die möglicherweise durch Produkte der durch Glucagon bzw. Glucose und ChREBP eingeleiteten Stoffwechselwege oder durch sinkenden Glucagon- bzw. Glucose-Gehalt im Medium verursacht wird. Dass der Gehalt von ChREBP-Protein in Nucleus und Cytosol dem Gehalt nach langfristiger Glucose-Stimulation ähnelt, spricht für die Theorie, Glucagon führe zur Glucoseproduktion und werde selbst mit der Zeit abgebaut, und dadurch komme es nach einiger Zeit zum Überwiegen der Effekte der neu produzierten Glucose über die Effekte von Glucagon.

Eine zweistündige Stimulation mit Insulin schien eine Translokation des ChREBP-Proteins vom Nucleus ins Cytosol und somit eine Inaktivierung von ChREBP zu bewirken. Nach vier Stunden kam es durch Insulin zu einer leichten und nach 24 Stunden zu einer deutlichen Verringerung der mRNA von ChREBP, vermutlich durch verminderte Transkription des ChREBP-Gens und Abbau der mRNA. Diese Ergebnisse erscheinen eher überraschend, da Insulin als anaboles Hormon Glycolyse und Lipogenese stimuliert und LXR und SREBP-1c induziert, die beide zur Aktivierung von ChREBP beitragen sollen. Als Erklärungsmöglichkeiten kommen u. a. ein zunehmen-

Diskussion

der Glucosemangel durch insulininduzierten Abbau der Glucose in Zellen und Medium (über Glycolyse, Lipogenese und Glycogensynthese) in Frage, eine Hemmung von ChREBP und eventuell SREBP-1c durch entstehende Metabolite wie Fettsäuren und/oder ein Absinken des Insulingehaltes infolge Abbau von Insulin.

Experimente mit Fettsäuren wurden als Vorversuche durchgeführt. Dabei schien Palmitinsäure das ChREBP-Protein kurzfristig aus dem Nucleus ins Cytosol zu translozieren und den Abbau des Proteins zu fördern. Auch eine langfristige Stimulation mit Ölsäure führte zur Translokation von ChREBP aus dem Nucleus ins Cytosol, wobei hier zusätzlich eine gesteigerte Neusynthese von ChREBP zu beobachten war. Obwohl in der Literatur hauptsächlich PUFAs für Einflüsse auf die Translokation von ChREBP verantwortlich gemacht werden, scheinen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse dafür zu sprechen, dass auch Palmitinsäure als gesättigte Fettsäure und Ölsäure als einfach ungesättigte Fettsäure einen hemmenden Effekt auf die Translokation von ChREBP haben (eventuell neben dem in der Literatur postulierten Einfluss auf die AMPK und die Transkriptionstätigkeit von ChREBP).

Die Experimente dieser Arbeit wurden sowohl mit kurzer Stimulationszeit über zwei oder vier Stunden als auch mit langer Stimulationszeit über 24 Stunden durchgeführt. Im Ergebnis scheint ChREBP kurzfristig vorwiegend über seine subzelluläre Lokalisation mittels Translokation reguliert zu werden, langfristig v. a. über Genaktivierung und Protein-Synthese. Die oben bereits erwähnten Doppelbanden der Western Blot-Experimente sprechen dabei für eine Steuerung der Translokation über Phosphorylierungsprozesse.

4.10 Übertragung in den physiologischen Kontext und weiterer Forschungsbedarf

Es bleiben noch viele Fragen zu Funktion und Regulation von ChREBP offen, wie z. B. folgende: Welche Rolle spielt ChREBP im menschlichen Organismus in physiologischem und pathophysiologischem Kontext? Wie wird es in vivo reguliert, sind weitere Transkriptionsfaktoren, Nährstoffe und Hormone an seiner Regulation beteiligt? Ist ChREBP-Mlx der Haupt-Regulator von durch Glucose induzierten Genen, und inwieweit haben andere Transkriptionsfaktoren – z. B. LXR – Einfluss auf diese Gene? Welche Beziehungen bestehen in vivo beim Menschen zwischen ChREBP, LXR und SREBP-1c? Spielt ChREBP, wie es sich anzudeuten scheint, eine Rolle bei der Entstehung von Übergewicht, hepatischer Steatose und Diabetes mellitus Typ 2?

Der Bedarf an künftigen in vivo-Untersuchungen zeigt sich z. B. daran, dass in einigen in vitro-Studien ein Effekt von Glucose oder Insulin auf ChREBP nur bei sehr hohen, unphysiologischen Konzentrationen beobachtet wurde [43, 138]. Einige Studien, die in vivo mit Ratten und teilwei-

Diskussion

se mit Menschen durchgeführt wurden, fanden zwar einen Einfluss der Ernährung auf Translokation und Aktivität von ChREBP, jedoch keinen oder nur einen geringen Einfluss auf dessen Transkription [32, 41]. Deshalb ist momentan noch nicht geklärt, welchen Stellenwert die Ernährung bei der Regulation von ChREBP einnimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden in Hep G2-Zellen Reaktionen von ChREBP bereits bei Glucose-Konzentrationen beobachtet, die etwa dem physiologischen Bereich entsprechen: Die Kontrollproben wurden mit 1 g/l Glucose, also 100 mg/dl stimuliert, in den Hauptversuchen wurden Stimulationen mit 2 g/l Glucose eingesetzt (in den Vorversuchen teilweise auch höhere Konzentrationen sowie 0 g/l Glucose). Der physiologische Bereich von ca. 60 bis 110 mg/dl Glucose im Blutplasma nüchtern sowie bis ca. 140 mg/dl postprandial wird damit umfasst; dies lässt auf eine Rolle von ChREBP auch in physiologischem Zusammenhang schließen. Die hier eingesetzten höheren Glucose-Konzentrationen simulieren eine pathologische/diabetische Stoffwechsellage; auch hier nimmt die Aktivierung von ChREBP durch Glucose zu, jedoch in höheren Glucose-Bereichen in geringerem Ausmaß als in niedrigen Bereichen.

