



Regulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Umwelttoxene: Einfluss von Metallionen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anna Eckers

aus Mönchengladbach

Düsseldorf, Dezember 2009

Aus dem Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH
Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz
Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2010

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV-VIII
1 Einleitung	1
1.1 Fox-Transkriptionsfaktoren	1
1.1.1 Fox-Transkriptionsfaktoren der Klasse O	1
1.1.2 Struktur und Funktion der FoxO-Proteine	2
1.1.3 Zielgene von FoxO-Transkriptionsfaktoren	4
1.1.4 Regulation der FoxO-Faktoren	6
1.1.4.1 Transkriptionelle Regulation	6
1.1.4.2 Posttranslationale Modifikationen	7
1.1.4.2.1 Phosphorylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren	7
1.1.4.2.2 Acetylierung/Deacetylierung	11
1.1.5 FoxO Proteine und Co-Regulatoren	13
1.1.6 Die Rolle von FoxO-Proteinen in Alterungsprozessen	14
1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und Schwermetalle	15
1.3 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	16
1.4 Fragestellung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Zellkultur	20
2.1.1 Stammhaltung und Anzucht	20
2.1.2 Mykoplasmentest	21
2.1.3 Konservierung und Revitalisierung von Zellen	21
2.1.4 Behandlung von Zellen	21
2.1.5 Cytotoxizitätstests	23
2.1.5.1 Neutralrot-Inkorporation	23
2.1.5.2 Zellkoloniebildungs-Tests	23
2.1.6 Transiente Transfektion von Zellen	24
2.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	26
2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.4 Immunodetektion von Proteinen	30
2.4.1 Elektrotransfer auf Membranen (Western Blot)	30

2.4.2 Immunodetektion	30
2.4.3 Entfernung eines Antikörpers von der Membran	32
2.5 Isolation von Zellkernen	32
2.6 Bestimmung der DNA-Bindefähigkeit von FoxO1a	33
2.7 Reporteranalysen	33
2.8 RNA-Isolierung und quantitative Echtzeit-PCR	34
2.9 Glutathionoxidation	35
2.10 statistische Auswertung	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Einfluss von Schwermetallionen auf den Akt/FoxO-Signalweg	37
3.1.1 Cytotoxizität von Nickelionen und Glutathionoxidation	37
3.1.2 Einfluss von Nickelionen auf FoxO-Proteine	42
3.2 Einfluss von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und FICZ auf FoxO-Proteine	44
3.2.1 Modulation FoxO-responsiver Promotoren durch AhR-Agonisten	44
3.2.1.1 Einfluss von AhR-Agonisten auf ein spezifisch FoxO-responsives Promotorkonstrukt	45
3.2.1.2 Einfluss von PAK und FICZ auf den Selenoprotein P-Promotor	52
3.2.1.3 Einfluss von PAK und FICZ auf die Aktivität des Glucose 6-Phosphatase-Promotors	58
3.2.1.4 Aktivitätsänderungen des MnSOD-Promotors nach Behandlung mit 3-MC und FICZ	62
3.2.2 Einfluss von 3-MC und FICZ auf die DNA-Bindungsfähigkeit von FoxO1a	64
3.2.3 Durch Behandlung mit 3-MC induzierte Änderungen des mRNA-Spiegels von SeP	65
3.2.4 Wirkung der PAK und FICZ auf den durch Insulin induzierten Effekt	67
3.2.5 Bedeutung der FoxO- und HNF-4 α -Bindestellen innerhalb des Selenoprotein P Promotors für die durch 3-MC induzierte Aktivitätsveränderung	75
3.3 Modulation der FoxO-Expression in HepG2-Zellen	80

4 Diskussion	83
4.1 Einfluss von Nickelionen auf FoxO-Transkriptionsfaktoren	83
4.2 Wirkung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen auf die FoxO-Signaltransduktion	86
4.3 Modulation der relativen FoxO mRNA-Spiegel	92
5 Zusammenfassung	96
Summary	97
6 Literaturverzeichnis	98
Publikationen und Tagungsbeiträge	119
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

3-MC	3-Methylcholanthren
ADP	Adenosindiphosphat
AhR	Arylkohlenwasserstoffrezeptor (<i>aryl hydrocarbon receptor</i>)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	<i>AhR nuclear translocator</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl2 antagonist of cell death</i>
B(a)P	Benzo(a)pyren
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CAT	Catalase
CBP	CREB bindendes Protein
CDK	Cyclinabhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CK1	<i>casein kinase 1</i>
Cm	Chloramphenicol
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
Cyp1a1	Cytochrom P450 1a1
DAF	<i>dauer formation</i>
DBE	daf16-Bindeelement
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DYRK	<i>Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase</i>
E2F2	<i>E2 promoter binding factor</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ERK	Extrazellulär regulierte Kinasen
ESR	Elektronenspinresonanz
FBS	Fötale Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazol
Fox	Forkhead Box
FoxO	Forkhead Box Gruppe O
G6Pase	Glucose 6-Phosphatase
GADD	<i>growth arrest and DNA damage response</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glucosetransporter
GPx	Glutathionperoxidase
Grb-2	<i>growth factor receptor binding protein 2</i>
GSH	Glutathion
GSK3	Glycogensynthasekinase-3
GSSG	Glutathiondisulfid
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)

HNF	hepatischer nukleärer Faktor
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (<i>Insulin-like growth factor</i>)
IKKb	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase beta subunit</i>
IR	Infrarotstrahlung
IRE	Insulin responsives Element
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIP	Kinase-Inhibitor Protein
LB	Luria-Bertani-Medium
Luc	Luciferase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MNF	3-Methoxy-4-nitroflavon
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
MLL	mixed-lineage leukemia
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
Neo	Neomycin
NES	Kernexportsequenz (<i>nuclear export sequence</i>)
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
NLS	Kernlokalisationssequenz (<i>nuclear localisation sequence</i>)

PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAX	<i>paired box</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS/T	PBS + Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDK	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PFK2	6-Phosphofruktose-2-kinase
PGC-1 α	<i>PPARγ Coactivator-1α</i>
PH	Pleckstrin-Homologie
PI3K	Phosphoinositid 3'-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4',5'-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3',4',5'-trisphosphat
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PTB	Phosphotyrosinbindung
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTP(asen)	Proteintyrosinphosphat(asen)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SBP	SECIS-bindendes Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfat</i>)
SDS-PA-Gel	SDS-Polyacrylamidgel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Sec	Selenocystein
SECIS	Selenocystein Insertionssequenz
SeP	Selenoprotein P
SGK	<i>Serum and glucocorticoid-inducible kinase</i>
SH2-Domäne	<i>Src-homology 2-Domäne</i>
SHIP	<i>Src-homology inositol phosphatase</i>
SHP	<i>orphan nuclear receptor small heterodimer partner</i>
SIRT	<i>silent information regulator 2</i>
Skp2	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
SOD	Superoxiddismutase
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS/T	TBS + Tween 20
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
XRE	<i>xenobiotic response element</i>

1 Einleitung

1.1 Fox-Transkriptionsfaktoren

Proteine der Fox-Transkriptionsfaktorenfamilie besitzen die namensgebende, konservierte Forkhead-Box (Fox). Dieses Motiv ist eine aus 110 Aminosäuren bestehende DNA-bindende Sequenz, die aufgrund ihrer Struktur oft auch als „winged helix“-Domäne bezeichnet wird (Clark et al., 1993; Kaestner et al., 2000; Weigel et al., 1989). Entdeckt wurde diese Sequenz zunächst in *Drosophila melanogaster* (Weigel et al., 1989). Durch eine Mutation im *fkh*-Gen wurde der Vorder- und Hinterdarm durch ektopische Kopfstrukturen ersetzt. Nach und nach sind von der Hefe bis zum Menschen weitere Proteine mit dieser Sequenz identifiziert worden. Für Säuger sind bisher über 100 Fox-Proteine bekannt (Greer und Brunet, 2005). Seit dem Jahr 2000 werden die Proteine der Fox-Familie in unterschiedliche Gruppen mit einheitlicher Nomenklatur, von FoxA bis FoxR, unterteilt (Kaestner et al., 2000)¹.

1.1.1 Fox-Transkriptionsfaktoren der Klasse O

In der Gruppe O werden derzeit für den Menschen 4 bekannte Fox-Proteine zusammengefasst: FoxO1a (FKHR1, *Forkhead in rhabdomyosarcoma*), FoxO3a (FKHRL1, *Forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1*), FoxO4 (AFX, *ALL1-fused-gene-from-chromosome-X*) und FoxO6 (Anderson et al., 1998). Das ursprünglich als FoxO2 bezeichnete Protein stellte sich als identisch mit FoxO3a heraus (Carter und Brunet, 2007), FoxO5 ist als Homolog von menschlichem FoxO3a in Fischen identifiziert worden (Rudd et al., 2003; Greer und Brunet, 2005). Um die Bedeutung der FoxO Proteine aufzuklären, wurden unterschiedliche Mausmodelle herangezogen. Während homozygote FoxO1 Knockout-Mausembryonen bereits am 11. Tag unter anderem aufgrund von Defekten bei der Gefäßentwicklung (Hosaka et al., 2004; Furuyama et al., 2004) starben, sind FoxO3 und FoxO4 Knockout-Mäuse lebensfähig, was auf funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen FoxO-Isoformen hindeutet. Die gleichzeitige Deletion von beiden Allelen der drei FoxO-Isformen im erwachsenen hämatopoetischen System führte, wie kürzlich gezeigt wurde, unter anderem zu Defekten in der Entwicklung des Blutsystems. Zudem

¹ Vgl. „Fox-Nomenclature index“ Internetseite unter: <http://biology.pomona.edu/fox/>

wurde in aus diesen Mäusen isolierten Blutstammzellen ein höherer Spiegel von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) im Vergleich zu Zellen aus Wildtyp-Mäusen beobachtet (Tothova et al., 2007).

FoxO6 kommt eine gewisse Sonderstellung zu, da es im Gegensatz zu den drei anderen Isoformen nur im Nervensystem vorkommt und zudem überwiegend kernlokalisiert ist. Der Grund ist vermutlich das Fehlen der dritten durch Akt phosphorylierbaren Aminosäure (vgl. Abb. 1.1; zur Phosphorylierung von FoxO vgl. 1.1.4.2), wodurch der Export von FoxO6 aus dem Kern stark beeinträchtigt ist (Jacobs et al., 2003).

1.1.2 Struktur und Funktion der FoxO-Proteine

Essentielle Strukturelemente für die vollständige Funktion der FoxO Proteine sind (i) die N-terminale DNA-bindende Forkhead-Domäne und (ii) die C-terminale Transaktivierungsdomäne.

Über die DNA-Bindestelle können die FoxO-Transkriptionsfaktoren an Bindeelemente auf der DNA (Konsensus-Sequenz: 5'-TTGTTTAC-3') binden und die Transkription von FoxO-Zielgenen modulieren. Dieses Bindeelement wird auch im menschlichen Organismus häufig DBE (DAF-16-Bindeelement) genannt, obwohl dieser Name auf das FoxO-Orthologe DAF-16 des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) zurückgeht. Die Basensequenz des sogenannten insulin responsive element (IRE), TT(G/A)TTT(T/G)(G/T), unterscheidet sich in den letzten zwei Basen vom DBE (Streep et al., 1997; O'Brien und Granner, 1996). FoxO1a bindet sowohl an DBE als auch an IRE, jedoch scheint die Bindung an das DBE stärker zu sein (Furuyama et al., 2000). Die Entscheidung, ob FoxO an IRE oder an DBE bindet, wenn beide Elemente in einem Promotor vorzufinden sind, könnte von der Umgebung der Elemente abhängen. Dass die Umgebung der Bindesequenz die Interaktion von Forkheadproteinen mit der DNA beeinflusst, ist bereits für FREAC-3 (FoxC1) gezeigt worden (Pierrou et al., 1994). FoxO-Transkriptionsfaktoren besitzen nicht nur eine aktivierende, sondern auch eine reprimierende Funktion. Für letztere konnte gezeigt werden, dass hier die Bindung der FoxO-Faktoren an die DNA nicht zwingend erforderlich ist (Ramaswamy et al., 2002; Bouchard et al., 2004). So können FoxO-Proteine durch einen von dem IRE unabhängigen Weg zu Promotoren rekrutiert werden und so mit Cofaktoren die Expression von Zielgenen inhibieren.

Der Bereich des FoxO1a-Gens, der für die C-terminale Transaktivierungsdomäne codiert, kann in Rhabdomyosarkomen, in denen die FoxO-Proteine entdeckt wurden, durch chromosomale Translokation mit den DNA-Bindedomänen der PAX(paired box)3- und PAX7-Gene fusioniert sein. Die entstehenden Proteine besitzen zwar noch die Transaktivierungsdomäne von FoxO1a (Galili et al., 1993), jedoch keine DNA-bindende Forkhead-Domäne.

Kernlokalisations- und exportsequenzen (NLS, nuclear localization signal; NES, nuclear export sequence) sind schließlich für die subzelluläre Lokalisation der FoxO-Proteine von Bedeutung. In FoxO1a dient die Phosphorylierung von T24 und S256 als Auslöser für den Export (Zhao et al., 2004). Vermutlich erfolgt durch die Bindung von 14-3-3 Proteinen eine Konformationsänderung, so dass die leucinreiche NES freigelegt wird (Brunet et al., 2002). Hingegen wird gleichzeitig die NLS durch die Proteine maskiert, so dass ein Rücktransport in den Zellkern verhindert wird (Rena et al., 2001). Mutiert man die beschriebenen Aminosäuren zu Alaninen, können diese nicht mehr phosphoryliert und durch 14-3-3 Proteine erkannt werden. Die so veränderten FoxO-Faktoren sind konstitutiv aktiv.

Nach der Phosphorylierung durch Akt sind die FoxO-Proteine nicht mehr aktiv im Hinblick auf die transkriptionelle Kontrolle von Zielgenen. Im Cytoplasma erfolgt ihr Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (Matsuzaki et al., 2003; Plas und Thompson, 2003). Für die FoxO-Transkriptionsfaktoren sind zwei Fälle zu unterscheiden. Bei der Polyubiquitinierung unterscheiden sich die katalysierenden E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexe je nach FoxO-Isoform (Huang et al., 2005). So ist die Phosphorylierung an S256 für FoxO1a sowie die Interaktion mit Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2), einer Untereinheit des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, Voraussetzung für die Polyubiquitinierung (Huang et al., 2005). Die Monoubiquitinierung an Lysinresten konnte für FoxO4 gezeigt werden, die mit einem Reimport in den Zellkern und Erhöhung der transkriptionssteigernden Aktivität einhergeht (van der Horst et al., 2006).

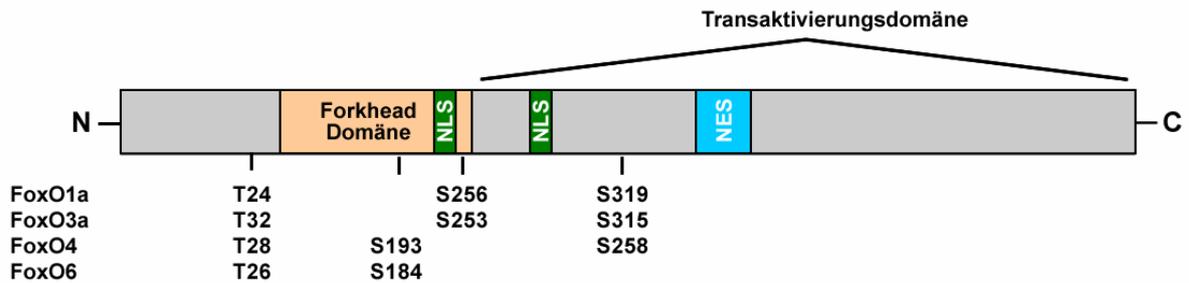


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus von FoxO-Proteinen

Über die Forkhead-Domäne findet die Bindung an die Konsensus-Sequenz in Promotoren von FoxO-Zielgenen statt. FoxO-Transkriptionsfaktoren besitzen Kernlokalisations- und -exportsequenzen (NLS, nuclear localization signal; NES, nuclear export sequence), über die die subzelluläre Lokalisation reguliert wird. Die angegebenen Aminosäurereste werden durch die Proteinkinase Akt phosphoryliert (vgl. 1.1.4.2.1). Abbildung modifiziert nach Calnan und Brunet (2008).

1.1.3 Zielgene von FoxO-Transkriptionsfaktoren

FoxO-Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression einer Vielzahl von Genen, die für Proteine codieren, die an unterschiedlichen Zellfunktionen beteiligt sind. Diese betreffen z. B. die Kontrolle des Zellzyklus, Prozesse zum Einleiten der Apoptose, den Glucosemetabolismus und die Abwehr gegen oxidativen Stress.

