



Doctoral Thesis

Investigations into early and late insulin signaling mechanism

Author(s):

Meyenn, Ferdinand von

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006499361> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH Nr. 19672

INVESTIGATIONS INTO EARLY AND LATE INSULIN SIGNALING MECHANISM

A B H A N D L U N G
zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER WISSENSCHAFTEN

der

ETH ZÜRICH

vorgelegt von

FERDINAND VON MEYENN

M.Sc., TU München

geboren am 27. April 1981

in Deutschland

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Markus Stoffel
Prof. Dr. Wilhelm Krek
Prof. Dr. Bernard Thorens

2011

ABSTRACT

Obesity and obesity-associated diabetes have become one of the major threats to human health. Both are associated with insulin resistance, a state in which the actions of insulin are impaired. The key insulin sensitive organs, liver, fat and muscle and the insulin producing pancreatic beta cells, fail to cope with imbalanced metabolic homeostasis due to increased nutrient uptake and low physical activity. The understanding of the basic mechanisms regulating insulin signal transduction is pivotal to the treatment and prevention of diabetes and obesity.

In this thesis I have undertaken two different approaches to study the regulation and direct consequences of insulin signaling.

Over the last years, the endocytic machinery has emerged as an important regulator of signal transduction. In the first place, endocytosis regulates the availability of receptors at the cell surface, but various signaling events have been shown to also occur on endosomal membranes. On the other hand, signaling processes regulate endocytosis and the composition of the highly flexible membranes. Basic principles of the interconnection of endosome-based signaling are emerging, but in most cases the physiological significance *in vivo* remains poorly understood. We have taken an RNAi approach to acutely silence one crucial component of endocytosis (Rab5) in the liver and study the implications on whole body physiology and insulin signaling in the liver. Plasma cholesterol levels were dramatically increased due to impaired LDL endocytosis. Furthermore, the animals treated with siRNAs against Rab5 had reduced circulating glucose concentrations, showed increased glucose clearance, but impaired gluconeogenesis. While at high plasma insulin concentrations insulin signaling was not affected, at low plasma insulin levels animals had sustained activation of the insulin receptor and downstream components of the insulin signaling pathway. These results show that already short-term perturbations of the endocytic machinery have severe effects on physiology and signaling pathways.

In a second study, we focused on the insulin-mediated regulation of adaptive feeding behavior in the hypothalamus. The two neuropeptides, melanin-concentrating hormone (MCH) and orexin, both produced within neurons of the lateral hypothalamic area (LHA), play a central role in the regulation of food intake, arousal and motivated behavior. The actions of these hormones are inhibited by feeding-

related signals and stimulated during fasting, but the underlying molecular regulation is only poorly studied. The forkhead box transcription factor Foxa2 has been implicated in the control of glucose and lipid homeostasis in the liver, in particular in mediating the fasting response through activation of genes of β -oxidation and ketogenesis. Foxa2 activity is inhibited by insulin via PI3K/Akt signaling, which results in a phosphorylation-dependent nuclear exclusion of Foxa2. We identified that Foxa2, co-expressed in orexin and MCH positive neurons of the LHA, directly regulates the expression levels of both neuropeptides in an insulin-dependent manner. Furthermore, in obese hyperinsulinemic mice, Foxa2 is inactivated and MCH and orexin levels are reduced. Constitutive activation of Foxa2 in the brain of mice increased the expression of the neuropeptides and resulted in increased food intake, metabolism and insulin sensitivity. Also in obese mice, constitutive activation of Foxa2 improved glucose homeostasis and increased physical activity, which caused a reduction in fat mass. These results demonstrate that Foxa2 plays a central role as metabolic sensor in the LHA, regulating physiology and adaptive behavior.

Zusammenfassung

Die Zahl der Patienten, die an Übergewicht und Typ II Diabetes leiden hat in den letzten Jahren verstärkt zugenommen und die Begleiterkrankungen stellen nunmehr eine der größten Herausforderungen für das Gesundheitssystem dar. Übergewicht und Type II Diabetes werden mit Insulinresistenz assoziiert, das heißt, dass die Wirkung von Insulin vermindert oder vollständig inhibiert ist. Geringe körperliche Aktivität und übermäßige Nahrungsaufnahme führen langfristig zu einer Überbelastung der pankreatischen Inselzellen und der insulin-sensitiven Organe (Muskel, Fett und Leber). Die Entwicklung von neuen Präventions- und Behandlungsmethoden setzt ein grundlegendes Verständnis der molekularen Wirkweise von Insulin voraus. In der folgenden Arbeit haben wir zwei unterschiedliche Ansätze gewählt, um die direkten Wirkungs- und Regulationsmechanismen der Insulin-Signalkaskade zu untersuchen.