Studien mit ChREBP-Knockout in Mäusen können Rückschlüsse auf die physiologische Bedeutung von ChREBP zulassen. Da ein Knockout von ChREBP in diesen Studien (siehe Abschnitt 1.2.4) oft eine Verbesserung von z. B. Übergewicht, hepatischer Steatose, Hyperphagie, Glucose-Intoleranz, Insulinresistenz und Hyperlipidämie zur Folge hatte, kann eine Rolle von ChREBP für die hepatische Lipogenese in vivo angenommen werden [26, 27].

Weitere Studien in physiologischem Kontext sowie natürlich mit humanem ChREBP werden notwendig sein, um die physiologische Relevanz von ChREBP und sein Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren zu klären. Außerdem sollten künftige Studien die Regulation von ChREBP durch Nährstoffe genauer untersuchen, z. B. den Einfluss von Zuckeraustauschstoffen, die heutzutage immer stärkere Verbreitung in Lebensmitteln finden, oder von Fettsäuren verschiedener Sättigungsgrade. Auch Fructose sollte Gegenstand weiterer Studien sein, weil für sie aufgrund klinischer Beobachtungen eine starke Aktivierung und/oder Induktion von ChREBP vermutet wurde – wobei aber in der vorliegenden Arbeit ein geringerer Einfluss von Fructose als von Glucose auf ChREBP festgestellt wurde. Einflüsse von Insulin und Glucagon, aber auch von weiteren Hormonen, z. B. gastrointestinalen Hormonen, sollten ebenfalls untersucht werden.

Die Expression und Aktivität von ChREBP könnte in zukünftigen Studien mit dem Fettgehalt in menschlichen Leberproben korreliert werden, um Zusammenhänge zwischen ChREBP und hepatischer Steatose zu untersuchen. Schließlich wäre zu überlegen, ob durch Eingriffe in die Regulation von ChREBP Verbesserungen in der Therapie metabolischer Erkrankungen erreicht und Medikamente zur Beeinflussung von ChREBP entwickelt werden könnten.

5 Zusammenfassung

Einleitung: Eine exzessive Akkumulation von Triacylglycerinen in der Leber kennzeichnet die in industrialisierten Ländern weit verbreitete Nicht-alkoholische Fettleber-Erkrankung (NAFLD) und ist in hohem Maße mit Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert. Der Transkriptionsfaktor ChREBP (Carbohydrate responsive element binding protein) spielt eine zentrale Rolle für die Regulation der Lipidsynthese in der Leber, indem er die Transkription einer Reihe von Genen kontrolliert, die für wichtige Enzyme der Glycolyse und Lipogenese codieren, wie zum Beispiel L-PK (Leber-Pyruvatkinase), FAS (Fettsäure-Synthase) und ACC (Acetyl-Coenzym A-Carboxylase). Aufgrund der vermutlich großen pathophysiologischen Bedeutung von ChREBP könnten Pharmaka, die diesen Transkriptionsfaktor beeinflussen, in Zukunft potentiell einen wichtigen Ansatzpunkt in der Therapie von NAFLD und Diabetes mellitus Typ 2 darstellen. Voraussetzung für die Entwicklung derartiger Pharmaka ist die genaue Kenntnis der Regulation von ChREBP. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Faktoren, die an der Regulation von ChREBP in humanen Leberzellen möglicherweise beteiligt sind.

Methodik: Alle Experimente wurden mit Zellkulturzellen der Linie Hep G2 durchgeführt. Reaktion und subzelluläre Lokalisation von ChREBP-Protein nach den Stimulationen wurden mittels Western Blots beurteilt, die Reaktion von ChREBP-mRNA mittels qRT-PCR (quantitativer Reverse Transkriptase-Real Time-PCR). Die Zellen wurden mit Glucose, Fructose, Glucagon und Insulin stimuliert. Die Stimulationszeit betrug für die Protein-Analysen zwei sowie 24 Stunden, für die mRNA-Analysen vier sowie 24 Stunden. Als Kontrolle dienten stets die weiterhin mit Glucose 1 g/l kultivierten Zellen. Für die Western Blot-Analysen wurden die Proteine aus den Zellen extrahiert, getrennt nach Cytosol- und Kernfraktion, und mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Gel-Elektrophorese) und Western Blot-Verfahren aufgearbeitet. Nach Zugabe eines Anti-ChREBP-Antikörpers konnte die relative Konzentration der ChREBP-Proteine im Chemolumineszenz-Immunoassay gemessen werden. Als Bezugsproteine dienten Tubulin für die Cytosol- und Lamin für die Kernfraktion.

Für die qRT-PCR-Analysen wurde nach den Stimulationen die mRNA von ChREBP in cDNA umgeschrieben; Amplifikation und relative Quantifizierung der cDNA erfolgten mittels Real Time-PCR. Bezugs-mRNA war Actin.

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse wurde der Welch-Test (t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz) angewandt.