Der Übergang von Zellen von der G1- in die S-Phase wurde durch die Überexpression von FoxO-Proteinen verhindert. Der Grund dafür ist die Aktivierung des KIP1 (Kinase-Inhibitor Protein p27, p27^{kip1})-Gens durch FoxO-Faktoren. Die Expression des Inhibitorproteins führt zur Hemmung von cyclinabhängigen Kinasen (Medema et al., 2000; Collado et al., 2000), wodurch der Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase unterbunden wird. Auch der Übergang von der G2- in die M-Phase wird durch FoxO-Faktoren reguliert, da die Bildung von GADD45a (growth arrest and DNA damage response gene product of 45 kDa) (Tran et al., 2002) und Cyclin G2 (Furukawa-Hibi et al., 2002), die eine Verzögerung dieses Übergangs bewirken, unter der transkriptionellen Kontrolle von FoxO-Proteinen steht.

Neben der Regulation des Zellzyklus kontrollieren FoxO Proteine auch die Apoptose. Das prominenteste Zielgen stellt hier das für FasL (Fas-Ligand) codierende dar (Brunet et al., 1999). Die Überexpression von FoxO-Proteinen führt so zu einer erhöhten Apoptoserate (Zheng et al., 2000; Dijkers et al., 2002).

Als unter anderem auch über den Insulinsignalweg regulierte Proteine kontrollieren FoxO-Transkriptionsfaktoren die Bildung von am Glucosemetabolismus beteiligten Proteinen. Schlüsselenzyme der Gluconeogenese sind die Glucose 6-Phosphatase (G6Pase) und die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), deren Expression nach Stimulation durch Insulin FoxO-kontrolliert inhibiert wird (Schmoll et al., 2000). Im Zusammenhang mit der FoxO-abhängigen Expression der G6Pase konnte gezeigt werden, dass FoxO-Transkriptionsfaktoren O-glykosyliert werden können, was in einer gesteigerten Expression der G6Pase resultierte (Kuo et al., 2008). Die O-Glykosylierung wurde als unabhängig von der Lokalisation der FoxO-Transkriptionsfaktoren beschrieben, da sie ebenfalls bei einer konstitutiv aktiven FoxO-Form von FoxO1a auftrat.

Eine große Bedeutung kommt den FoxO-Zielgenen zu, die oxidativem Stress entgegenwirken. Als unter anderem für diesen Schutz verantwortliche Enzyme konnten die Mangansuperoxiddismutase (MnSOD) und Catalase (CAT) als FoxO-Zielgene identifiziert werden (Kops et al., 2002; Nemoto und Finkel, 2002). Die FoxO-vermittelte Erhöhung des Schutzes gegen ROS geht einher mit der Antagonisierung der durch Glucosedepletion induzierten Apoptose.

Das Plasmaprotein Selenoprotein P (SeP) wird zu 75% von der Leber sekretiert (Carlson et al., 2004) und wurde als zweites Selenoprotein nach der cytosolischen Glutathionperoxidase (Gpx-1) entdeckt (Herrman, 1977). Es wird in unterschiedlich glykosylierten Formen mit Molekularmassen im Bereich zwischen 51 und 61 kDa von der Leber sekretiert (Mostert et al., 1998). Insgesamt besitzt Selenoprotein P mit zehn Selenocysteinen (Sec) als bisher einziges identifiziertes Selenoprotein mehr als ein Selenocystein (Hill et al., 1991). Nachdem zunächst unbekannt war, welche Basenkombination für das Selenocystein codiert, wurde das Triplett UGA (ein Stopp-Codon) als für Selenocystein codierend identifiziert (Chambers et al., 1986). Die Unterscheidung zwischen Sec und STOP wird durch das Vorliegen von Haarnadelstrukturen in der untranslatierten Region am 3'-Ende der SeP-mRNA, den SECIS (Selenocystein Insertionssequenzen), ermöglicht (Hill et al., 1993). SeP dient in extrahepatischen Geweben als Selenquelle und induziert die Bildung von antioxidativ wirkenden Selenoenzymen wie die Glutathionperoxidasen (Gpx) (Steinbrenner et al., 2006). Wie gezeigt werden konnte, steht auch die Expression von SeP unter der Kontrolle von FoxO Proteinen (Walter et al., 2008).

1.1.4 Regulation der FoxO-Faktoren

FoxO-Proteine werden sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Zur posttranslationalen Regulation über Vorgänge wie Ubiquitinierung (vgl. Kapitel 1.1.2), aber vor allem Phosphorylierung und Acetylierung, ist weitaus mehr bekannt als zur Regulation der Transkription.

1.1.4.1 Transkriptionelle Regulation

Die Regulation der Expression von FoxO-Proteinen ist bisher nicht systematisch untersucht worden. Da zumindest auf posttranslationaler Ebene FoxO-Proteine durch eine Vielzahl von exogenen Noxen moduliert werden können, wären gerade Langzeitstudien interessant, die zeigen würden, wie die FoxO-Expression sich bei Behandlung von Zellen oder Organismen mit Umweltfaktoren verhält. Erhöhte FoxO1 mRNA- sowie Proteinspiegel konnten in Mäusen mit nahrung induzierter Insulinresistenz beobachtet werden (Samuel et al., 2006; Qu et al., 2007). Ebenso wurden erhöhte Spiegel in Patienten mit nichtalkoholischer Steatohepatitis gefunden (Valenti et al., 2008). Kürzlich konnte mittels durch Hydroxytamoxifen induzierbarer Zelllinien gezeigt werden, dass nach Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F1 (E2 promoter binding factor), der Apoptose und Proliferation reguliert, die FoxO1a und FoxO3a mRNA- und Proteinspiegel um bis das Zwölfwache gesteigert wurden. Mittels Reporteranalysen, bei denen ein Teil des FoxO1-Promotors inklusive der E2F1 Bindestellen vor ein Luziferasereporter gen kloniert war, konnten diese Ergebnisse verifiziert werden. Der Transkriptionsfaktor E2F1 ist demnach ein direkter Modulator für die Expression von FoxO1- und FoxO3-Genen (Nowak et al., 2007). Interessanterweise wurden die Wachstumsfaktoren PDGF (Platelet-derived growth factor) und FGF (fibroblast growth factor) als Repressoren der Expression von FoxO1, FoxO3 und auch FoxO4 beschrieben (Essaghir et al., 2009). In derselben Arbeit konnte gezeigt werden, dass FoxO3 für einen Rückkopplungsmechanismus verantwortlich ist: Die Phosphorylierung und damit Deaktivierung von FoxO3 durch PDGF führt zu einer Verminderung der Expression der FoxO-Gene. Somit stimuliert FoxO3 die Expression der FoxO mRNA.

1.1.4.2 Posttranslationale Modifikationen

1.1.4.2.1 Phosphorylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren

Der Mechanismus der FoxO-Phosphorylierung wurde zunächst im Fadenwurm *C. elegans* an dem FoxO1a homologen DAF-16 entdeckt (Ogg et al., 1997). FoxO-Proteine können durch unterschiedliche Kinasen wie Akt, JNK, SGK, IKKb, DYRK oder CK1 phosphoryliert werden. Die am häufigsten zitierte und am besten untersuchte für FoxO-Phosphorylierung verantwortliche Kinase ist die Proteinkinase B, auch Akt genannt, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Der (PI3K)/Akt Signalweg

Der (PI3K)/Akt-Signalweg wird unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch Insulin und andere Wachstumsfaktoren beeinflusst.

Der Insulinrezeptor ist ein Tetramer und besteht aus zwei α - (135 kDa) und zwei β - (95 kDa) Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Über die extrazellulären α -Untereinheiten findet die Bindung von Insulin statt, während die intrazellulären β -Untereinheiten eine Rezeptortyrosinkinaseaktivität besitzen, wodurch das extrazelluläre Signal in das Zellinnere übertragen wird. Durch Konformationsänderungen kommt es zu einer Erhöhung der Kinaseaktivität und Autophosphorylierung an Tyrosinresten des Rezeptors. Proteine mit Phosphotyrosinbindungs (PTB)-Domänen oder Src-homology 2 (SH2)-Domänen sind in der Lage, die phosphorylierten Tyrosinreste zu erkennen und binden (Virkamäki et al., 1999).

Die Phosphoinositid 3'-Kinasen (PI3K) gehören zur Familie der Lipidkinasen und katalysieren die Phosphorylierung von Inositolphospholipiden. Die PI3-Kinasen der Klasse IA sind Heterodimere, die aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit bestehen. Die p85-Untereinheit der PI3K besitzt zwei SH2-Domänen und kann die Phosphotyrosinreste des Rezeptors entweder direkt binden, oder es können Adapterproteine wie der Grb-2/SOS(growth factor receptor binding protein/son of sevenless)-Komplex oder das Insulin-Rezeptorsubstrat-1 (IRS-1) zwischengeschaltet sein (Cantley, 2002). Eine enzymatische Aktivität konnte für die p85-Untereinheit bisher nicht nachgewiesen werden.

Die p110-Untereinheit der PI3-Kinasen katalysiert nach Stimulation des Signalweges durch Insulin die Phosphorylierung der Hydroxylgruppe in 3'-Position des Inositolringes von Membranphosphoinositiden. Wird Phosphatidylinositol-4',5'-bisphosphat (PIP₂) in 3'-Position des Inositolringes phosphoryliert, entsteht Phosphatidylinositol-3',4',5'-trisphosphat (PIP₃).

PIP₃ dient sodann als Anker für Proteindomänen wie die Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne, was zur Rekrutierung von PH-Domänen tragenden Proteinen zur Zellmembran führt. Auf diese Weise werden die Serin/Threoninkinase Akt sowie die Akt phosphorylierenden Kinasen „PIP₃-dependent kinase 1“ (PDK-1) und „PIP₃-dependent kinase 2“ (PDK-2) zur Membran rekrutiert und in Nachbarschaft zueinander gebracht (Murga et al., 1998; Coffey et al., 1998; Leever et al., 1999).

Akt wird durch PDK-1 und PDK-2 an den Aminosäureresten T308 bzw. S473 phosphoryliert und dadurch aktiviert, wobei zum Erreichen der vollen Kinaseaktivität die Phosphorylierung beider Reste erfolgt sein muss (Alessi et al., 1997). Die Fähigkeit von PDK-1, Akt zu phosphorylieren, ist hierbei nur gegeben, wenn PDK-1 an der Plasmamembran und nicht in anderen Zellkompartimenten lokalisiert ist (Andjelković et al., 1999; Scheid et al., 2002).

Menschliches FoxO1a wird durch Akt an drei konservierten Positionen phosphoryliert, (Abb. 1.2) S256, S319 und T24 (Rena et al., 1999; Brunet et al., 1999; Kops et al., 1999), wobei zunächst der Serinrest an der Position 256 phosphoryliert wird, bevor die Phosphorylierung an den beiden übrigen Aminosäureresten, entweder durch Akt oder andere PI3K-abhängige Kinasen, stattfinden kann (Rena et al., 2001; Nakae et al., 2000). Die durch Akt vermittelte Phosphorylierung von FoxO-Proteinen führt zu einer Translokation vom Zellkern ins Cytoplasma, wodurch FoxO-Zielgene nicht mehr transkribiert werden.

Zu den Substraten von Akt zählen nicht nur die FoxO-Transkriptionsfaktoren. So wird die Hemmung von Apoptosesignalen über die Phosphorylierung und Inaktivierung von BAD (Bcl2 [B-cell lymphoma 2] antagonist of cell death) und Caspase 9 erreicht (Datta et al., 1997; Cardone et al., 1998). Als Antwort auf die Insulinbindung an den Insulinrezeptor wird eine gesteigerte Glycogensynthese durch die Hemmung der Glycogensynthasekinase-3 (GSK-3) erreicht, wohingegen die Phosphorylierung der 6-Phosphofruktokinase-2 (PFK2) zur Glycolytestimulation führt. Als weiteres Substrat von Akt, das eine Rolle im Glucosemetabolismus übernimmt, ist der Glucosetransporter GLUT4 zu nennen, dessen

subzelluläre Translokation zur Zellmembran zum Zweck der Regulation der Glucoseaufnahme ebenfalls von Akt moduliert wird (Coffer et al., 1998).

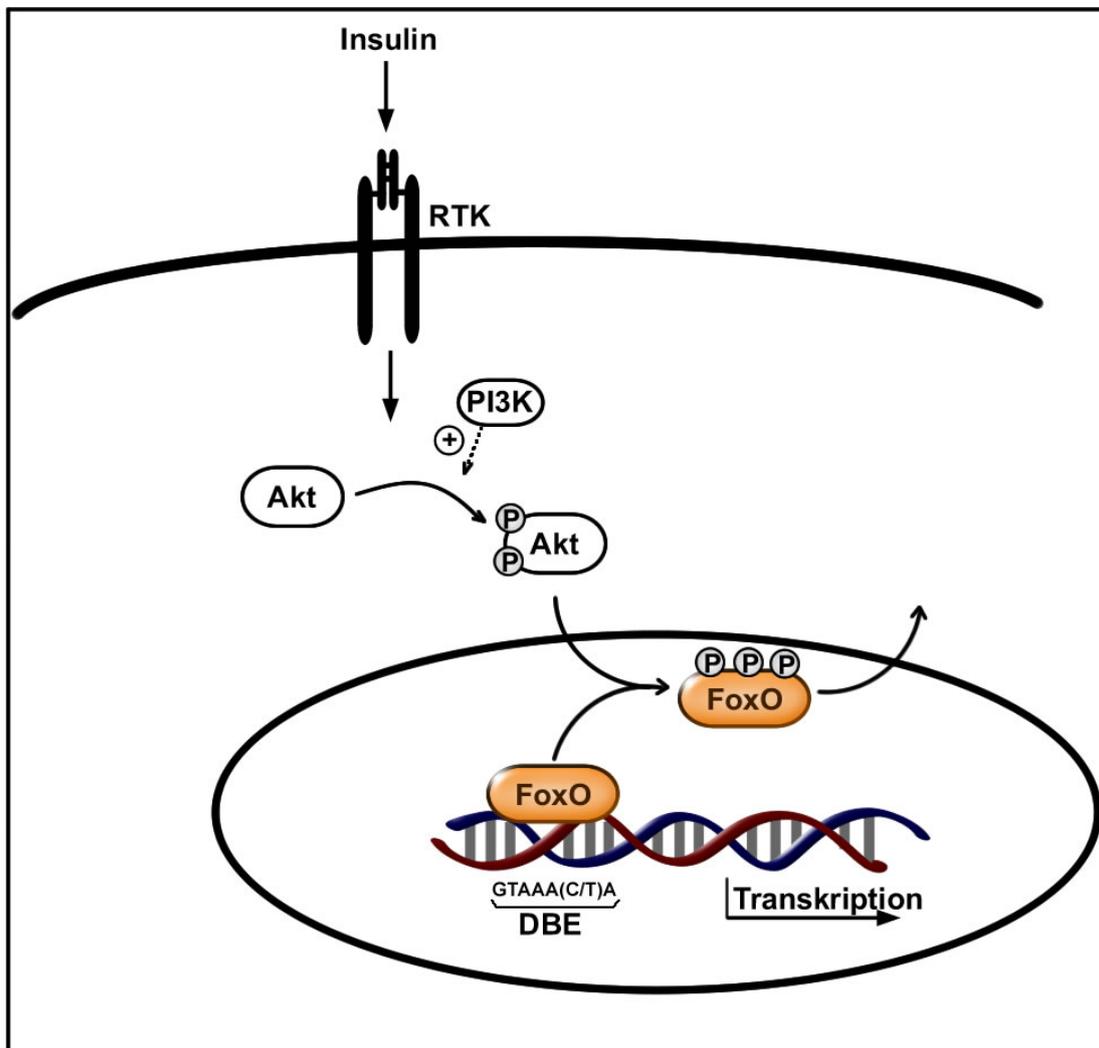


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Phosphorylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch die Proteinkinase Akt

Durch Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor kommt es zu einer Phosphoinositid-3'-kinase (PI3K)-abhängigen Aktivierung der Kinase Akt, die wiederum FoxO-Proteine im Kern an drei Aminosäureresten phosphoryliert und damit deaktiviert. Phosphorylierte FoxO-Proteine werden mittels eines Exportmechanismus unter Beteiligung von 14-3-3 Proteinen ins Cytosol überführt. Ebenfalls dargestellt ist die DBE-Sequenz (DAF16-Bindeelement) in der Promotorregion von FoxO-Zielgenen, die durch FoxO-Transkriptionsfaktoren erkannt wird.