In den letzten Jahren wurde erkannt, dass die zelluläre Endozytose-Maschinerie, über die reine Aufnahme von Substanzen hinaus, auch eine zentrale Rolle bei der Regulierung von Signalwegen zukommt. In erster Linie wird die Verfügbarkeit von Rezeptoren an der Zelloberfläche durch Endozytose kontrolliert, zum anderen wurde aber berichtet, dass auch eigentliche Signalprozesse an endosomalen Membranen stattfinden. Zur gleichen Zeit werden aber auch die Endozytose sowie die Zusammensetzung der extrem flexiblen Membranen durch verschiedene Signalkaskaden kontrolliert. Erste grundlegende Prinzipien dieser Regulation sind bekannt, dennoch ist die physiologische Relevanz *in vivo* bis heute nicht unumstritten. Aus diesem Grund wählten wir einen pharmakologischen Ansatz um einen entscheidenden Faktor der Endozytose (Rab5) spezifisch in der Leber zu inaktivieren und so Auswirkungen eingeschränkter Endozytoseprozesse auf die Physiologie des gesamten Körpers sowie der Insulin-Signaltransduktion in der Leber studieren zu können. Inaktivierung von Rab5 hatte einen dramatischen Anstieg der Plasma-Cholesterinwerte zur Folge. Dieser Befund konnte durch eingeschränkte LDL-Endozytose und nicht durch einen eventuell entstandenen Leberschaden erklärt werden. Darüber hinaus waren die Blutglukosewerte in den behandelten Mäusen reduziert und die Funktion der Glukoneogenese beeinträchtigt. Trotz niedriger Plasma-Insulinkonzentrationen waren der Insulinrezeptors sowie nachfolgende Moleküle der Insulin-Signaltransduktion aktiviert. Diese Ergebnisse zeigen, dass

bereits kurzfristige Veränderungen der Endozytose-Maschinerie erhebliche Effekte auf die Physiologie und zellulären Prozesse haben können.

In einer zweiten Studie haben wir die Rolle von Insulin im Hypothalamus im Zusammenhang mit der Regulierung des adaptiven Fressverhalten studiert. Die Neuropeptide Melanin-konzentrierendes Hormon (MCH) und Orexin, werden von Neuronen des lateralen Hypothalamus produziert und spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und motiviertem Verhalten. Die Wirkung beider Moleküle wird durch Hormone während der Nahrungsaufnahme gehemmt, wohingegen im Hungerzustand beide Neuropeptide aktiv sind. Das zur Familie der 'forkhead box' Transkriptionsfaktoren gehörende Protein Foxa2 ist in der Leber mitverantwortlich für die Regulation des Glukose- und Fettstoffwechsels. Die Aktivität von Foxa2 wird durch Insulin, vermittelt durch den PI3K/AKT Signalweg reguliert und wird unter Bedingungen hoher Insulinwerte, wie zum Beispiel nach einer Mahlzeit, inaktiviert. Hier zeigen wir, dass Foxa2 in MCH- und Orexin-Neuronen des lateralen Hypothalamus produziert wird und das die Expression beider Hormone in Abhängigkeit von Insulin einer Regulierung durch Foxa2 unterliegt. Bemerkenswerterweise war Foxa2 in fettleibigen, hyperinsulinämen Mäusen dauerhaft inaktiv, was dazu führte, dass die Expression von MCH und Orexin ebenfalls reduziert war. Genetisch induzierte Aktivierung von Foxa2 im Gehirn von Mäusen führte zu einer erhöhten Expression der Neuropeptide sowie einer verstärkten Nahrungsaufnahme, einem erhöhten Stoffwechsel und verbesserter Insulinsensitivität. Ebenso bewirkte eine dauerhafte Aktivierung von Foxa2 in fettleibigen Mäusen eine Verbesserung der Blutglukosewerte und förderte körperliche Aktivität. Zusammen führte dies schließlich zu einer Reduktion der Fettmasse. Diese Ergebnisse zeigen, dass Foxa2 ein wichtiger „Insulinsensor“ des lateralen Hypothalamus ist und eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Physiologie und adaptiven Verhalten spielt.