Zusammenfassung

Ergebnisse: Die Stimulation mit Glucose 2 g/l führte nach zwei Stunden zu einem signifikanten Abfall des ChREBP-Proteins im Cytosol und einem signifikanten Anstieg im Nucleus, nach 24 Stunden zu einem leichten Anstieg im Cytosol und zu einem geringeren Anstieg im Nucleus als nach zwei Stunden. Die mRNA von ChREBP war nach vier Stunden erhöht und nach 24 Stunden erniedrigt.

Fructose 1 g/l führte ebenfalls nach zwei Stunden zu einem signifikanten Abfall von ChREBP-Protein im Cytosol und einem signifikanten Anstieg im Nucleus, nach 24 Stunden zu einem Anstieg von ChREBP in Cytosol und Nucleus. Die mRNA von ChREBP war nach vier Stunden erhöht und nach 24 Stunden verringert. Alle beschriebenen Effekte waren schwächer ausgeprägt als nach Stimulation mit Glucose.

Die Stimulation mit 50 nmol/l Glucagon zeigte nach zwei Stunden einen Anstieg von ChREBP-Protein im Nucleus und nahezu keine Änderung im Cytosol, nach 24 Stunden einen leichten, signifikanten Anstieg im Cytosol und einen starken Anstieg im Nucleus. Bei der mRNA waren nach vier Stunden ein signifikanter Anstieg und nach 24 Stunden ein Abfall zu beobachten.

Durch Insulin kam es kurzfristig zu einem Anstieg von ChREBP-Protein im Cytosol, einem Abfall im Nucleus und einer Senkung der mRNA, langfristig zu einem starken, signifikanten Abfall der mRNA.

Diskussion: Die Ergebnisse sprechen für eine durch Glucose verursachte Translokation von ChREBP in den Nucleus, eine Steigerung der Transkription des ChREBP-Gens und eine Neusynthese des ChREBP-Proteins. Die aktivierenden Effekte von Glucose auf ChREBP schwächen sich einerseits mit steigender Glucosekonzentration ab, andererseits mit der Dauer der Stimulation. Die Abschwächung könnte eine zelluläre Gegenregulation darstellen, die dem Schutz vor Lipotoxizität dient und durch Metabolite der von ChREBP induzierten Stoffwechselwege zustande kommt. ChREBP ist auch in glucosefreiem Medium zum Teil im Nucleus lokalisiert, was auf eine konstitutive Aktivität von ChREBP schließen lässt.

Fructose führt ebenfalls zur nucleären Translokation und Transkription von ChREBP, allerdings in schwächerem Ausmaß als Glucose. Eine in der Literatur beschriebene stark lipogene Wirkung von Fructose scheint demnach nicht über diese Prozesse verursacht zu werden, sondern könnte mit dem Metabolismus von Fructose oder der fehlenden Auslösung einer Insulinsekretion durch Fructose zusammenhängen. Fraglich bleibt, ob Fructose das Glucose-sensing module (GSM) von ChREBP beeinflussen und somit dessen DNA-Bindung und Aktivität als Transkriptionsfaktor regulieren kann.

Zusammenfassung

Glucagon scheint die nucleäre Translokation von ChREBP sowohl kurz- als auch langfristig zu steigern und kurzfristig auch die Transkription zu erhöhen. Alternativ kommt als Erklärung eine Steigerung der Glucoseproduktion der Zellen durch Glucagon in Betracht, die schließlich zur Stimulation von ChREBP durch die produzierte Glucose führt.

Insulin führt scheinbar zur Translokation des ChREBP-Proteins ins Cytosol und zu einer kurz- und langfristigen Hemmung der Transkription des ChREBP-Gens. Hier wäre als alternative Erklärung vorstellbar, dass Insulin zu zunehmendem Glucoseverbrauch führt und der entstehende Glucosemangel eine Hemmung von ChREBP bewirkt.

ChREBP wird kurzfristig offenbar vorwiegend über seine subzelluläre Lokalisation mittels Translokation reguliert, langfristig vorwiegend über Genaktivierung und Protein-Synthese.

Ausblick: Um die Regulation von ChREBP weiter zu erforschen, z. B. den Einfluss von Fettsäuren unterschiedlichen Sättigungsgrades auf ChREBP, sind weiterführende Experimente notwendig. Zur mikroskopischen Beurteilung der Regulation von ChREBP wäre die Entwicklung von kloniertem ChREBP und dessen Kopplung mit „Green fluorescence protein“ wünschenswert, woran derzeit in unserer Arbeitsgruppe geforscht wird. Ein weiteres Ziel stellt die Untersuchung menschlicher Leberzellproben aus Biopsien auf den Fettgehalt und auf ChREBP dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Foufelle F, Ferre P. 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* 2002;366(Pt 2):377-91.
2. Towle HC. Glucose and cAMP: adversaries in the regulation of hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(24):13476-8.
3. Postic C, Dentin R, Denechaud PD, Girard J. ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 2007;27:179-92.
4. Ma L, Robinson LN, Towle HC. ChREBP*MLx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem* 2006;281(39):28721-30.
5. Towle HC. Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16(10):489-94.
6. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(19):7281-6.
7. Kooner JS, Chambers JC, Aguilar-Salinas CA, et al. Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides. *Nat Genet* 2008;40(2):149-51.
8. Raghow R, Yellaturu C, Deng X, Park EA, Elam MB. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19(2):65-73.
9. Wang H, Wollheim CB. Does chasing selected 'Fox' to the nucleus prevent diabetes? *Trends Mol Med* 2005;11(6):262-5.
10. Herold G. *Innere Medizin*. Köln, 2006:615.
11. Sanal MG. The blind men 'see' the elephant-the many faces of fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008;14(6):831-44.
12. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 2006;4(2):107-10.
13. National Center for Biotechnology Information (NCBI), Gene: Homo sapiens MLX interacting protein-like (MLXIPL), RefSeqGene on chromosome 7. (Accessed June 9, 2010, at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_009307.1?&from=5000&to=36346&report=genbank.)
14. National Center for Biotechnology Information (NCBI), Nucleotide: Homo sapiens MLX interacting protein-like (MLXIPL), transcript variant 1, mRNA. (Accessed June 9, 2010, at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_032951.2.)
15. National Center for Biotechnology Information (NCBI), AceView: Homo sapiens gene MLXIPL, encoding MLX interacting protein-like. (Accessed June 9, 2010, at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?exdb=AceView&db=36a&term=chrebp&submit=Go>.)