Die Akt-Phosphorylierung wird von verschiedenen Phosphatasen an unterschiedlichen Punkten des Signalwegs antagonisiert. Erstens wird die Phosphorylierung der jeweiligen Rezeptortyrosinkinase (RTK) durch Proteintyrosinphosphatasen (PTPasen) wie PTP1B kontrolliert. PTP1B dephosphoryliert entweder die RTK selbst oder das Insulin-Rezeptorsubstrat-1 (Klaman et al., 2000; Kenner et al., 1996; Goldstein et al., 2000).

Interessanterweise ist Akt in der Lage, PTP1B an S50 zu phosphorylieren und so die Dephosphorylierung von PTP1B-Substraten einzuschränken. Dadurch könnte es nach Insulinstimulation zu einem Rückkopplungsmechanismus kommen (Ravichandran et al., 2001). Zweitens kann die Dephosphorylierung und Inaktivierung von Akt selbst durch Serin/Threoninphosphatasen katalysiert werden. Drittens greifen Lipidphosphatasen in die Signalkette ein, indem zum einen PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) die Abspaltung des 3'-Phosphatrestes von 3'-Phosphoinositiden katalysiert und so der Signalübergang von PI3K auf PDK-1 und Akt unterbunden wird (Stocker et al., 2002; Stambolic et al., 1998) und zum anderen SHIP-2 (Src-Homology Inositol Phosphatase-2), eine Phosphoinositid 5'-Phosphatase, die die Hydrolyse der Phosphatbindung an der 5'-Position von PIP3 katalysiert (Wada et al., 2001).

Die Aktivität der PI3K kann auch pharmakologisch blockiert werden. So verursacht der zellgängige Pilzmetabolit Wortmannin eine irreversible Hemmung der PI3K über kovalente Bindung an einen konservierten Lysinrest im aktiven Zentrum (Yano et al., 1993). Eine reversible Hemmung erfolgt durch ATP-Analoga wie LY294002 [2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on].

Der JNK-Signalweg

Neben der beschriebenen Phosphorylierung durch Akt nach Stimulation des PI3K/Akt-Signalweges erfolgt eine andere posttranslationale Regulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren durch oxidativen Stress.

C-Jun N-terminale Kinasen (JNK) gehören zu der Familie der MAP (mitogen-activated protein) Kinasen, zu der auch ERK (extracellular regulated kinase) und p38-MAPK gehören. Da die Aktivierung sowohl der JNK als auch der p38-MAP Kinasen durch oxidativen Stress, durch Hitzeschock und andere extrazelluläre Stimuli induziert wird, findet sich in der Literatur auch die alternative Bezeichnung SAPK (stress-activated protein kinase) (Kyriakis et al., 1990 und 1994).

Die Aktivierung von JNK nach Belastung von Zellen mit Stress auslösenden Stimuli erfolgt durch deren doppelte Phosphorylierung, was wiederum zur Phosphorylierung von JNK-Substraten sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern führt (Kaneto et al., 2005). Zu den cytosolischen JNK-Substraten zählen beispielsweise Bcl-2 und auch Akt, zu den nukleären der Transkriptionsfaktor p53, der nukleäre Rezeptor PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor) sowie FoxO-Proteine (Bogoyevitch und Kobe, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl menschliches FoxO4 sowie das Homolog DAF-16

durch JNK phosphoryliert wird. Die Phosphorylierungsstellen wurden als T447 und T451 identifiziert, wobei diese Stellen nicht in den übrigen FoxO-Isoformen konserviert zu sein scheinen. Die durch JNK phosphorylierten Aminosäurereste der FoxO-Proteine unterscheiden sich somit von den durch Akt phosphorylierten Aminosäureresten. Die Phosphorylierung durch JNK führt zu einer Translokation der Proteine vom Cytoplasma in den Kern (Essers et al., 2004; Oh et al., 2005).

Oxidativer Stress kann in einer Phosphorylierung der FoxO-Proteine durch JNK resultieren, gefolgt von einer Aktivierung von FoxO-Proteinen. Dieser Mechanismus antagonisiert demnach die Phosphorylierung und Deaktivierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Akt, die nach Stimulation von Zellen mit Insulin oder anderen Wachstumsfaktoren auftritt. Tatsächlich können die für den Export von FoxO aus dem Zellkern benötigten 14-3-3 Proteine durch JNK phosphoryliert werden, woraufhin diese ihre gebundenen Substrate freisetzen. Ein Rücktransport der freigesetzten FoxO-Proteine in den Kern wäre also denkbar (Sunayama et al., 2005).

1.1.4.2.2 Acetylierung/Deacetylierung

Nicht nur durch Phosphorylierung kann die Aktivität der FoxO-Moleküle beeinflusst werden, sondern auch durch Acetylierung bzw. Deacetylierung. Besonders unter Einfluss von zellulärem Stress wird der Acetylierungszustand der FoxO-Proteine moduliert. Verantwortlich für die Deacetylierung ist die Gruppe der Sirtuine [SIRTs, silent information regulator 2 (Sir2) homologue]. Das erste Sirtuin wurde Anfang der 90er Jahre bei der Suche nach Faktoren, die die Langlebigkeit beeinflussen, in Hefe (Sir2) entdeckt. Der Name der Sirtuine geht auf ihre Funktion zurück: Sie legen Chromatinbereiche durch Deacetylierung von Histonen still („silencing“), was zu einer Unerreichbarkeit dieser Region für Replikation, Rekombination und Transkription führt (Blander und Guarente, 2004). Die durch Sirtuin erreichte Deacetylierung ist NAD^+ -abhängig, da die freiwerdende Acetylgruppe im ersten Schritt von NAD^+ übernommen wird. Die Endprodukte dieser Reaktion sind das deacetylierte Protein, Nicotinamid und O-acetyl-ADP-Ribose (Sauve et al., 2006).

Sirtuine sind in der Lage, die FoxO-vermittelte Stressrespons von der Apoptose hin zur Verzögerung des Zellzyklus und der vermehrten Expression von dem Stress entgegenwirkenden Faktoren zu lenken: Durch die Deacetylierung von FoxO durch SIRT1 wird FoxO1a und FoxO4 aktiviert und die Expression von MnSOD sowie GADD45 gesteigert

(Tran et al., 2002; Furukawa-Hibi et al., 2002). Dadurch werden Sirtuine – und damit verbunden auch FoxO-Transkriptionsfaktoren – mit der Regulation der Lebensspanne in Verbindung gebracht. Dennoch sind die Untersuchungen bezüglich einer Aktivierung oder Deaktivierung von FoxO-Proteinen durch Sirtuine durchaus kontrovers. Die meisten, jedoch nicht alle (Motta et al., 2004), Studien beschreiben eine Aktivierung der FoxO-regulierten Transkription von Zielgenen (van der Horst et al., 2004; Brunet et al., 2004; Daitoku et al., 2004).

Die direkte Interaktion von SIRT1 mit FoxO3a konnte nach Behandlung von Fibroblasten mit Stimuli, die oxidativen Stress auslösen, nachgewiesen werden. So wird in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren cytosolisch lokalisiertes FoxO3a nach Auslösen von Stress durch einen Hitzeschock (42°C) in den Kern rekrutiert. Sowohl H₂O₂, Menadion, als auch Hitzeschock induzierten die Ausbildung eines Komplexes aus FoxO3a und SIRT1, die Behandlung mit IGF-1, UV-, oder IR-Strahlung jedoch nicht (Brunet et al., 2004). In Rattenhepatomzellen wurden diese Ergebnisse durch Coinkubation von Insulin mit H₂O₂ bestätigt. Gleichzeitig konnte die FoxO-abhängige Steigerung der Gluconeogenese nach Aktivierung von Sirtuinen mit Resveratrol gezeigt werden (Frescas et al., 2005).

Die Acetylierung der FoxO Proteine erfolgt durch p300/CBP Acetyltransferasen. p300 und CBP [CREB (cAMP response element binding) bindendes Protein] sind diskrete und an ähnlichen zellulären Prozessen beteiligte Proteine. Die in FoxO4 durch p300 acetylierten Lysinreste konnten in Mäusen als K186, K189 und K408 identifiziert werden (Fukuoka et al., 2003). Durch Wasserstoffperoxid ausgelöster Stress in Zellen konnte als Ursache für die vermehrte Bindung von p300/CBP an FoxO-Proteine und deren zunehmende Acetylierung verantwortlich gemacht werden. Bemerkenswert ist, dass diese Erhöhung der Acetylierung in FoxO4 nicht durch gleichzeitige Inkubation mit Insulin verhindert wurde, was für diesen Fall eine dominante Funktion zu Gunsten der Acetylierung gegenüber der des PI3K/Akt Signalweges vermuten lässt (van der Horst et al., 2004).

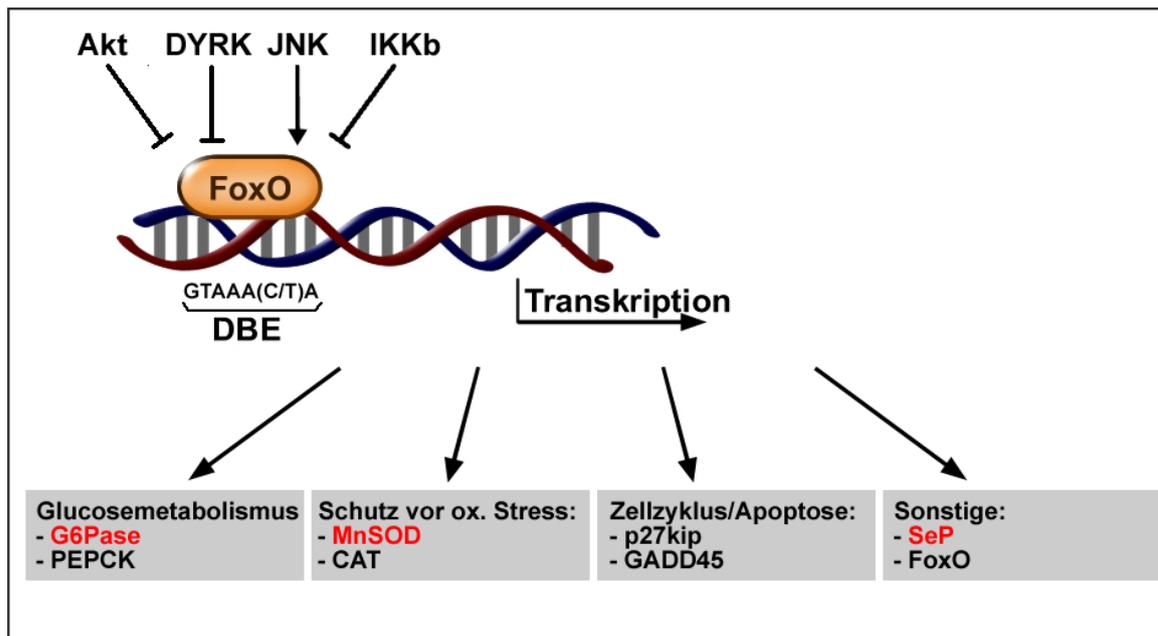


Abb. 1.3: Posttranslationale Modulation von FoxO-Proteinen und Auswahl einiger Zielengruppen

Die transkriptionelle Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren wird z. B. über Akt, DYRK, JNK und IKKb reguliert. Dementsprechend findet eine verringerte oder vermehrte Expression der Zielgene statt. Die in rot dargestellten Zielgene (Glucose-6 Phosphatase (G6Pase), Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) und Selenoprotein P (SeP)) werden in dieser Arbeit betrachtet.

1.1.5 FoxO-Proteine und Co-Regulatoren

In den vergangenen Jahren ergaben sich Hinweise, dass FoxO-Proteine die Regulation von Zielgenen auch über direkte oder indirekte Interaktion mit anderen Proteinen bewirken.

Eine 52 Aminosäuren umfassende Sequenz am N-terminalen Ende von FoxO3a konnte zunächst als für die Bindung des transkriptionellen Coaktivators p300 (vgl. vorangegangener Abschnitt) hinreichend beschrieben werden (Mahmud et al., 2002). In einer weiteren Studie konnte diese Domäne von FoxO3a kürzlich näher spezifiziert werden. Vor allem die Aminosäuren L620 bis A635 wurden dort als für die Interaktion der beiden Proteine verantwortlich beschrieben (Wang et al., 2009).

Auch für den Coaktivator Peroxisom Proliferator aktivierter Receptor- γ Coaktivator-1 α (PGC-1 α), der beispielsweise die β -Oxidation der Fettsäuren oder auch die Glukoneogenese in der Leber reguliert (Herzig et al., 2001; Puigserver et al., 2003; Rhee et al., 2003), konnte eine Interaktion mit FoxO-Proteinen beschrieben werden (Puigserver et al., 2003). Die FoxO-regulierte Aktivität eines SeP-Promotorkonstruktes konnte bei gleichzeitiger Überexpression von PGC-1 α nochmals gesteigert werden (Speckmann et al., 2008).

Die Beteiligung von PGC-1 α an der Expressionsregulation von (FoxO-)Zielgenen, die für Proteine codieren, die für den Schutz vor ROS sorgen, konnte in murinen Endothelzellen und Fibroblasten dadurch gezeigt werden, dass die Expression dieser Zielgene bei gleichzeitiger Abwesenheit des Coregulators PGC-1 α stark verringert (Olmos et al., 2009).

Mittels Reporteranalysen sowie Co-Immunopräzipitationen wurde die direkte Interaktion von FoxO-Proteinen und β -Catenin nachgewiesen. β -Catenin ist ein wichtiges Signalmolekül innerhalb des Wnt (wingless Int)-Signalweges. Mutationen, die zu einer gesteigerten Aktivität von β -Catenin führen, erhöhen das Risiko zur Entwicklung einer Krebserkrankung. Die gleichzeitige Überexpression von FoxO und β -Catenin führte zu einer erhöhten Aktivität von Promotoren einiger FoxO-Zielgene. Der Verlust des β -Catenin-Orthologs BAR-1 in *C. elegans* führte zu einer verringerten Aktivität von DAF-16 bei Induktion von oxidativem Stress durch Paraquat (Essers et al., 2005).

Weitere Beispiele für Co-Regulatoren sind der nukleäre Rezeptor SHP (orphan nuclear receptor small heterodimer partner) (Yamagata et al., 2004) sowie der Leber-spezifische Transkriptionsfaktor HNF-4 (Hirota et al., 2003; Speckmann et al., 2008).

Umgekehrt werden auch inhibitorische Eigenschaften von FoxO-Proteinen diskutiert; so ergaben sich kürzlich Hinweise auf eine Hemmung von NF κ B durch FoxO4, da sowohl die NF κ B-Proteinspiegel als auch die NF κ B-DNA-Bindungsaktivität in FoxO4 Knock-out-Mäusen signifikant erhöht waren (Zhou et al., 2009).

1.1.6 Die Rolle von FoxO-Proteinen in Alterungsprozessen

Insbesondere Untersuchungen an den Modellorganismen *C. elegans* und *D. melanogaster* haben dazu beigetragen die Funktion der FoxO-Transkriptionsfaktoren in Bezug auf Alterungsprozesse zu verstehen. Der funktionelle Verlust von DAF-2 (Ortholog des Insulinrezeptors) oder AGE-1 (Ortholog der PI3K) oder die Überexpression von DAF-16 in *C. elegans* führten zu einer signifikanten Erhöhung der Lebensspanne und induzierten den Übergang in den sogenannten Dauer-Zustand, der mit einer Art Stillstand in der Entwicklung vergleichbar ist und in dem die Nematoden schwierige Bedingungen über„dauern“ können (Vanfleteren und Braeckmann, 1999; Burnell et al., 2005).

Auch die Gruppe der Sirtuine ist an der Regulation der Aktivität von FoxO-Proteinen beteiligt. Sirtuine wiederum werden durch Kalorienrestriktion und oxidativen Stress stimuliert, was ebenfalls zu einer erhöhten Lebensspanne führt.

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und Schwermetalle

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen innerhalb der Zelle unter anderem durch die Vorgänge an der mitochondrialen Atmungskette. Durch die Mitochondrien entsteht aus ca. 1-2% des dort verbrauchten intrazellulären Sauerstoffs (Chance und Williams, 1956) zunächst Superoxid, das spontan zu Wasserstoffperoxid disproportioniert, was durch Superoxiddismutasen (SOD) beschleunigt wird. Die Disproportionierung des Wasserstoffperoxids wird durch die Catalase katalysiert (Chance et al., 1979). Superoxid reagiert weiterhin mit Stickstoffmonoxid in einer diffusionskontrollierten Reaktion unter Bildung von Peroxynitrit (ONOO^- ; Radi et al., 1991; Radi et al., 1991a), einem stark oxidierenden und nitrierenden Agens. In sich anschließenden Reaktionen kann es zur Generierung von Stickstoffradikalen kommen, die als reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS) bezeichnet werden.

Der so entstehende Gehalt zellulär gebildeter ROS wird durch Schutzsysteme antagonisiert. Dieses Fließgleichgewicht zwischen Bildung und Eliminierung von ROS kann zu Gunsten der Oxidantien ausgelenkt werden, wodurch es durch die nun überwiegenden schädigenden Auswirkungen zu oxidativem Stress kommt (Sies, 1986 und 1997).

Nicht nur die Reaktionen der Atmungskette führen in Zellen zu oxidativem Stress, sondern auch die Behandlung von Zellen mit Metallionen. Aufgrund ihrer Natur, leicht oxidier- oder reduzierbar zu sein, sind auch Metallionen in der Lage, intrazelluläre ROS zu bilden. Belegt werden konnte dies unter anderem mit „Spin Trapping“ Experimenten, bei denen der Nachweis von kurzlebigen Radikalen durch Addition an Moleküle, den „spin traps“, durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) der Abfangprodukte erfolgt. So werden durch Behandlung mit Eisenionen durch Oxidation von Cysteinmolekülen Hydroxylradikale gebildet (Searle und Tomasi, 1982). Auch die Oxidation von Thiolgruppen, wie sie in Proteinen oder im Tripeptid Glutathion (GSH) vorkommen, wird durch Kupfer- oder Eisenionen katalysiert. Dies geht ebenfalls mit der Bildung von Superoxid bzw. Wasserstoffperoxid einher (Misra, 1974).

Eine große Bedeutung kommt Metallionen für strukturelle, regulatorische oder katalytische Zentren in Proteinen zu. So besitzt die Cu,Zn-SOD im katalytischen Zentrum ein Kupferion, dessen Wechsel zwischen Cu(I) und Cu(II) die Disproportionierung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff ermöglicht. Dasselbe Protein enthält auch ein Zinkion, dessen Funktion offenbar in der Stabilisierung des Proteins liegt. Auf ähnliche Weise dienen Zinkionen als Strukturelemente von Transkriptionsfaktoren der Familie der Zinkfingerproteine. Auch die direkte Hemmung von Proteinen durch Metallionen wurde beschrieben, wie beispielsweise die Hemmung der Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase durch Zink- und Kupferionen (Krotkiewska und Banas, 1992).

Sowohl ROS, deren Bildung durch Metallionen initiiert werden kann, als auch Metalle selbst können innerhalb der Zelle Signalwege aktivieren (Barthel et al., 2007).

Auch die Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie bleiben von einer Behandlung von Zellen mit Schwermetallionen nicht unbeeinflusst. Kupfer- sowie Zinkionen üben einen „insulinmimetischen“ Effekt durch Aktivierung der Proteinkinase Akt und folgende Phosphorylierung der FoxO-Proteine aus (Walter et al., 2006).

1.3 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind ubiquitär in der Umwelt zu finden. Der einfachste Vertreter dieser Klasse, das Naphthalin, war früher Bestandteil von Mottenkugeln. Heute wird es fast nur noch zur Synthese von Azofarbstoffen oder Phtalsäureanhydrid verwendet. Insgesamt sind über 500 verschiedene PAK in der Umgebungsluft vorhanden, die meist in Verbrennungsprozessen aus Industrie und Kraftfahrzeugen entstehen. Der größte Anteil kommt dem Phenanthren zu – in einer innerstädtischen Studie in Stockholm Mitte der 90er Jahre kam dieses PAK auf einen Anteil von 24% des PAK-Gesamtgehaltes, das entspricht etwa $50\text{-}60\text{ ng m}^{-3}$ (Boström et al., 2002). Benzo(a)pyren (B(a)P) dient bei solchen Messungen zur Luftverschmutzung oft als typischer Vertreter und Referenz, auch wenn der Gesamtgehalt dieses PAK nur bei ca. 2 ng m^{-3} liegt.

3-Methylcholanthren (3-MC) kommt als umweltbelastendes PAK keine Bedeutung zu, jedoch wird es aufgrund seiner Kanzerogenität in Tiermodellen häufig zur Erzeugung von Tumoren verwendet.

Die Belastung mit PAK wie Benzo(a)pyren steht im Zusammenhang mit der Entwicklung von Krebs (Boffetta et al., 1997; Sasco et al., 2004). B(a)P und andere PAK werden zunächst durch Cytochrom P450 (Cyp) Monooxygenasen zu Phenolen und Epoxiden metabolisiert und aktiviert (Nebert et al., 2000 und 2004). Durch zahlreiche Xenobiotika wie PAK und ihre halogenierten Derivate wird insbesondere die Expression der Cyp-Isoform 1a1 induziert. Als die Transkription des Cyp1a1-Gens regulierendes Promotorelement wurde unter anderem das sogenannte XRE (xenobiotic response element) identifiziert, das in PAK-responsiven Genen in Säugerzellen ca. 1 kb stromaufwärts vom Transkriptionsstart zu finden ist (Hines et al., 1988). Die Kernsequenz des XRE bildet die Basenfolge 5'-TCACGC-3'.

Der cytosolische Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) gehört zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren der „Basic-helix-loop-helix/Period aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/single minded“ [bHLH/Per-ARNT-Sim (PAS)] Familie (Crews und Fan, 1999). Liganden wie 3-MC und B(a)P diffundieren durch die Plasmamembran in das Cytosol, binden an den AhR und aktivieren diesen. In nicht aktiviertem Zustand liegt der AhR als Multi-Protein-Komplex vor, assoziiert mit zwei Molekülen des Hitzeschockproteins HSP90, dem Hepatitis B Virus-X-assoziierten Protein 2 (XAP2) und p23 (Perdew, 1988; Meyer et al., 1998; Kazlauskas, 1999). Nach der Bindung des Liganden an den AhR kommt es zu einer Translokation des Rezeptors in den Zellkern, wobei HSP90 abgespalten wird. Es erfolgt stattdessen die Bildung eines Heterodimers mit ARNT (dem AhR nukleären Translokator). Dieser Komplex ist für die transkriptionelle Regulation der Zielgene über die Bindung an die XRE-Konsensussequenz verantwortlich (Mimura et al., 1999).

Nicht nur die „klassischen“, planaren aromatischen Kohlenwasserstoffe sind Liganden des AhR und induzieren dadurch die Expression von CYP1a1. Es konnte gezeigt werden, dass auch Flavone wie 3-Methoxy-4-nitroflavon (MNF) an den AhR binden, diesen jedoch nicht aktivieren, sondern inhibieren (Henry et al., 1999). Auch (-)-Epigallocatechingallat, ein Catechin, das in grünem Tee vorkommt, konnte die TCDD induzierte Cyp1a1 Expression, sowie die Bindung des AhR an die DNA, verhindern (Williams et al., 2000).

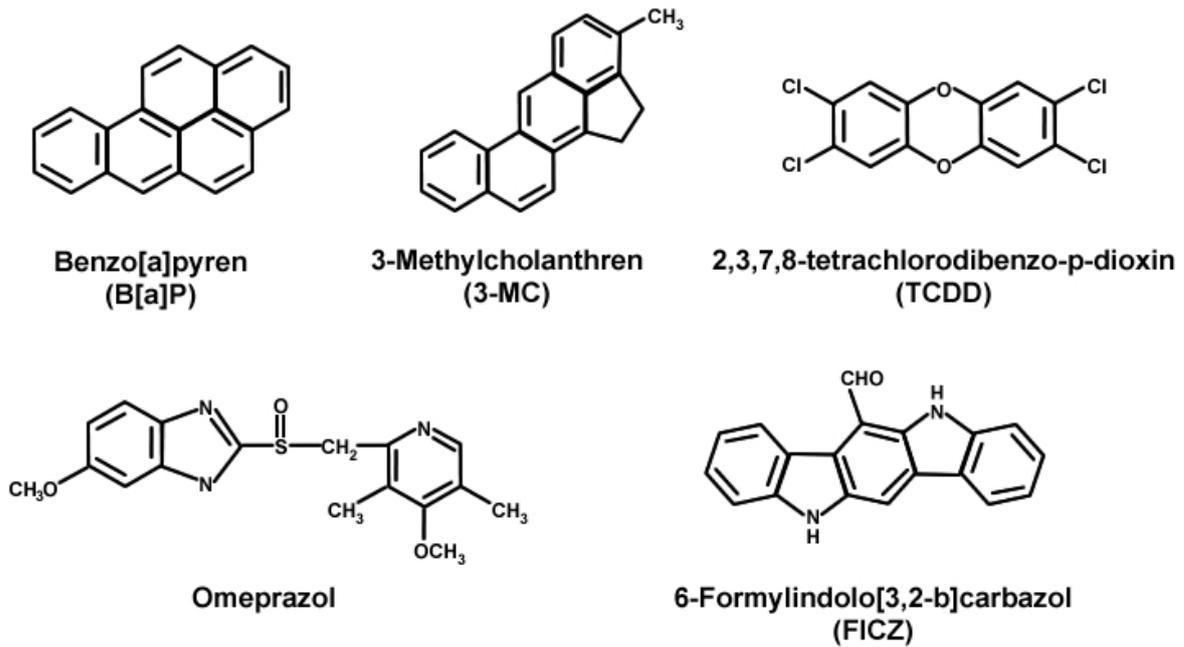


Abb. 1.4 Strukturformeln einiger AhR-Liganden

Benzo[a]pyren und 3-Methylcholanthren sowie TCDD gehören zu den klassischen AhR Agonisten. Omeprazol wird als Protonenpumpenhemmer gegen Sodbrennen eingesetzt, FICZ wird aus Tryptophan nach Beteiligung von UV-Strahlung gebildet.

Die PAK B(a)P und 3-MC führen in murinen Hepatomzellen zu oxidativem Stress. Dosisabhängig erfolgte ein Anstieg der Lipidoxidation, auch wenn ein signifikanter Anstieg der Bildung von H_2O_2 erst bei einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ B(a)P nachgewiesen wurde (Elbekai et al., 2004).

Auch Schwermetallionen können im weitesten Sinne als xenobiotische Substanzen betrachtet werden. In der Tat zeigten einige Untersuchungen, dass die Expression von Cyp1a1 auf transkriptionellem und posttranskriptionellem Weg durch Schwermetalle moduliert wird (Korashy et al., 2004 und 2006).

Zu den nicht-klassischen AhR-Agonisten gehört das Carbazol 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ), das aus zwei Molekülen Tryptophan nach UVB-Strahlung gebildet wird. Bereits 1987 wurden Photoprodukte des Tryptophans als AhR-affin beschrieben, jedoch konnte 1995 gezeigt werden, dass FICZ die stärkste Affinität aufweist (Rannug et al., 1987; Rannug et al., 1995).

1.4 Fragestellung

FoxO-Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression zentraler Proteine und Enzyme die z. B. den Glucosemetabolismus und die Abwehr gegen oxidativen Stress betreffen. Die transkriptionssteigernde Aktivität der FoxO-Proteine wird nicht nur durch den physiologischen Stimulus Insulin inhibiert, sondern auch durch insulinmimetische Wirkung von Umweltfaktoren wie z. B. Schwermetallionen. Die durch Phosphorylierung von FoxO-Proteinen durch die Proteinkinase Akt induzierte Hemmung geht mit der Translokation der FoxO-Faktoren vom Zellkern ins Cytoplasma einher.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von Umweltnoxen auf Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie untersucht. Es sollte analysiert werden, ob

- (i) cytotoxische oder oxidierende Effekte bei der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch Kupfer- und Nickelionen eine Rolle spielen und ob unter diesen Bedingungen eine Modulation von FoxO-Proteinen stattfindet,
- (ii) die transkriptionssteigernde Aktivität von FoxO-Faktoren sowie die Expression von Zielgenen in Hepatomzellen unter Einfluss von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen oder eines Carbazols moduliert wird und
- (iii) eine Veränderung der Expression der FoxO-Isoformen 1a, 3a und 4 durch Umwelteinflüsse auf Ebene der mRNA-Spiegel nachweisbar ist.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Die verwendeten Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer MilliQ-Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Die Einmalgebrauchsmaterialien der Zellkultur wurden von der Fa. Greiner Bio-One (Frickenhausen) bezogen.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Stammhaltung und Anzucht

Humane Hepatomzellen (HepG2) wurden in

- DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s Medium; PAA, Pasching, Österreich) mit 4500 mg l⁻¹ Glucose, 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum), 2 mM Glutamax, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren und 1% Penicillin/Streptomycin

kultiviert.

Bei Abwesenheit von FBS wurde dieses Komplettmedium jeweils als serumfreies Medium bezeichnet.

HaCaT (immortalisierte humane Keratinozyten aus der distalen Peripherie eines Melanoms) wurden in

- DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s Medium) mit 1000 mg l⁻¹ Glucose, 10% (v/v) FBS, 2 mM Glutamax und 1% Penicillin/Streptomycin

herangezogen.

Alle Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% (v/v) Kohlenstoffdioxid kultiviert.

Zum Passagieren wurden die Zellen zu einer 70-90%-igen Konfluenz herangezogen. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit PBS (2,6 mM KCl; 1,4 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 6,4 mM Na₂HPO₄; pH 7,4) vorsichtig gewaschen. Mit ca. 17 µl Trypsin-EDTA in PBS (0,5 g/l Trypsin) je cm² Zellrasen wurden die Zellen abgelöst. Die Trypsinierung wurde nach 3-10 Minuten durch Zugabe des Komplettmediums gestoppt.

Die Zellen wurden resuspendiert und in entsprechendem Verhältnis in Kulturflaschen oder -schalen überführt.

2.1.2 Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen (in der Regel monatlich) erfolgte die Überprüfung der verwendeten Zellen auf Kontamination mit Mykoplasmen. Der parasitäre Befall der Zellen mit Mykoplasmen (zellwandlose, jedoch von einer Cytoplasmamembran umgebene Bakterien) kann zu erheblichen Veränderungen der Proliferation und zu veränderten Reaktionen auf externe Stimuli führen. Zur Detektion von Mykoplasmen wurde 200 µl Zellkulturüberstand abgenommen und mittels des VenorGeM Mykoplasmen-Nachweis-Kits (Minerva Biolabs, Berlin) nach Angaben des Herstellers analysiert. Die verwendeten Zellen waren für die dargestellten Ergebnisse Mykoplasmen-negativ.

2.1.3 Konservierung und Revitalisierung von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden rasch aufgetaut und in eine 75 cm² Kulturflasche mit Kompletmedium überführt. Bei gutem Anwuchs der Zellen nach ca. 3-6 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen.

Zum Einfrieren wurde nach dem Abstoppen der Trypsinierung (s. 2.1.1) die Zellsuspension bei 800 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (Kompletmedium mit insgesamt 20% (v/v) FBS und 10% (v/v) DMSO) resuspendiert und in Kryogefäßen bei -80°C eingefroren. Dabei wurden Zellen einer 175 cm² Kulturflasche auf drei Kryogefäße aufgeteilt.

2.1.4 Behandlung von Zellen

HepG2-Zellen wurden in 30 mm-Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70-90% herangezogen. 24 h nach der Aussaat wurde das Kompletmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und erneut 24 h in Medium ohne FBS kultiviert. Zur Behandlung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit circa 1 ml PBS vorsichtig gewaschen. Nach Abnahme des Waschpuffers erfolgte die Behandlung der Zellen mit Schwermetallionen unterschiedlicher Konzentrationen und für unterschiedliche Zeitspannen in HBSS

(Hank's balanced salt solution). Verwendet wurden unterschiedliche Konzentrationen der Schwermetallsalze NiSO_4 und CuSO_4 . Nach der Behandlung wurde die Lösung abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Lysiert wurde mit 100 μl 2x Laemmli-Probenpuffer (0,125 M Tris/HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerol; 100 mM Dithiothreitol; 0,02% Bromphenolblau). Die Lysate wurden bei -20°C gelagert. Als Positivkontrolle für die Aktivierung von PI3K/Akt wurde Insulin (100 nM; Roche, Mannheim) in HBSS verwendet.

Zur Bestimmung des Glutathion- bzw. Glutathiondisulfidspiegels (2.9) wurden die Zellen auf 79 cm^2 Zellkulturschalen kultiviert und wie oben beschrieben mit Schwermetallsalzen behandelt.

Für die Behandlung mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) sowie 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) wurden die Zellen in Kulturschalen unterschiedlicher Größe herangezogen. 24 h nach der Aussaat wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS für weitere 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Behandlung mit PAK oder FICZ erfolgte in serumfreiem Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen für verschiedene Zeitspannen, wobei DMSO (0,1%) als Lösemittelkontrolle diente.