Literaturverzeichnis

16. Denechaud PD, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein and lipid homeostasis. *Curr Opin Lipidol* 2008;19(3):301-6.
17. National Center for Biotechnology Information (NCBI), Protein: Williams-Beuren syndrome chromosomal region 14 protein isoform alpha [Homo sapiens]. (Accessed June 9, 2010, at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_116569.1.)
18. Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski BE, Uyeda K. Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(9):5107-12.
19. Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008;582(1):68-73.
20. Sakiyama H, Wynn RM, Lee WR, et al. Regulation of nuclear import/export of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP): interaction of an alpha-helix of ChREBP with the 14-3-3 proteins and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* 2008;283(36):24899-908.
21. Tsatsos NG, Davies MN, O'Callaghan BL, Towle HC. Identification and function of phosphorylation in the glucose-regulated transcription factor ChREBP. *Biochem J* 2008;411(2):261-70.
22. Li MV, Chen W, Pongvarin N, Imamura M, Chan L. Glucose-mediated transactivation of carbohydrate response element-binding protein requires cooperative actions from Mondo conserved regions and essential trans-acting factor 14-3-3. *Mol Endocrinol* 2008;22(7):1658-72.
23. Stoltzman CA, Peterson CW, Breen KT, Muoio DM, Billin AN, Ayer DE. Glucose sensing by MondoA:MLx complexes: a role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(19):6912-7.
24. Wang Y, Botolin D, Xu J, et al. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res* 2006;47(9):2028-41.
25. Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 2007;282(1):743-51.
26. Denechaud PD, Bossard P, Lobaccaro JM, et al. ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest* 2008;118(3):956-64.
27. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, et al. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 2006;55(8):2159-70.
28. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 2008;118(3):829-38.
29. Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Demeure O, Christian B. Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription. *Chem Phys Lipids* 2008;153(1):3-13.
30. Xu J, Christian B, Jump DB. Regulation of rat hepatic L-pyruvate kinase promoter composition and activity by glucose, n-3 polyunsaturated fatty acids, and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist. *J Biol Chem* 2006;281(27):18351-62.
31. Shiota M, Magnuson MA. Hepatic glucose sensing: does flux matter? *J Clin Invest* 2008;118(3):841-4.

Literaturverzeichnis

32. Letexier D, Pinteur C, Large V, Frering V, Beylot M. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res* 2003;44(11):2127-34.
33. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115(5):1343-51.
34. Matsukuma KE, Wang L, Bennett MK, Osborne TF. A key role for orphan nuclear receptor liver receptor homologue-1 in activation of fatty acid synthase promoter by liver X receptor. *J Biol Chem* 2007;282(28):20164-71.
35. Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2002;277(6):3829-35.
36. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(16):9116-21.
37. Ma L, Sham YY, Walters KJ, Towle HC. A critical role for the loop region of the basic helix-loop-helix/leucine zipper protein Mlx in DNA binding and glucose-regulated transcription. *Nucleic Acids Res* 2007;35(1):35-44.
38. Ma L, Tsatsos NG, Towle HC. Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *J Biol Chem* 2005;280(12):12019-27.
39. Ahmed MH, Byrne CD. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Drug Discov Today* 2007;12(17-18):740-7.
40. Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 2005;87(1):81-6.
41. Letexier D, Peroni O, Pinteur C, Beylot M. In vivo expression of carbohydrate responsive element binding protein in lean and obese rats. *Diabetes Metab* 2005;31(6):558-66.
42. Ferre P, Azzout-Marniche D, Foufelle F. AMP-activated protein kinase and hepatic genes involved in glucose metabolism. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 1):220-3.
43. Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, et al. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 2004;279(19):20314-26.
44. da Silva Xavier G, Rutter GA, Diraison F, Andreolas C, Leclerc I. ChREBP binding to fatty acid synthase and L-type pyruvate kinase genes is stimulated by glucose in pancreatic beta-cells. *J Lipid Res* 2006;47(11):2482-91.
45. Iizuka K, Miller B, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291(2):E358-64.
46. Wise A. Transcriptional switches in the control of macronutrient metabolism. *Nutr Rev* 2008;66(6):321-5.