Transient transfizierte Zellen für Reportergentests oder fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsuntersuchungen wurden 24 h nach der Transfektion vom Medium befreit und mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Behandlung mit PAK oder FICZ bzw. DMSO (0,1%) als Lösemittelkontrolle in serumfreiem Medium. Bis zur Lyse/Betrachtung wurden die Zellen für 2-18 h inkubiert.

Zur Ermittlung der mRNA Spiegel wurden HepG2 Zellen in 6 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Die Zellen wurden nach der Behandlung für 8 oder 18 Stunden in RLT- β -Mercaptoethanol-Puffer (Qiagen) lysiert und die Gesamt-RNA wurde wie in 2.8 beschrieben isoliert.

Für DNA-Bindungsexperimente wurden HepG2 Zellen bis zu einer Konfluenz von circa 80% in 79 cm^2 Zellkulturschalen herangezogen. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach Abnahme des Puffers für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Behandlung mit Schwermetallionen, Insulin, PAK oder FICZ erfolgte wie oben beschrieben.

2.1.5 Cytotoxizitätstests

2.1.5.1 Neutralrot-Inkorporation

Die in 24-well-Platten kultivierten Zellen wurden, nach entsprechender Behandlung mit Nickel- und Kupferionen unterschiedlicher Konzentrationen und Postinkubation mit DMEM ohne FBS, vom Medium befreit und mit PBS gewaschen. Nach Abnahme des Waschpuffers wurden 500 µl Neutralrot-Medium [0,5 ml Neutralrotlösung (Sigma; 3,3 g l⁻¹ PBS) ad 100 ml DMEM ohne FBS] pro well zugegeben und 1 h inkubiert. Nach Entfernen des Neutralrot-Mediums wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Durch leichtes Schütteln mit 500 µl Fixierlösung (50 ml Ethanol p.a.; 1 ml Essigsäure 100%; 49 ml H₂O) pro well für mindestens 4 h bei 4°C wurde der Farbstoff aus den Zellen entfernt. Die Proben wurden bei 4°C bis zur Messung der Extinktion ($\lambda = 405$ nm; Referenz: $\lambda = 550$ nm) verwahrt.

Der Test liefert eine unmittelbare Aussage zur Vitalität der behandelten Zellen, da nur lebende Zellen den Farbstoff inkorporieren. Als fettlösliches Molekül wird Neutralrot in den Liposomen der Zellen gespeichert. Als Nullwert diente die Fixierlösung und als 100%-Wert der von unbehandelte Zellen.

2.1.5.2 Zellkoloniebildungs-Tests

Zur Analyse der Proliferationsfähigkeit wurden HepG2 Zellen in 6-well Platten bis zu einer Konfluenz von 70-90% herangezogen. 24 Stunden vor der Behandlung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium kultiviert. Die Behandlung mit CuSO₄ und NiSO₄ erfolgte wie in 2.1.4 beschrieben in HBSS für 60 Minuten. Nach Beendigung der Behandlungsdauer wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/well von den Kulturschalen abgelöst. Die Reaktion wurde mit Kompletmedium abgestoppt. Die Zahl der Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 auf 10 cm Kulturschalen ausgebracht und 11 Tage kultiviert, wobei nach 6 Tagen ein Mediumwechsel erfolgte. Die Kolonien wurden mit PBS gewaschen und mit Kristallviolett-Lösung [0,2% (w/v) in 20% (v/v) Ethanol] für 30-90 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Die Kristallviolett-Lösung wurde verworfen, die Zellkulturschalen mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen an der Luft Zellkolonien gezählt.

2.1.6 Transiente Transfektion von Zellen

Für die transiente Transfektion von HepG2-Zellen wurden die Zellen in 30 mm Kulturschalen (für fluoreszenzmikroskopische Experimente wurden die Zellen auf Glasplättchen ausgebracht) bis zu einer Konfluenz von ca. 60% in Kompletmedium kultiviert.

Als Transfektionsreagenz für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurde Nanofectin (PAA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden die Zellen mit 3 µg pEGFP-FoxO1a-Plasmid und 12 µl Nanofectin (PAA) 24 h nach der Aussaat transfiziert.

Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS vorsichtig gewaschen. Nach Abnahme des Waschpuffers wurden die Zellen mit PAK oder FICZ in serumfreiem Medium für 2 Stunden inkubiert. Die subzelluläre Lokalisation von EGFP-gekoppelten Proteinen wurde an einem inversen Fluoreszenzmikroskop „Axiovert D1“ (Zeiss, Göttingen) verfolgt. Als Negativkontrolle diente DMSO (0,1%) und als Positivkontrolle wurde Insulin (100 nM) verwendet.

Für Luziferase-Reportergenversuche (2.7) eignete sich Polyfect (Qiagen, Hilden) besser, das nach den Angaben des Herstellers verwendet wurde. Die Transfektion von HaCaT Zellen erfolgte mit Lipofectamin2000 (Invitrogen), das nach Angaben des Herstellers verwendet wurde.

Dazu wurden die Zellen mit 0,75 µg Reporterplasmid, 0,75 µg Expressionsvektor und 0,1 µg pRL-SV40 24 h nach der Aussaat transfiziert. Eine Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide gibt Tabelle 2.1 wieder.

Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 24 h bei 37°C bis zur 18-stündigen Behandlung mit PAK oder FICZ inkubiert.

Tab. 2.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pEGFP-FoxO1a	FoxO1a cDNA in pEGFP-c1; Resistenzen: Kan ^a , Neo ^a	Kortylewski et al., 2003 ^b
FoxO1a	FoxO1a cDNA in p-Alter MAX	Guo et al., 1999 ^c

	(Kontrolle: CMV-Promotor); Resistenz: Cm ^a	
HA-FoxO3a WT	FoxO3a cDNA in pECE; Resistenz: Amp ^a	Addgene, Cambridge, MA, USA; Plasmid 1787 ^d
FoxO4	FoxO4 cDNA in pcDNA6.2/nLumio-DEST ^e ; Resistenz: Amp	Essers et al., 2004; bzw. diese Arbeit ^e
pRL-SV40	Codiert die Luziferase aus Renilla reniformis Resistenz: Amp	Promega, Mannheim
pCI-Neo	Leervektor mit CMV-Promotor; Resistenzen: Amp, Neo	Promega
SeP-luc (BK4GL3)	-1808/-14 SeP-Promotor in pGL3-basic; Resistenz: Amp	Dreher et al., 1997; Mostert et al., 2001 ^f
SePMut1-luc	-349G(C)-Mutante von SeP-luc; Resistenz: Amp	Walter et al., 2008
SePMut2-luc	-110C(G)-Mutante von SeP-luc; Resistenz: Amp	Walter et al., 2008
SePMut1/2-luc	-349G(C) und -110C(G)-Mutante von SeP-luc; Resistenz: Amp	Walter et al., 2008
SeP234-luc	-234/-14 SeP-Promotor-Fragment in pGL3-basic; Resistenz: Amp	Walter et al., 2008
SePMut3-luc	-144T(G)/-143G(T)/-140C(A)/-139T(G)/-137T(G)/-136G(T)/-133C(A)-Mutante von SeP-luc; Resistenz: Amp	Speckmann et al., 2008 ^g
SePMut4-luc	-144T(G)/-143G(T)/-140C(A)/-139T(G)/-137T(G)/-136G(T)/-133C(A)-und -110C(G)-Mutante von SeP-luc; Resistenz: Amp	Speckmann et al., 2008 ^g
FHRE-luc	3 Kopien des FoxO-responsiven	Addgene, Plasmid 1789 ^d

	Elements in pGL3-basic; Resistenz: Amp	
G6Pase-luc	-1227/+57 des G6Pase-Promotors in pGL3-basic; Resistenz: Amp	Schmoll et al., 1996 ^b
MnSOD-luc	-3340/+260 des MnSOD-Promotors in pGL3-basic; Resistenz: Amp	Kim et al., 1999 ^h

- ^a Abkürzungen: Amp: Ampicillin; Kan: Kanamycin; Neo: Neomycin; Cm: Chloramphenicol
- ^b Freundlicherweise von PD Dr. A. Barthel (BG Kliniken Bergmannsheil, Bochum) zur Verfügung gestellt
- ^c Freundlicherweise von Dr. D. Schmoll (Sanofi-Aventis, Frankfurt) zur Verfügung gestellt
- ^d über Addgene freundlicherweise von Dr. M. Greenberg (Children's Hospital, Boston, MA, USA) bereitgestellt
- ^e Ein FoxO4 (AFX) Expressionsplasmid wurde freundlicherweise von Prof. B. M. T. Burgering (UMC Utrecht, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Ein Sall/NotI Fragment dieses Plasmids wurde unter Zuhilfenahme des pENTR3c-Vektor-Systems (Invitrogen) unter Benutzung der LR-Clonase (Invitrogen) in den Zielvektor pcDNA6.2/nLumio-DEST (Invitrogen) kloniert. Diese Klonierungsarbeiten wurden freundlicherweise von Elisabeth Sauerbier übernommen.
- ^f Freundlicherweise von Prof. Dr. J. Köhrle (Charité, Berlin) und Dr. Josef Abel (IUF, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt
- ^g Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Bodo Speckmann (HHU Düsseldorf)
- ^h Freundlicherweise von Prof. B. M. T. Burgering (UMC Utrecht, Niederlande) zur Verfügung gestellt

2.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Für Transfektionen wurde aus einer 250 ml E. coli-Kultur größere Mengen Plasmids mittels des „Endotoxin-free Plasmid DNA Maxi-Kit“ (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dafür wurde die Kultur zuvor in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 3290xg für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte spektrometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Die Berechnung erfolgte aufgrund der Annahme, dass 50 µg/ml doppelsträngiger DNA einer Extinktion von eins entsprechen.

Alle Medien für die Anzucht von E. coli-Stämmen wurden vor der Verwendung bei 121°C und 200 kPa autoklaviert. Zuvor sterilfiltrierte Antibiotika zur Selektion der Bakterien wurden den Medien im abgekühlten Zustand zugefügt.

LB-Medium (Sambrook et al., 1989):

- 10% (w/v) Trypton
- 5% (w/v) Hefeextrakt
- 5% (w/v) NaCl

Agarplatten:

- 18% (w/v) Agar
- In LB-Medium

SOC-Medium (pH 7):

- 0,5 g NaCl
- 20 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 2,5 ml KCl (1 M)
- ad 970 ml dH₂O

Vor Gebrauch Zugabe von:

- 10 ml MgCl₂ (1 M)
- 20 ml Glucose (1 M)

Slant 50:50

- 5 g Trypton
- 2,5 g Hefeextrakt
- ad 250 ml dH₂O
- 250 ml 96%-Glycerin

Antibiotika

- Ampicillin: 100 µg ml⁻¹
- Chloramphenicol: 34 µg ml⁻¹
- Kanamycin: 30 µg ml⁻¹

Die Anzucht der Bakterien erfolgte zunächst als Vorkultur in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen. Dazu wurden die Bakterien (einige µl aus Gefrierkulturen oder Einzelkolonien von Transformationsplatten) in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C und 200 UpM

bebrütet. Darauf wurde die Hauptkultur in 250 ml LB-Medium für 6-8 Stunden bei 37°C und 200 UpM inkubiert.

Herstellung von E. coli Gefrierkulturen:

Zur Herstellung von Gefrierkulturen wurde die Vorkultur für 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Slant 50:50 re-suspendiert. Die Gefrierkultur wurde in Kryogefäßen bei -80°C gelagert.

2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem von U. K. Laemmli entwickelten diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli, 1970). Ein engporiges Trenngel wird von einem weitporigen Sammelgel überschichtet. Durch die negative Ladung des SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und die Proteine bewegen sich aufgrund ihrer negativen Ladung durch das Gelsystem. Nach der Fokussierung im Sammelgel erfolgt die Auftrennung der Proteine aufgrund ihrer Größe (Mobilitätsunterschiede) im Trenngel.

Die in 2x-Laemmli-puffer lysierten Proben wurden sonifiziert, um die auf genomische DNA zurückzuführende Viskosität der Proben zu verringern, für 1-5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelapparatur („Novex Mini Cell“, Invitrogen, Karlsruhe) in Elektrophoreselaufpuffer durchgeführt. Die maximal verwendete Stromstärke lag bei 40 mA/Gel.

4x Laemmli-Probenpuffer:

250 mM Tris-HCl (pH 8)

20% (w/v) Glycerol

5% (w/v) SDS

0,01% (w/v) Bromphenolblau

100 mM DTT (Dithiothreitol)

Elektrophoreselaufpuffer:

100 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS (pH 6,9)

Trenngel, 10% (w/v) Acrylamid:

4 ml dH₂O
2,7 ml Trenngelpuffer
3,3 ml PAA Stammlösung
31 µl APS
2,5 µl TEMED

Sammelgel, 2% (w/v) Acrylamid:

2,3 ml dH₂O
0,75 ml Sammelgelpuffer
0,63 ml PAA (Polyacrylamid) Stammlösung
31 µl APS
2,5 µl TEMED

PAA Stammlösung:

30% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Trenngelpuffer (2,5x):

0,25% (w/v) SDS
1,9 M Tris (pH 8,9)

Sammelgelpuffer:

0,5% (w/v) SDS
0,3 M Tris (pH 6,7)

APS:

10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

2.4 Immunodetektion von Proteinen

Die Proteine wurden zunächst auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)- oder Nitrocellulosemembran (Amersham, Braunschweig) transferiert, um sie dann in einem indirekten Enzymimmuno-Test nachzuweisen.

2.4.1 Elektrotransfer auf Membranen (Western Blot)

Mittels des „Novex-Mini-Cell-Tank-Blot-Moduls“ (Invitrogen) wurden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran elektrotransferiert und somit immobilisiert. Pro Gel wurden zwei 3 mm starke Blottingpapiere, eine dem Gel in der Größe entsprechende Membran und einige Schwämme benötigt. Die Blottingpapiere und Schwämme wurden in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,5) etwa 30 Minuten äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 60 Sekunden in Methanol, danach ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Die Nitrocellulosemembran wurde zunächst 15 Minuten in dH₂O und danach 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert.

Für den Aufbau wurden 2 mit Transferpuffer vollgesogene Schwämme auf die Kathode gelegt, darauf folgte ein Blottingpapier, das Gel, die Membran, wieder ein Blottingpapier und ein Schwamm. Um die Apparatur zu füllen, wurde entweder mit einem zweiten Gel ebenso verfahren oder die Apparatur wurde mit in Transferpuffer getränkten Schwämmen gefüllt. Beim Positionieren der Gele und Membranen wurde darauf geachtet, dies möglichst luftblasenfrei zu tun, um Transferfehler zu vermeiden. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer bei 20 V für 2 Stunden (PVDF-Membran) oder 14 V für 100 Minuten (Nitrocellulose-Membran).

Zur Überprüfung des Transfers kann die Membran 1 Minute in Ponceau S Lösung [5% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) Ponceau S] gefärbt werden. Die Proteinbanden erhalten eine stärker rötliche Färbung als die restliche Membran, wodurch Transferfehler gut zu erkennen sind. Die Färbung kann durch Waschen mit TBS/T rückgängig gemacht werden.

2.4.2 Immunodetektion

Alle nachstehend aufgeführten Waschschriffe wurden, wenn nicht anders angegeben, bei RT unter leichtem Schütteln durchgeführt.

Nach dem Transfer wurden die Membranen 10 Minuten in TBS/T gewaschen und danach für 45-60 Minuten bei RT unter leichtem Schütteln mit TBS/T + 5% (w/v) Milchpulver geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C.

In Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper zusammengefasst.

Die Membranen wurden im Anschluss zunächst zweimal mit TBS/T gespült und dann 15-45 Minuten unter dreimaligem TBS/T-Wechsel gewaschen. Daraufhin wurden die Membranen mit dem entsprechenden sekundären Antikörper-HRP-Konjugat (Tabelle 2.2) für eine Stunde inkubiert. Nachfolgend wurde wiederum zweimal mit TBS/T gespült und 15-45 Minuten unter dreimaligem TBS/T Wechsel gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Über die an dem Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase (HRP) konnte das Protein nun mittels des „SuperSignal West Pico Chemiluminescent“ Substrats (Pierce, Rockford, USA) detektiert werden. Das Substrat wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Dokumentation erfolgte durch das Belichten eines Röntgenfilms (Amersham, München).

TBS-Puffer:

20 mM Tris
137 mM NaCl
pH 7,6

TBS/T-Puffer:

0,1% (v/v) Tween 20 in TBS

Tab. 2.2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Primäre Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
Anti-phospho-Akt (S473)	Cell Signaling Technology	1:1000 ^a
Anti-phospho-FoxO1a/FoxO3a (T24/T32)	Cell Signaling Technology	1:1000 ^b
Anti-GAPDH	Millipore	1:5000 ^a
Anti-Total-FoxO1a	Barthel et al., 2001	1:10000 ^a
Anti-phospho-FoxO3a (T32)	Millipore	1:1000 ^a

Sekundäre Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
Anti-rabbit-HRP	Dianova	1:5000 ^a
Anti-mouse-HRP	Amersham	1:5000 ^a

^{a/b} Verdünnungen in TBS/T + 5% (w/v) Milchpulver (a) oder 5% (w/v) BSA (b)

2.4.3 Entfernung eines Antikörpers von der Membran

Um eine Membran mit einem weiteren Antikörper exponieren zu können, wurde die Methode des „Strippens“ angewandt. Dazu wurden die nach der Immunodetektion noch auf der Membran befindlichen Primär- und Sekundärantikörper durch die Zugabe eines Puffers entfernt. Im Anschluss wurde der Stripping Puffer entfernt und Reste durch zweimaliges, 10-minütiges Waschen mit TBS/T oder PBS/T [0,1% (v/v) Tween 20 in PBS] von den Membranen abgelöst. Darauf wurden die Membranen erneut, wie unter 2.4.2 beschrieben, geblockt und mit Antikörpern inkubiert.

Verwendet wurden folgende Puffer:

- „Restore Stripping Buffer“ (Pierce): Zugabe von 2 ml Puffer, Schütteln bei 37°C für 45 Minuten und Waschen mit TBS/T
- Glycin-Puffer (25 mM Glycin-HCl, pH 2, 1% (w/v) SDS): Zugabe von 5 ml Puffer, Schütteln bei RT für 30 Minuten und Waschen mit PBS/T.

2.5 Isolation von Zellkernen

Zur Isolation von Zellkernen für FoxO1a-DNA-Bindungsexperimente (2.6) wurden die Zellen nach der Behandlung (2.1.4) einmal mit eiskaltem PBS/PIB [5% (v/v) PIB in PBS] gewaschen und in 7 ml PBS/PIB abgekratzt.

PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer):

125 mM NaF

250 mM β -Glycerophosphat

250 mM Para-Nitrophenylphosphat (PNPP)

25 mM NaVO₃

Die Zellen wurden in ein vorgekühltes 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 300xg bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml hypotonischen Puffer (HB, sterilfiltriert) resuspendiert.

HB (hypotonic buffer):

20 mM HEPES, pH 7,5

5 mM NaF

10 µM Na₂MoO₄

0,1 mM EDTA

Die Suspension wurde in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl 10% Nonidet P-40 und sorgfältigem Durchmischen wurde das Homogenat 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl Complete Lysis Buffer (im Lieferumfang des TransAM FKHR Kits enthalten) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis auf einem Schüttler inkubiert. Nach Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C für 10 Minuten wurde die Kernfraktion (Überstand) aliquotiert und bei -80°C verwahrt.

2.6 Bestimmung der DNA-Bindfähigkeit von FoxO1a

Die Aktivität von FoxO1a-Proteinen zur DNA-Bindung wurde mittels eines ELISA basierten Systems (TransAM FKHR, Active Motif, Rixensart, Belgien) gemäß den Angaben des Herstellers untersucht. Die Behandlung mit Schwermetallionen, PAK oder FICZ erfolgte wie in 2.1.4 beschrieben. Die Kerne wurden wie in 2.5 beschrieben isoliert. Die Proteinmenge in den isolierten Zellkernen wurde nach Angaben des Herstellers bestimmt (Coomassie Plus, Pierce) und 10 µg des Isolats in den Bindungs-Test eingesetzt.

2.7 Reportergenanalysen

Die Bestimmung von Luziferaseaktivitäten erfolgte über Lumineszenzmessung mit Hilfe des „Dual Luciferase® Reporter Assay System“ (Promega). Die in 30 mm-Kulturschalen transient transfizierten und behandelten Zellen wurden nach Entfernung des Mediums, Waschen mit PBS und Absaugen des Waschpuffers mit 100 µl 1x PLB („passive lysis buffer“; Promega) lysiert und bei -20°C bis zur Messung verwahrt.

In Mikrotiterplatten wurden 10 µl des Lysates mit 50 µl LAR II (Luciferase Assay Reagent II) gemischt. Dies startet den Umsatz des Substrates durch die firefly-Luziferase. Die resultierende Lumineszenz wurde notiert und durch Zugabe des S&G (stop & Glo®) Reagenz gequencht. Die verbleibende Lumineszenz betrug nun nur noch 0,0004%, so dass nun die auf Aktivität der Renilla Luziferase zurückgehende Lumineszenz gemessen und notiert werden konnte. Die Messungen erfolgten an einem Luminometer mit Injektionsapparat (Microplate Luminometer LB 96 V-Injektor; EG&G Berthold, Bad Wildbad) mit der zugehörigen Software.

2.8 RNA-Isolierung und quantitative Echtzeit-PCR

Die Total-RNA wurde aus behandelten Zellen (2.1.8) unter Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

1 µg der Total-RNA wurde in einem Gesamtvolumen von 40 µl unter zu Hilfenahme der „Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase“ (Roche Diagnostics) in die reverse Transkription als Matrize eingesetzt. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde in einem LightCycler (Roche Diagnostics) mittels des QuantiTect SYBR Green PCR Kits (Qiagen) mit 2 µl einer jeden cDNA Probe durchgeführt. Die relativen Kopien der Gene wurden mit der zugehörigen LightCycler Software berechnet und auf den relativen Gehalt des β -Actin Transkripts normiert. Die Durchführung der real-time PCR wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Haarmann-Stemmann übernommen.

Für die PCR wurden folgende Primerpaare verwendet:

Tab. 2.3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare

mRNA	Primerpaare	Größe	T
SeP	5'-TTCCTCCTCTTCCACCTCCT-3' 5'-ACAAACACATACAGAATAAACCAAGG-3'	70 bp	59°C
Cyp11a1 ^a	5'-TAGACACTGATCTGGCTGCAG-3' 5'-GGGAAGGCTCCATCAGCATC-3'	146 bp	60°C
β -Actin ^b	5'-CCCCAGGCACCAGGGCGTGAT-3' 5'-GGTCATCTTCTCGCGGTTGGCCTTGGGGT-3'	263 bp	60°C

FoxO1a	5'-AAGGGTGACAGCAACAGCTC-3' 5'-TTCTGCACACGAATGAACTTG-3'	87 bp	58°C
FoxO3a	5'-TTGCCTCTCCAAGCTTCCTA -3' 5'-CCCCATGCTACTAGTGCCTCT -3'	72 bp	58°C
FoxO4	5'-ACGAGTGGATGGTCCGTACT -3' 5'-GTGGCGGATCGAGTTCTTC -3'	86 bp	56°C

^a Omiecinski et al., 1990; ^b Ihm et al., 2002

2.9 Glutathionoxidation

Der GSH bzw. GSSG Gehalt der Zellen wurde enzymatisch nach Anderson (1985) mit geringfügigen Veränderungen (Abdelmohsen et al., 2003) ermittelt. Die zuvor behandelten Zellen wurden in 500 µl eiskalter HCl (10 mM) von den Kulturschalen abgekratzt. Es folgte eine Einfrier-/Auftau-Prozedur, Sonifizierung und Zentrifugation bei 20.000 g für 10 Minuten. Aus den Überständen wurde der Proteingehalt bestimmt (BCA-basierte Proteinbestimmung, Pierce). Nach Präzipitation des Proteins mit 5-Sulfosalicylsäure (5% w/v) auf Eis wurden die Proben mit einem Vortex-Gerät durchmischt und erneut bei 20.000 g für 10 Minuten zentrifugiert.

Die Bestimmung des Gesamtglutathiongehaltes wurde aus 40 µl des Überstandes nach Zugabe des Reaktionspuffers (0,2 M Tris pH 8, 0,1 M EDTA, 10 mM 5,5'-Dithionitrobenzoesäure, 150 mM NADPH) und 1-2 U/ml Glutathionreduktase pro Reaktionsansatz bestimmt. Für die Analyse des Glutathiondisulfidgehaltes wurden 6 µl Triethanolamin in 100 µl des restlichen Überstandes gegeben und die Thiolgruppen der Glutathionmoleküle wurden durch Zugabe von 2 µl 2-Vinylpyridin blockiert. Dabei sollte der pH-Wert der Reaktionslösung nicht über pH 7-8 liegen. Nach einstündiger Derivatisierung bei Raumtemperatur wurde der GSSG-Gehalt ebenfalls nach Zugabe des Reaktionspuffers und der Glutathionreduktase bestimmt.

Die zeitabhängige Veränderung der Extinktion wurde spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 412 nm verfolgt (Power Wave 340, BioTek).

2.10 Statistische Auswertung

Die Analyse der statistischen Signifikanz erfolgte durch einen gepaarten Student's t-Test oder durch einen ANOVA-Test gefolgt von einem Student Newman Keuls Post-Test. Vor der Studie wurde $P < 0.05$ als Maß für Signifikanz festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Schwermetallionen auf den Akt/FoxO-Signalweg

Sowohl Kupfer- als auch Nickelionen können die intrazelluläre Bildung von ROS hervorrufen (Beyersmann und Hartwig, 2008). Dies führt zu oxidativen Schäden von Lipiden und Proteinen sowie in toxischen Dosen der Metallionen auch zu Schäden der DNA (Dally und Hartwig, 1997; Schwerdtle et al., 2007). Sowohl die Metallionen selbst als auch die unter Belastung mit Metallionen gebildeten ROS können Signalwege in den Zellen aktivieren. Bekanntermaßen führt die Belastung von Zellen mit Kupfer- sowie Zinkionen zu einer Beeinflussung des Akt/FoxO-Signalweges (Barthel et al., 2007)

3.1.1 Cytotoxizität von Nickelionen und Glutathionoxidation

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Nickelionen in der Lage sind, eine PI3K-abhängige Phosphorylierung von Akt hervorzurufen (Eckers, 2006). FoxO-Proteine sind direkte Substrate der Kinase Akt. Ihre Phosphorylierung durch Akt führt zu einer Deaktivierung und der Translokation vom Zellkern ins Cytoplasma. Obwohl bereits eine 15-minütige Belastung der Zellen mit Nickelionen eine signifikante Erhöhung der Akt-Phosphorylierung induzierte (Abb. 3.1 A), zeigten fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, dass Behandlung mit Nickelionen von Zellen, die ein GFP-gekoppeltes FoxO1a exprimieren, keine Modulation der subzellulären Lokalisation von FoxO1a-GFP zur Folge hat (Abb. 3.1 B). Im Unterschied dazu induzierten Insulin und Cu^{2+} den Ausschluss der FoxO1a-Fusionsproteine aus dem Zellkern (Abb. 3.1 B).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Nickelionen auf die Viabilität und Glutathionoxidation in menschlichen Hepatomzellen sowie auf den Phosphorylierungsstatus und die DNA-Bindungsaktivität der FoxO-Proteine untersucht.

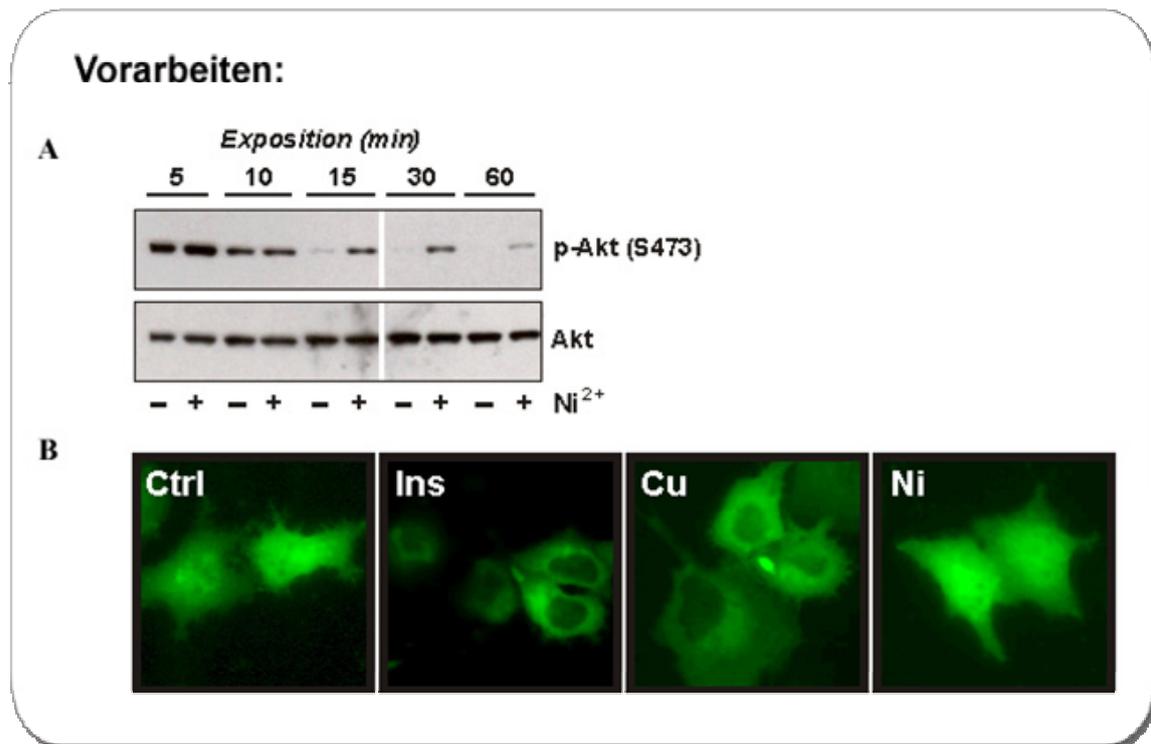


Abb. 3.1: Nickel-induzierte Phosphorylierung von Akt und Lokalisation von FoxO-EGFP

A. Humane HepG2 Hepatomzellen wurden für die angegebene Dauer mit Nickelionen (100 μM NiSO_4) in Hank's balanced salt solution (HBSS) behandelt. Die Zellen wurden lysiert und im Western Blot auf den Phosphorylierungsstatus von Akt untersucht. **B.** HepG2-Zellen wurden mit einem FoxO1a-EGFP Plasmid transient transfiziert und mit Insulin (100 nM), CuSO_4 (10 μM) oder NiSO_4 (100 μM) in HBSS für 30 Minuten behandelt. Die Änderung der FoxO1a-GFP Lokalisation wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Abbildung aus Eckers (2006) und Eckers et al. (2009).

Für die Analyse toxischer Wirkungen von Nickelionen auf HepG2-Zellen wurden zwei Analysemethoden eingesetzt. Zum einen wurde die Fähigkeit der behandelten Zellen, Kolonien auszubilden, untersucht. Mit zunehmender Toxizität der Substanz verringert sich die Anzahl der Kolonien, die nach einer bestimmten Wachstumszeit gebildet werden. Zum anderen wurde die Fähigkeit zur Inkorporation des Farbstoffs Neutralrot zur Abschätzung der Zellviabilität genutzt. Beide Methoden wurden angewandt, um festzustellen, ob die durchgeführte Behandlung mit Schwermetallionen von maximal 60 Minuten in humanen Hepatomzellen HepG2 zu toxischen Effekten führt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2 dargestellt.