Literaturverzeichnis

47. Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(24):13710-5.
48. Davies MN, O'Callaghan BL, Towle HC. Glucose activates ChREBP by increasing its rate of nuclear entry and relieving repression of its transcriptional activity. *J Biol Chem* 2008;283(35):24029-38.
49. Li MV, Chang B, Imamura M, Pongvarin N, Chan L. Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes* 2006;55(5):1179-89.
50. Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem Pharmacol* 2002;63(12):2075-80.
51. National Center for Biotechnology Information (NCBI), Protein: Williams-Beuren syndrome chromosomal region 14 protein homolog [Mus musculus]. (Accessed June 9, 2010, at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_067430.2.)
52. Yamamoto T, Shimano H, Inoue N, et al. Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J Biol Chem* 2007;282(16):11687-95.
53. Dentin R, Denechaud PD, Benhamed F, Girard J, Postic C. Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr* 2006;136(5):1145-9.
54. Wu C, Khan SA, Peng LJ, Lange AJ. Roles for fructose-2,6-bisphosphate in the control of fuel metabolism: beyond its allosteric effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Adv Enzyme Regul* 2006;46:72-88.
55. Merla G, Howald C, Antonarakis SE, Reymond A. The subcellular localization of the ChoRE-binding protein, encoded by the Williams-Beuren syndrome critical region gene 14, is regulated by 14-3-3. *Hum Mol Genet* 2004;13(14):1505-14.
56. Iizuka K, Horikawa Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr J* 2008;55(4):617-24.
57. Yamashita H, Fujisawa K, Ito E, et al. Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71(5):1236-43.
58. BioCarta: Regulation and function of ChREBP in liver. (Accessed October 15, 2010, at: http://www.biocarta.com/pathfiles/h_Chrebp.2Pathway.asp.)
59. Wikipedia: Maissirup. (Accessed October 12, 2010, at: <http://de.wikipedia.org/wiki/Maissirup>.)
60. Rutledge AC, Adeli K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev* 2007;65(6 Pt 2):S13-23.
61. Koo HY, Wallig MA, Chung BH, Nara TY, Cho BH, Nakamura MT. Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782(5):341-8.
62. Koo HY, Miyashita M, Cho BH, Nakamura MT. Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390(2):285-9.

Literaturverzeichnis

63. Rodriguez-Calvo R, Barroso E, Serrano L, et al. Atorvastatin prevents carbohydrate response element binding protein activation in the fructose-fed rat by activating protein kinase A. *Hepatology* 2009;49(1):106-15.
64. BioCarta: Feeder pathways for glycolysis. (Accessed October 14, 2010, at: <http://www.biocarta.com/pathfiles/feederPathway.asp>.)
65. Sirek AS, Liu L, Naples M, Adeli K, Ng DS, Jin T. Insulin stimulates the expression of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) by attenuating the repressive effect of Pit-1, Oct-1/Oct-2, and Unc-86 homeodomain protein octamer transcription factor-1. *Endocrinology* 2009;150(8):3483-92.
66. Wenthe W, Brenner MB, Zitzer H, Gromada J, Efanov AM. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors induces growth arrest and apoptosis in insulin-secreting cells. *Endocrinology* 2007;148(4):1843-9.
67. Higuchi N, Kato M, Shundo Y, et al. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2008;38(11):1122-9.
68. Dalen KT, Ulven SM, Bamberg K, Gustafsson JA, Nebb HI. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem* 2003;278(48):48283-91.
69. Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007;61:736-59.
70. Hegarty BD, Bobard A, Hainault I, Ferre P, Bossard P, Foufelle F. Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(3):791-6.
71. Chen YX, Huang AL, Ruan XZ. Nuclear transcription factors and lipid homeostasis in liver. *Chin Med J (Engl)* 2007;120(24):2290-6.
72. Montanaro MA, Gonzalez MS, Bernasconi AM, Brenner RR. Role of liver X receptor, insulin and peroxisome proliferator activated receptor alpha on in vivo desaturase modulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. *Lipids* 2007;42(3):197-210.
73. Zhou J, Febbraio M, Wada T, et al. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology* 2008;134(2):556-67.
74. Efanov AM, Sewing S, Bokvist K, Gromada J. Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2004;53 Suppl 3:S75-8.
75. Choe SS, Choi AH, Lee JW, et al. Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2007;56(6):1534-43.
76. Laffitte BA, Chao LC, Li J, et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(9):5419-24.
77. Jamroz-Wisniewska A, Wojcicka G, Horoszewicz K, Beltowski J. Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007;61:760-85.

Literaturverzeichnis

78. Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest* 2006;116(3):607-14.
79. Steffensen KR, Gustafsson JA. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes* 2004;53 Suppl 1:S36-42.
80. Pegorier JP, Le May C, Girard J. Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr* 2004;134(9):2444S-2449S.
81. Mitro N, Mak PA, Vargas L, et al. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 2007;445(7124):219-23.
82. Nomiya T, Bruemmer D. Liver X receptors as therapeutic targets in metabolism and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2008;10(1):88-95.
83. Tobin KA, Ulven SM, Schuster GU, et al. Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 2002;277(12):10691-7.
84. Ide T, Shimano H, Yoshikawa T, et al. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling. *Mol Endocrinol* 2003;17(7):1255-67.
85. Anderson SP, Dunn C, Laughter A, et al. Overlapping transcriptional programs regulated by the nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha, retinoid X receptor, and liver X receptor in mouse liver. *Mol Pharmacol* 2004;66(6):1440-52.
86. Desvergne B. RXR: from partnership to leadership in metabolic regulations. *Vitam Horm* 2007;75:1-32.
87. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 2005;25:317-40.
88. Yoshikawa T, Ide T, Shimano H, et al. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol* 2003;17(7):1240-54.
89. Wada T, Kang HS, Angers M, et al. Identification of oxysterol 7alpha-hydroxylase (Cyp7b1) as a novel retinoid-related orphan receptor alpha (RORalpha) (NR1F1) target gene and a functional cross-talk between RORalpha and liver X receptor (NR1H3). *Mol Pharmacol* 2008;73(3):891-9.
90. Geyeregger R, Zeyda M, Stulnig TM. Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(5):524-39.
91. Grefhorst A, van Dijk TH, Hammer A, et al. Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289(5):E829-38.
92. Schuster GU, Johansson L, Kietz S, Stulnig TM, Parini P, Gustafsson JA. Improved metabolic control by depletion of Liver X Receptors in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348(1):176-82.
93. Cao G, Liang Y, Broderick CL, et al. Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* 2003;278(2):1131-6.

Literaturverzeichnis

94. Liu Y, Yan C, Wang Y, et al. Liver X receptor agonist T0901317 inhibition of glucocorticoid receptor expression in hepatocytes may contribute to the amelioration of diabetic syndrome in db/db mice. *Endocrinology* 2006;147(11):5061-8.
95. Fernandez-Veledo S, Nieto-Vazquez I, Rondinone CM, Lorenzo M. Liver X receptor agonists ameliorate TNF α -induced insulin resistance in murine brown adipocytes by downregulating protein tyrosine phosphatase-1B gene expression. *Diabetologia* 2006;49(12):3038-48.
96. Ferre P, Foufelle F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res* 2007;68(2):72-82.
97. Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 2002;277(11):9520-8.
98. Chakravarty K, Hanson RW. Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase-c gene transcription: the role of sterol regulatory element-binding protein 1c. *Nutr Rev* 2007;65(6 Pt 2):S47-56.
99. Zhou L, Li Y, Nie T, et al. Clenbuterol inhibits SREBP-1c expression by activating CREB1. *J Biochem Mol Biol* 2007;40(4):525-31.
100. Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(31):11245-50.
101. Dif N, Euthine V, Gonnet E, Laville M, Vidal H, Lefai E. Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. *Biochem J* 2006;400(1):179-88.
102. Punga T, Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. Phosphorylation and ubiquitination of the transcription factor sterol regulatory element-binding protein-1 in response to DNA binding. *J Biol Chem* 2006;281(35):25278-86.
103. Satoh S, Masatoshi S, Shou Z, et al. Identification of cis-regulatory elements and trans-acting proteins of the rat carbohydrate response element binding protein gene. *Arch Biochem Biophys* 2007;461(1):113-22.
104. Burgering BM. A brief introduction to FOXology. *Oncogene* 2008;27(16):2258-62.
105. Sharma SK, Leinemann U, Ratke R, et al. Characterization of a novel Foxa (hepatocyte nuclear factor-3) site in the glucagon promoter that is conserved between rodents and humans. *Biochem J* 2005;389(Pt 3):831-41.
106. Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 2004;380(Pt 2):297-309.
107. Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 15):2479-87.
108. Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16(4):183-9.
109. Mounier C, Posner BI. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol* 2006;84(7):713-24.
110. Puig O, Tjian R. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev* 2005;19(20):2435-46.

Literaturverzeichnis

111. Zhang W, Patil S, Chauhan B, et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 2006;281(15):10105-17.
112. Kitamura T, Ido Kitamura Y. Role of FoxO Proteins in Pancreatic beta Cells. *Endocr J* 2007;54(4):507-15.
113. Erol A. Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. *Bioessays* 2007;29(8):811-8.
114. Barreiro FJ, Kobayashi S, Bronk SF, Werneburg NW, Malhi H, Gores GJ. Transcriptional regulation of Bim by FoxO3A mediates hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2007;282(37):27141-54.
115. Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 2004;25(5):1495-500.
116. Puigserver P, Rodgers JT. Foxa2, a novel transcriptional regulator of insulin sensitivity. *Nat Med* 2006;12(1):38-9.
117. Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 2008;454(7203):470-7.
118. Armoni M, Harel C, Karnieli E. Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR-gamma and FOXO1 to FFA and inflammation. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18(3):100-7.
119. Li X, Hansen PA, Xi L, Chandraratna RA, Burant CF. Distinct mechanisms of glucose lowering by specific agonists for peroxisomal proliferator activated receptor gamma and retinoic acid X receptors. *J Biol Chem* 2005;280(46):38317-27.
120. Qin X, Xie X, Fan Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* 2008;48(2):432-41.
121. Swagell CD, Henly DC, Morris CP. Regulation of human hepatocyte gene expression by fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362(2):374-80.
122. Adamson AW, Suchankova G, Rufo C, et al. Hepatocyte nuclear factor-4alpha contributes to carbohydrate-induced transcriptional activation of hepatic fatty acid synthase. *Biochem J* 2006;399(2):285-95.
123. Dentin R, Benhamed F, Pegorier JP, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 2005;115(10):2843-54.
124. Nakamura MT, Cheon Y, Li Y, Nara TY. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids* 2004;39(11):1077-83.
125. Collier JJ, Zhang P, Pedersen KB, Burke SJ, Haycock JW, Scott DK. c-Myc and ChREBP regulate glucose-mediated expression of the L-type pyruvate kinase gene in INS-1-derived 832/13 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293(1):E48-56.
126. Iizuka K, Horikawa Y. Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374(1):95-100.
127. Wang H, Kouri G, Wollheim CB. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 17):3905-15.