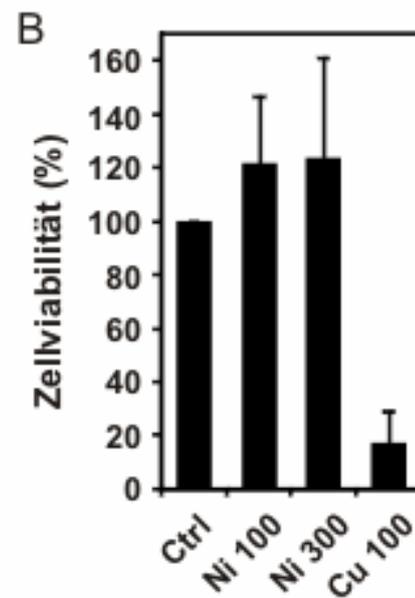
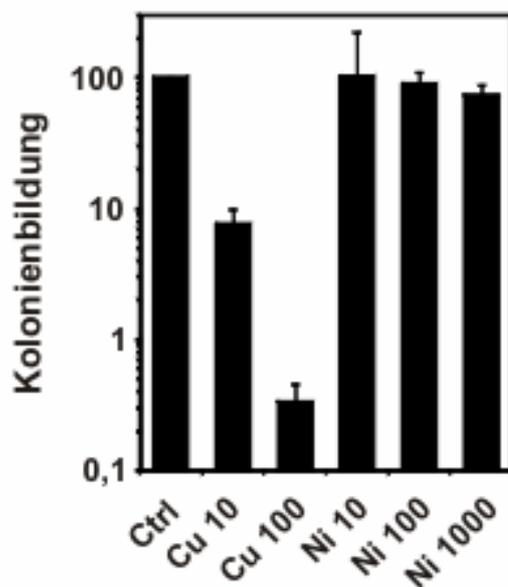
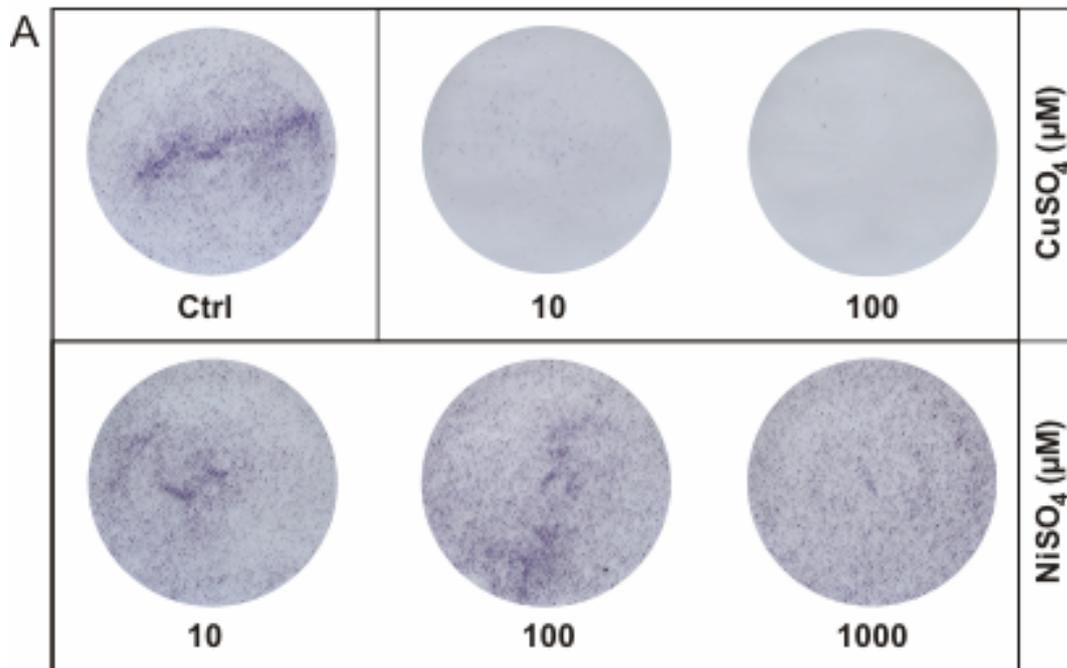


Abb. 3.2: Nickelionen führen nicht zu cytotoxischen Effekten in HepG2 Zellen

HepG2 humane Hepatomzellen wurden bis zu einer 80-90%igen Konfluenz herangezogen und darauf für 18 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen CuSO₄ oder NiSO₄ in Hanks' balanced salt solution (HBSS) für 60 Minuten behandelt. (A) Die Zellen wurden nach der Behandlung trypsinisiert, gezählt und in verschiedenen Verdünnungen wieder ausgesät. Nach elftägiger Kultivierung wurden die Kolonien mit Kristallviolett-Lösung gefärbt und ausgezählt. Repräsentative Fotos der Kolonien sind oben gezeigt. Die relative Anzahl der Klone ist angegeben als Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ± SEM. (B) Die Zellen wurden nach der Behandlung weitere 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Zellviabilität wurde sodann mithilfe des Neutralrot-Tests bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

Die relative Kolonienzahl sowie einige repräsentative Fotos der Kulturschalen sind in Abbildung 3.2A dargestellt. Die mit Kristallviolett angefärbten Klone wurden ausgezählt und auf die Anzahl der ursprünglich ausgebrachten Zellen normiert. Bei hohen Konzentrationen von 1 mM Ni^{2+} kam es zu einer Abnahme der Kolonienbildung von ca. 20% im Vergleich zur Kontrolle. Kupferionen hingegen induzierten eine stärkere Abnahme der Kolonienbildung. Bereits eine einstündige Behandlung mit 10 μM Kupferionen verringerte die Anzahl der Kolonien, die sich nach 11 Tagen Wachstum gebildet hatten, auf 10%. Die für die Behandlung verwendete Konzentration von 100 μM Ni^{2+} , die zu einer Phosphorylierung von Akt führte (Abb. 3.1), kann demnach als unter den beschriebenen Bedingungen nichttoxisch betrachtet werden.

Für die Analyse der Zellviabilität, die mittels der Inkorporation von Neutralrot (Abb. 3.2B) ermittelt wurde, ergaben sich ähnliche Befunde. Die Viabilität der HepG2 Hepatomzellen wurde durch Behandlung mit Nickelionen nicht eingeschränkt. Weder 100 μM Ni^{2+} noch 300 μM Ni^{2+} senkten die Viabilität der Zellen. Im Gegenteil schien es zu einer leichten Steigerung der Viabilität im Vergleich zur Kontrollbehandlung zu kommen. 100 μM Cu^{2+} induzierte hingegen eine Verringerung der Neutralrot-Inkorporation der Zellen. Es kam zu einer Abnahme der Viabilität von 80% nach einer Behandlungsdauer von 60 Minuten.

Metallionen können oxidativen Stress innerhalb der Zelle auslösen. Dies geschieht häufig durch Fenton-ähnliche Reaktionen. Hydroperoxide werden innerhalb der Zelle durch Metallionen unter Bildung von Hydroxyl-/Alkoxyradikalen reduziert. Voraussetzung für diese Reaktion ist das Vorliegen eines reduzierten Metallions. Im Falle des Kupferions wird es in der Zelle durch Thiolgruppen von Cu(II) zu Cu(I) reduziert, während die Thiolgruppen zu Disulfiden oxidiert werden (Klotz et al., 2003). Ein Sensor für solche Redoxprozesse in der Zelle stellt das Glutathion/Glutathiondisulfid (GSH/GSSG)-System dar. Die Gleichgewichtsverschiebung zu Gunsten des Disulfids zeigt den Redoxstatus der Zelle an und dient als ein Maß für oxidativen Stress.

HepG2-Zellen wurden für 60 Minuten mit Kupfer- oder Nickelionen behandelt, und aus den Lysaten wurde der Gehalt an Glutathiondisulfid bestimmt.

Es ist deutlich erkennbar, dass die Behandlung von Zellen mit Nickelionen bis zu Konzentrationen von 3 mM nicht zu einer erhöhten Bildung von Glutathiondisulfid führte (Abb. 3.3). Wie in den Experimenten zur Analyse von cytotoxischen Effekten reagierten die Zellen auf die Behandlung mit Cu^{2+} in anderer Weise. Ab einer Konzentration von 10 μM induzierten Kupferionen bereits eine Änderung des GSSG-Spiegels. Von einer 5-fachen Erhöhung des GSSG-Gehaltes stieg dieser bei Konzentrationen von 300 μM Cu^{2+} auf das bis zu 30-fache an.

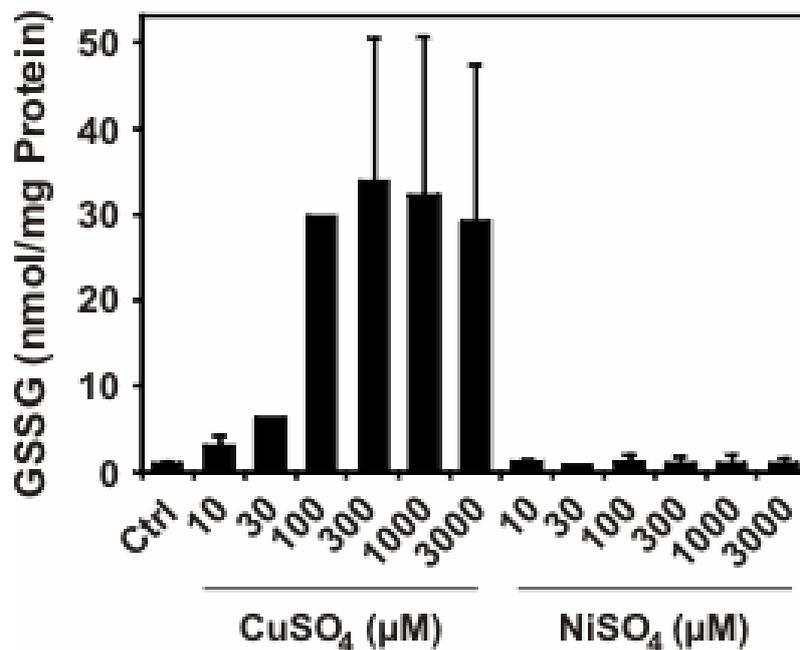


Abb. 3.3: GSSG-Gehalt in HepG2-Zellen nach Belastung mit Kupfer- oder Nickelionen
 HepG2 humane Hepatomzellen wurden bis zu einer 80-90%igen Konfluenz herangezogen und daraufhin für 18 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 60 Minuten mit den angegebenen Konzentrationen CuSO_4 oder NiSO_4 in Hanks' balanced salt solution (HBSS) behandelt. Anschließend wurde aus den Lysaten der Glutathiondisulfidgehalt bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ($30 \mu\text{M Ni}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ und $100 \mu\text{M Cu}^{2+}$: $n=2$) \pm Standardabweichung.

Die durch Nickelionen induzierte Aktivierung von Akt ist demnach unabhängig von einer etwaigen durch die Nickelionen hervorgerufenen Produktion von ROS. Dies ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen zur Beteiligung von ROS an der Phosphorylierung von Akt durch andere Schwermetalle (Barthel et al., 2007; Ostrakhovitch et al., 2002).

3.1.2 Einfluss von Nickelionen auf FoxO-Proteine

Trotz einer signifikanten Akt-Phosphorylierung nach Behandlung von Zellen mit Nickelionen wurde kein Ausschluss von FoxO1a-EGFP aus dem Zellkern beobachtet (Abb. 3.1). Um zu überprüfen, inwieweit sich die Fähigkeit der FoxO-Proteine zur DNA-Bindung nach Behandlung mit Schwermetallionen ändert, wurde ein ELISA-basierter FoxO-DNA-Bindetest durchgeführt. Nach Behandlung der Zellen mit Schwermetallionen oder Insulin wurde aktives FoxO1a in den Zellkernen nachgewiesen. Dazu wurden 96-well-Platten verwendet, auf die die FoxO-Bindesequenz aufgebracht war. Nach Behandlung mit Insulin sollte in den Kernen weniger aktives FoxO vorliegen, das in der Lage ist, an die FoxO-DNA-Bindesequenz zu binden. In der Tat führte die Stimulation mit Insulin tendenziell zu einer Verringerung der FoxO1a-Bindung an die DNA-Sequenz (Abb. 3.4).

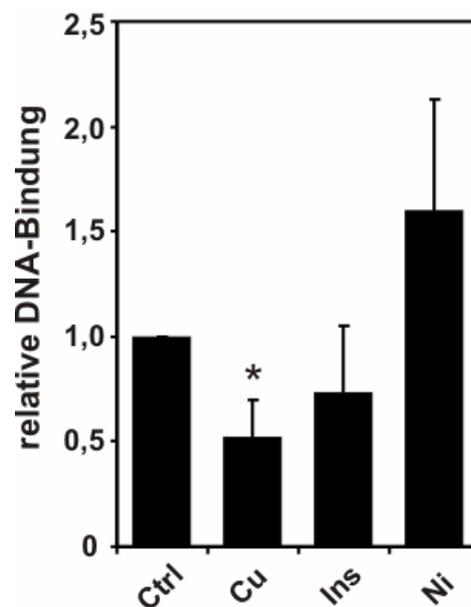


Abb. 3.4: Einfluss von Nickelionen auf die DNA-Bindfähigkeit von FoxO1a

HepG2 Zellen wurden vor der 30-minütigen Behandlung mit Cu^{2+} (10 μM), Ni^{2+} (100 μM) und Insulin (100 nM) in HBSS für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Nach der Behandlung wurden die Kerne isoliert und auf die Bindung von FoxO1a an die DNA mittels eines ELISA-basierten FoxO-Bindungs-Testsystems untersucht. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (* $P < 0,05$).

Noch deutlicher als mit Insulin wurde dies durch die Behandlung mit Kupferionen erreicht. Die mittlere Abnahme der DNA-Bindungsfähigkeit von FoxO1a lag bei 50%. Kupferionen besitzen also einen insulinmimetischen Effekt (Abb. 3.4).

Die Behandlung mit Nickelionen konnte keine Verringerung der relativen DNA-Bindung von FoxO1a hervorrufen, sondern schien im Gegenteil eine Steigerung der DNA-Bindeaktivität zu bewirken (Abb. 3.4).

Die FoxO-Faktoren werden bekanntermaßen durch die Ser/Thr-Kinase Akt phosphoryliert. Die bereits nach 15-minütiger Behandlung von HepG2 Zellen mit Nickelionen induzierte Akt-Phosphorylierung ließ erwarten, dass auch Akt-Substrate phosphoryliert werden. Für ein Akt-Substrat, die Glycogensynthasekinase-3, wurde dies gezeigt (Eckers, 2006).

Abb. 3.5 zeigt den Phosphorylierungszustand der FoxO-Proteine 1 und 3 nach Inkubation von HepG2 Zellen mit Kupfer- und Nickelionen sowie mit Insulin. Tatsächlich führten Kupferionen und Insulin wie erwartet zu einer starken Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren, wohingegen die Behandlung der Zellen mit Nickelionen nur eine äußerst schwache, kaum detektierbare, Phosphorylierung zur Folge hatte.

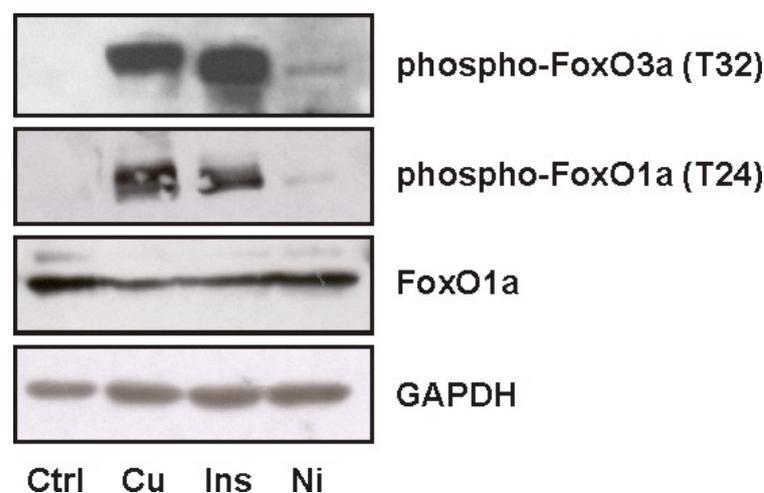


Abb. 3.5: Phosphorylierung von FoxO1a und FoxO3a nach Behandlung von Zellen mit Kupfer- oder Nickelionen

HepG2 humane Hepatomzellen wurden bis zu einer 80-90%igen Konfluenz herangezogen und anschließend für 18 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit CuSO_4 (10 μM), NiSO_4 (100 μM) oder Insulin (100 nM) in Hanks' balanced salt solution (HBSS) für 30 Minuten behandelt. Die Zellen wurden lysiert und mittels Western Blot analysiert. Die gezeigten Immunoblots sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

Trotz einer signifikanten Akt-Phosphorylierung, hervorgerufen durch die Inkubation der Zellen mit Nickelionen, führte diese also nicht zu einer eindeutigen Phosphorylierung aller Akt-Substrate wie hier im Falle der FoxO-Proteine.

Die durch Ni^{2+} induzierte Akt-Phosphorylierung fand bereits unter subcytotoxischen und nicht-oxidativen Bedingungen statt. Die nach der Aktivierung von Akt durch Ni^{2+} (Abb. 3.1) durchaus zu erwartende Phosphorylierung und Abnahme der DNA-Bindungsfähigkeit der FoxO-Transkriptionsfaktoren war nur äußerst schwach (Abb. 3.5) oder nicht detektierbar (Abb. 3.4).

3.2 Einfluss von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und FICZ auf FoxO-Proteine

Neben Metallionen gibt es zahlreiche Umweltfaktoren, die Signalwege beeinflussen. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) gehören zu den Stimulatoren des Ah-Rezeptors und induzieren die Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen der Cytochrom-P450-Familie, darunter das Cytochrom-P450 1a1 (Cyp1a1). Substanzen wie Benzo(a)pyren [B(a)P] kommen als Umweltbelastung aus unvollständigen Verbrennungsprozessen in der Atmosphäre und in Nahrungsmitteln vor. B(a)P und 3-MC sind als Karzinogene von großer Bedeutung. 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) wird durch photochemische Reaktion aus Tryptophan gebildet. Auch FICZ induziert die Expression von Cyp1a1 und fällt in die Gruppe der AhR-Agonisten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss dieser drei Substanzen auf die Aktivität der FoxO-Faktoren untersucht. Derzeit ist über eine Modulation von FoxO-Proteinen und FoxO-regulierter Zielgene durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder FICZ nichts bekannt.