Literaturverzeichnis

128. Canbay A, Bechmann L, Gerken G. Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol* 2007;45(1):35-41.
129. Morral N, Edenberg HJ, Witting SR, Altomonte J, Chu T, Brown M. Effects of glucose metabolism on the regulation of genes of fatty acid synthesis and triglyceride secretion in the liver. *J Lipid Res* 2007;48(7):1499-510.
130. Morgan K, Uyuni A, Nandgiri G, et al. Altered expression of transcription factors and genes regulating lipogenesis in liver and adipose tissue of mice with high fat diet-induced obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20(9):843-54.
131. Kohjima M, Higuchi N, Kato M, et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2008;21(4):507-11.
132. Meng X, Lu X, Li Z, et al. Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification and characterization of three novel genes. *Hum Genet* 1998;103(5):590-9.
133. Wikipedia: Williams-Beuren-Syndrom. (Accessed June 9, 2010, at: <http://de.wikipedia.org/wiki/Williams-Beuren-Syndrom>.)
134. Burgess SC, Iizuka K, Jeoung NH, et al. Carbohydrate-response element-binding protein deletion alters substrate utilization producing an energy-deficient liver. *J Biol Chem* 2008;283(3):1670-8.
135. Ishii S, Iizuka K, Miller BC, Uyeda K. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(44):15597-602.
136. Wikipedia: Sättigung (Physiologie). (Accessed June 9, 2010, at: http://de.wikipedia.org/wiki/S%C3%A4ttigung_%28Physiologie%29.)
137. Wikipedia: Serotonin. (Accessed June 9, 2010, at: <http://de.wikipedia.org/wiki/Serotonin>.)
138. Wang H, Wollheim CB. ChREBP rather than USF2 regulates glucose stimulation of endogenous L-pyruvate kinase expression in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 2002;277(36):32746-52.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht und mir während dieser Zeit beratend zur Seite gestanden haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Andreas Pfeiffer, möchte ich dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in der Abteilung für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin am Campus Benjamin Franklin zu absolvieren. Ich bedanke mich weiterhin für die interessante Aufgabenstellung und das in mich gesetzte Vertrauen.

Frau Doktor Christiane Bumke-Vogt, meiner Betreuerin, danke ich ganz herzlich für ihr großes Engagement, für ihre unersetzliche Hilfe bei der praktischen Laborarbeit, ihre Ideen und ihre Unterstützung während der gesamten Zeit, in der ich mit meiner Doktorarbeit beschäftigt war.

Bei meinem Betreuer Herrn Doktor Volker Bähr möchte ich mich für seine hilfreiche Beratung und seine kritischen Überlegungen bedanken.

Frau Doktor Janin Andres und Herrn Markus Sabath danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei der praktischen Laborarbeit.

8 Lebenslauf von Angela Dorothea Sinn

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Erklärung

„Ich, Angela Dorothea Sinn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Regulation des Transkriptionsfaktors Carbohydrate Responsive Element Binding Protein (ChREBP) in Hep G2-Zellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

10 Appendix

1. Protein-Extraktion mit dem „Nuclear Extract Kit“ von Active Motif

Vorbereitung der Lösungen, Protokoll-Abschnitt „Buffer preparation and Recommendations“

PBS/Phosphatase Inhibitors: 10x PBS 10 %, Aqua a. i. 85 %, Phosphatase Inhibitors 5 %

1x Hypotonic Buffer: 10x Hypotonic Buffer 10 %, Aqua a. i. 90 %

Complete Lysis Buffer: 10 mmol/l Dithiothreitol 10 %, Lysis Buffer AM1 89 %, Protease Inhibitor Cocktail 1 %

Detergent

Protein-Extraktion, Protokoll-Abschnitt „Preparation of Nuclear Extract – Starting from Cells“

Schritt 1: Kollektion der Zellen

1. Die Mediumflüssigkeit wurde abgesaugt, und die Zellen wurden mit 5 ml eiskalter „PBS/Phosphatase Inhibitors“-Lösung gewaschen. Nach Absaugen der Flüssigkeit erfolgte die Zugabe von 3 ml eiskalter „PBS/Phosphatase Inhibitors“-Lösung.
2. Die Zellen wurden mit einem Zell-Schaber abgelöst und in ein vorgekühltes Röhrchen gefüllt.
3. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 500 rpm in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge.
4. Der Überstand wurde abgesaugt.

Schritt 2: Kollektion der Cytosol-Fraktion

1. Die Zellen wurden in 500 µl 1x Hypotonic Buffer resuspendiert und durch Hoch- und Runterpipettieren gemischt. Danach folgten die Überführung der Zellen in ein vorgekühltes Mikrozentrifugen-Röhrchen und 15 min Inkubation auf Eis.
2. Es wurden 25 µl Detergent hinzugefügt, und die Lösung wurde 10 s mit einem Vortexer gemischt.
3. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Lösung für 1 min bei 14000 x g in einer auf 4 °C vorgekühlten Mikrozentrifuge.
4. Der Überstand, die Cytosol-Fraktion, wurde in ein vorgekühltes Röhrchen transferiert. Um den Proteinabbau in den Cytosol-Extrakten zu verhindern, wurde diesen im Verhältnis 1:10 eine Lösung aus einer Tablette Complete Mini, aufgelöst in 1 ml Aqua ad iniectabilia, zugesetzt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

Appendix

Das Pellet wurde zur Extraktion der Kernproteine weiter verwendet.

Schritt 3: Kollektion der Nucleus-Fraktion

1. Das Kern-Pellet wurde in 50 μ l Complete Lysis Buffer resuspendiert, durch Hoch- und Runterpipettieren gemischt und 10 s gevortext.
2. Es folgte die Inkubation der Lösung für 30 min auf Eis, auf einem Schüttler bei 150 rpm.
3. Danach wurde die Lösung 30 s gevortext und 10 min bei 14000 x g in einer auf 4 °C vorgekühlten Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand, die Kern-Fraktion, wurde in ein vorgekühltes Röhrchen transferiert und bei -80 °C gelagert.

2. RNA-Extraktion mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ von Roche

Vorbereitung der Lösungen, Protokoll-Abschnitt „2. How to Use this Product – 2.1 Before You Begin – Preparation of Working Solutions“

DNase I: 0,55 ml Elution Buffer wurden hinzugefügt.

Wash Buffer I: 20 ml Ethanol wurden hinzugefügt.

Wash Buffer II: 40 ml Ethanol wurden hinzugefügt.

Lysis/-Binding Buffer

DNase Incubation Buffer

Elution Buffer

RNA-Extraktion, Protokoll-Abschnitt „2.2 Isolation of Total RNA from Cultered Cells“

1. Die Zellen wurden in 200 μ l PBS-Dulbecco resuspendiert.
2. Es folgte der Zusatz von 400 μ l Lysis/-Binding Buffer, dann wurde die Lösung 15 s gevortext.
3. Nach Einsetzen eines Filter-Röhrchens in ein Sammel-Röhrchen wurden die Proben auf das obere Reservoir des Filter-Röhrchens pipettiert.
4. Danach erfolgte die Zentrifugation des Filter-Röhrchens in einer Tischzentrifuge für 15 s bei 8000 x g.
5. Das Filter-Röhrchen wurde aus dem Sammel-Röhrchen entfernt und der Überstand abgegossen, dann wurden Filter-Röhrchen und Sammel-Röhrchen wieder zusammengesetzt.
6. Je Probe wurden 90 μ l DNase Incubation Buffer in ein steriles Reaktions-Röhrchen pipettiert und 10 μ l DNase I hinzugefügt. Die Lösung wurde auf das Glasfiltervlies im oberen Reservoir des Filter-Röhrchens pipettiert. Es folgten 15 min Inkubation bei Raumtemperatur.
7. 500 μ l Wash Buffer I wurden auf das obere Reservoir des Filter-Röhrchens pipettiert und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden Filter-Röhrchen und Sammel-Röhrchen wieder zusammengesetzt.

Appendix

8. Es folgte die Wiederholung von Schritt sieben mit 500 µl Wash Buffer II.
 9. 200 µl Wash Buffer II wurden auf das obere Reservoir des Filter-Röhrchens pipettiert und 2 min bei 13000 x g zentrifugiert.
 10. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Filter-Röhrchen in ein steriles Mikrozentrifugen-Röhrchen eingesetzt.
 11. Zur Elution der RNA wurden 75 µl Elution Buffer auf das obere Reservoir des Filter-Röhrchens pipettiert und 1 min bei 12000 x g zentrifugiert.
- Die Lagerung der eluierten mRNA erfolgte bei -80 °C.

3. RNA-Extraktion mit dem „SV Total RNA Isolation System“ von Promega

Vorbereitung der Lösungen, Protokoll-Abschnitt „4.A. Preparation of Solutions“

DNase I Enzyme: Es wurde Nuclease-freies Wasser hinzugefügt.

RNA Lysis Buffer: Beta-Mercapto-Ethanol wurde im Verhältnis 1:50 hinzugefügt.

RNA Wash Solution: Ethanol wurde im Verhältnis 2:1 hinzugefügt.

DNase Stop Solution: Ethanol wurde im Verhältnis 4:25 hinzugefügt.

RNA Dilution Buffer

Nuclease-Free Water

Vorbereitung der Zellen, Protokoll-Abschnitt „8.F. Adherent Culture Cells“

1. Pro Well erfolgte die Zugabe von 175 µl RNA Lysis Buffer.
2. Die Zellen jedes Wells wurden mit einem Zell-Schaber abgelöst.
3. Zur Zerkleinerung der genomischen DNA wurden die Proben in einer Spritze aufgezogen und in ein Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt.

RNA-Extraktion, Protokoll-Abschnitte „4.D. Lysis of Cultured Cells“ sowie „4.E. RNA Purification by Centrifugation (Spin)“

1. Es wurden 350 µl RNA Dilution Buffer zum Lysat hinzugegeben, mit dem Lysat gemischt und 3 min bei 70 °C in einem Heizblock erhitzt.
2. Es folgte die Zentrifugation der Lösungen für 10 min bei 12000-14000 x g.
3. Der Überstand wurde in ein frisches Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt.
4. Nach Zugabe von 200 µl 95 %igem Ethanol wurde die Lösung vermischt, auf das Spin-Column-Assembly übertragen und 1 min bei 12000-14000 x g zentrifugiert.
5. Nach Abgießen des Überstandes wurden 600 µl RNA Wash Solution auf das Spin-Column-Assembly gegeben und 1 min bei 12000-14000 x g zentrifugiert.

Appendix

6. Der DNase Incubation Mix wurde aus 80 % Yellow Core Buffer, 10 % $MnCl_2$ 0,09 mol/l und 10 % DNase I Enzyme vorbereitet. Für jede Probe wurden 50 μ l des DNase Incubation Mix direkt auf die Membran im Spin-Basket pipettiert.

7. Es erfolgte eine Inkubation der Proben für 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurden 200 μ l DNase Stop Solution auf den Spin-Basket pipettiert und 1 min bei 12000-14000 x g zentrifugiert.

8. Es folgten der Zusatz von 600 μ l RNA Wash Solution und eine Zentrifugation für 1 min bei 12000-14000 x g.

9. Nach Abgießen des Überstandes wurden 250 μ l RNA Wash Solution hinzugefügt und 3 min bei 14000 x g zentrifugiert.

10. Der Spin-Basket wurde in ein Elutions-Röhrchen transferiert. 100 μ l Nuclease-freies Wasser wurden auf die Membran gegeben und 1 min bei 12000-14000 x g zentrifugiert.

Der Spin-Basket wurde entfernt. Der Überstand im Elutions-Röhrchen enthielt die aufgereinigte RNA. Diese wurde bei -80 °C gelagert.