3.2.1 Modulation FoxO-responsiver Promotoren durch AhR-Agonisten

Um die Wirkung der PAK B(a)P und 3-MC sowie des Carbazols FICZ auf FoxO-Faktoren zu untersuchen, wurden Reporteranalysen durchgeführt. Vier verschiedene Promotorkonstrukte von FoxO-Zielgenen sowie ein ausschließlich FoxO-responsives Konstrukt, das FHRE-luc, wurden verwendet. Als Promotoren FoxO-regulierter Zielgene wurden die Aktivitätsänderungen des Selenoprotein P-Promotors (3.2.1.2), des Glucose 6-Phosphatase-Promotors (3.2.1.3) und des Mangansuperoxiddismutase-Promotors (3.2.1.4) jeweils nach Stimulierung mit PAK oder FICZ analysiert.

Um Unterschiede in den Zellzahlen, Pipettierfehler sowie Varianzen der Transfektionseffizienz auszuschließen, wurde zur Kontrolle in allen Reporteranalysen das Plasmid pRL-SV40 cotransfiziert. Es codiert für die Luziferase aus *Renilla reniformis* und steht unter der Kontrolle des viralen SV-40 Promotors.

Für alle Reporteranalysen wurden Zellen mit dem jeweiligen Reporterplasmid (FHRE-luc, SeP-luc, G6Pase-luc oder MnSOD-luc), einem Kontrollplasmid (pcI-Neo) oder einem für eine der drei ubiquitär exprimierten menschlichen FoxO-Isoformen codierenden Überexpressionsplasmid und dem pRL-SV40 Plasmid cotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde für 18 h mit den PAK oder FICZ behandelt. Die Behandlungsdauer wurde gewählt, um eine ausreichende Expression der Luziferasen zu erreichen. Für die Messung der Chemolumineszenz wurden den Lysaten jeweils für eine der beiden Luziferasen spezifische Substrate zugegeben. Die enzymatische Aktivität resultiert in einer Chemolumineszenz, deren Werte nach Normierung der Firefly-Luziferasedaten auf die Werte der Renilla-Luziferase-Messung mit der Aktivität des Promotors korrelieren.

Nachfolgend werden zunächst die Aktivitätsänderungen des FHRE-luc Konstruktes in Abhängigkeit von einer Behandlung mit 3-MC, B(a)P und FICZ betrachtet.

3.2.1.1 Einfluss von AhR-Agonisten auf ein spezifisch FoxO-responsives Promotorkonstrukt

Eines der verwendeten Reporterkonstrukte, das FHRE-luc, besitzt drei hintereinandergeschaltete FoxO-responsive Elemente (DBE), welche vor das als Reporter eingesetzte Gen der Firefly-Luziferase kloniert sind. Durch die Messung der Luziferaseaktivität gewinnt man Rückschlüsse auf die Aktivität von FoxO-Proteinen.

Abbildung 3.6 zeigt die Änderung der Promotoraktivität des FHRE-luc Konstruktes unter basalen FoxO-Expressionsspiegeln nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren (3-MC) in drei unterschiedlichen Konzentrationen. Die Behandlung mit DMSO wurde gleich eingesetzt, um die Änderungen, die durch die Behandlungen hervorgerufen wurden, direkt vergleichen zu können.

Das FHRE-luc Konstrukt reagierte auf die Stimulation mit 3-MC eindeutig mit einer Aktivitätserhöhung.

Mit steigender 3-MC Konzentration stieg ebenfalls die Aktivität des FoxO-responsiven Promotors. Bereits mit 100 nM 3-MC wurde eine Verdopplung der Aktivität des FHRE-luc beobachtet. Diese konnte nach Behandlung mit 10 μ M 3-MC auf das 2,5-fache erhöht werden.

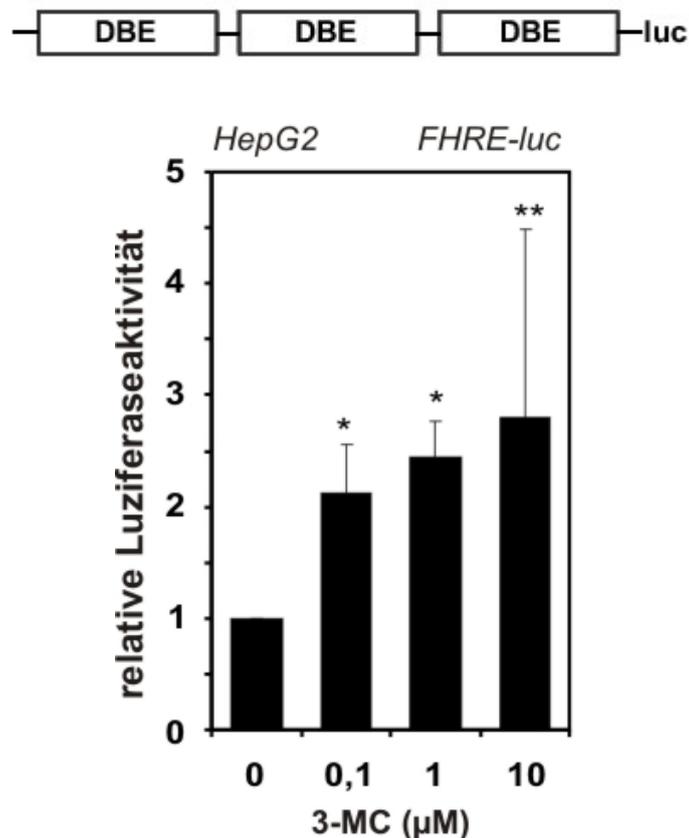


Abb. 3.6: 3-MC steigert die Promotoraktivität eines FoxO-responsiven Reportergenkonstruktes

HepG2-Zellen wurden mit einem Promotor-Luziferasegenkonstrukt mit drei FoxO-responsiven Elementen (FHRE-luc, oberer Teil der Abbildung) und einem Kontrollplasmid transient transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen für 18 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen 3-MC oder DMSO (0,1%) behandelt, gefolgt von der Analyse der Luziferaseaktivität in den Zelllysaten. Die Daten sind Mittelwerte aus 3-10 voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Im Anschluss wurde das Experiment bei gleichzeitiger Überexpression einer der drei FoxO-Isoformen FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 wiederholt. Da FoxO6 weder in Leberzellen noch in Keratinocyten exprimiert wird (s. Einleitung), beschränkten sich die Experimente für diese Arbeit auf die drei ubiquitär exprimierten FoxO-Isoformen. Die Zellen

wurden transient transfiziert, wobei das Kontrollplasmid durch das für die jeweilige FoxO-Isoform codierende ausgetauscht wurde.

In den jeweils eingebetteten Diagrammen (Abb. 3.7) ist deutlich erkennbar, dass das FHRE-luc Konstrukt unter Kontrollbedingungen (DMSO-Behandlung) mit einer Steigerung der Promotoraktivität nach Überexpression jeder der FoxO-Isoformen reagierte. Die Überexpression von FoxO1a hatte eine 3-fache Steigerung der Aktivität zur Folge. Eine 6-fache Erhöhung ergab sich bei FoxO3a-Überexpression und die vermehrte Expression von FoxO4 führte zu einer bis zu 10-fachen Erhöhung der FHRE-luc Aktivität.

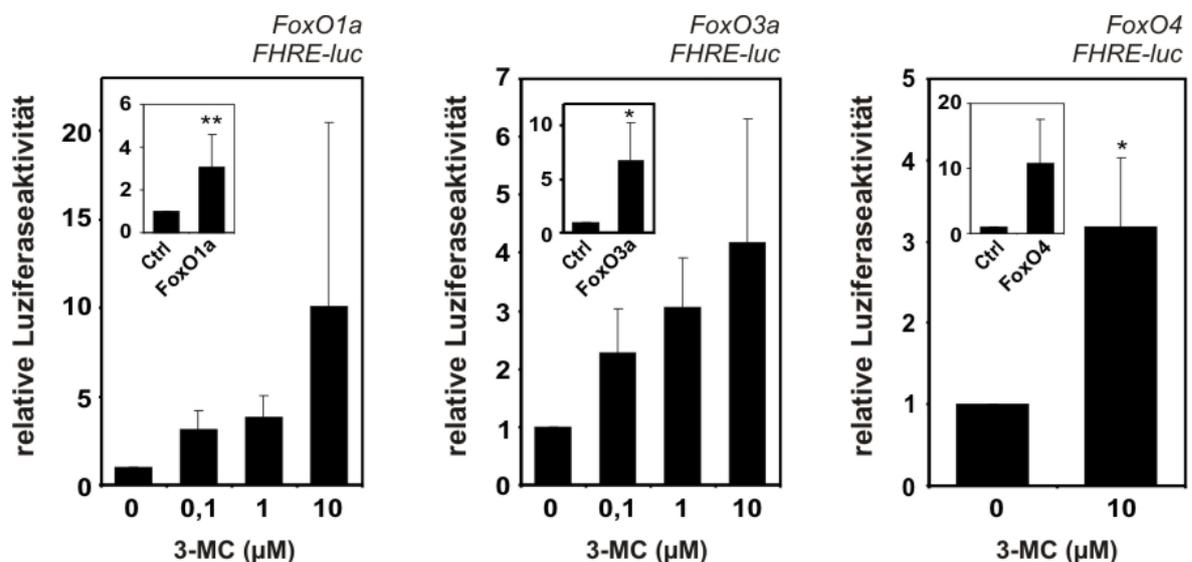


Abb. 3.7: Steigerung FoxO-spezifischer Promotoraktivität durch 3-MC bei gleichzeitiger Überexpression der drei FoxO-Isoformen

HepG2 Zellen wurden mit dem FHRE-luc und einem Kontrollplasmid (Ctrl) oder einem der drei FoxO-Überexpressionsplasmide transfiziert, mit DMSO oder 3-MC für 18 h behandelt und lysiert. Die Daten sind Mittelwerte aus 3-5 voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Für die Auswertung der Reaktion des Reporterplasmids unter FoxO-Überexpressionsbedingungen auf die Behandlung der Zellen mit 3-MC wurde die DMSO-Behandlung gleich eins gesetzt. Bei gleichzeitiger Überexpression der drei FoxO-Isoformen hatte die Behandlung mit 3-MC eine Steigerung der Aktivität des FHRE-luc zur Folge. Die durch 10 μ M 3-MC erzielte relative Steigerung lag zwischen einer 2,5- und 10-fachen Erhöhung gegenüber der DMSO-Behandlung.

Im Vergleich zu Abbildung 3.6 ist festzustellen, dass die relative Erhöhung der Promotoraktivität bei gleichzeitiger Überexpression von FoxO1a in besonderem Maße anstieg. Unter basalen FoxO-Spiegeln (Abb. 3.6) kam es zu einer maximal 2,5-fachen Induktion

durch 10 μM 3-MC. Diese Aktivierung konnte nach Überexpression der FoxO-Isoformen nochmals gesteigert werden. Die vermehrte Expression der FoxO-Isoformen, besonders des FoxO1a, verstärkte die durch 3-MC induzierte Aktivitätserhöhung des FHRE-luc Plasmids. Für alle Experimente konnte die stärkste Aktivitätssteigerung des Promotorkonstruktes durch eine Behandlung mit 10 μM 3-MC erzielt werden.

Die Modulation der Aktivität des FHRE-Promotors durch unterschiedliche Konzentrationen eines zweiten PAK, Benzo(a)pyren, ist in Abb. 3.9 dargestellt.

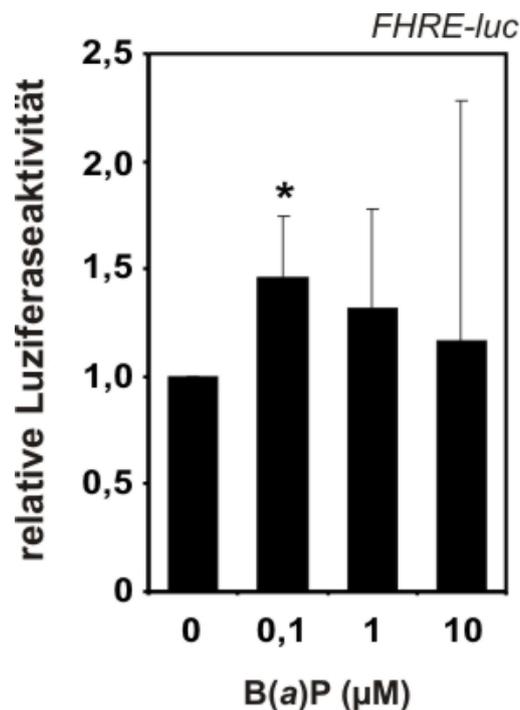


Abb. 3.8: Steigerung FoxO-spezifischer Promotoraktivität durch Behandlung mit B(a)P

HepG2 Zellen wurden mit dem Promotor-Luziferasegenkonstrukt FHRE-luc und einem Kontrollplasmid transient transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen für 18 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen B(a)P oder DMSO (0,1%) behandelt, gefolgt von der Analyse der Luziferaseaktivität in den Zelllysaten. Die Daten sind Mittelwerte aus 4 voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (* $P < 0,05$).

Ähnlich wie die Behandlung mit 3-MC resultierte auch die Behandlung mit B(a)P mit einer Promotoraktivitätssteigerung, jedoch offensichtlich schon bei geringeren Konzentrationen. Bereits 0,1 μM B(a)P führten zu einer Erhöhung der Promotoraktivität um circa 50%. Die Aktivität des Promotors wurde durch 0,1 μM B(a)P in geringerem Umfang moduliert als die im Vergleich zu mit 10 μM 3-MC induzierte.

Die Ergebnisse nach Überexpression von FoxO1a und FoxO3a sind in Abbildung 3.9 zusammengefasst.

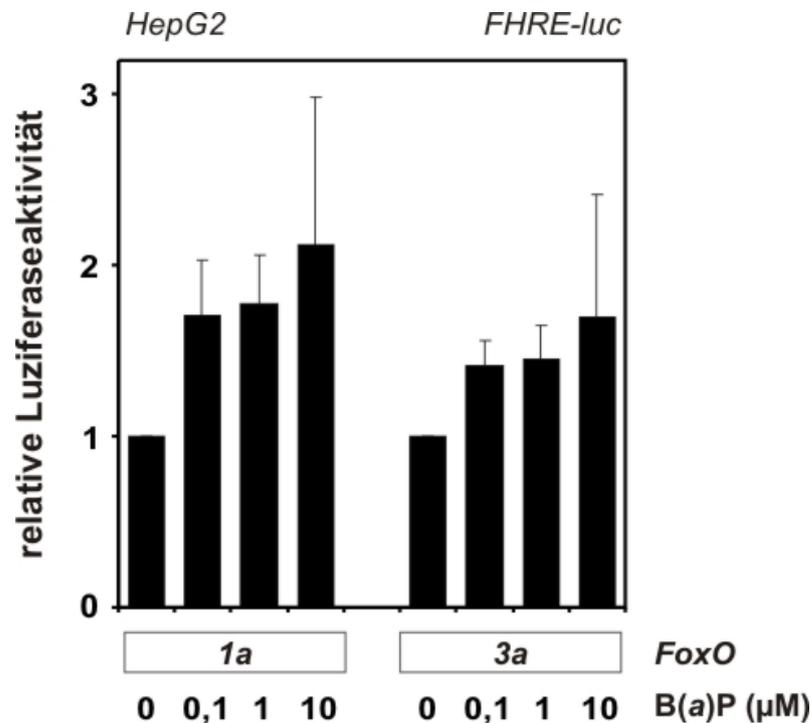


Abb. 3.9: Steigerung FoxO-spezifischer Promotoraktivität durch B(a)P bei gleichzeitiger Überexpression von FoxO-Isoformen

HepG2 Zellen wurden mit dem FHRE-luc und dem jeweiligen FoxO-Überexpressionsplasmid cotransfiziert. 24 h später erfolgte die Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1, 1 und 10 µM) B(a)P für 18 h. Die Zellen wurden lysiert und die Aktivität der Luziferase wurde in den Lysaten bestimmt. Die Daten geben die Mittelwerte aus vier voneinander unabhängigen Experimenten \pm des Durchschnittsfehlers der Standardabweichung (Standard error of the mean, SEM) wieder.

Bei gleichzeitiger Überexpression sowohl von FoxO1a als auch von FoxO3a zeigte sich eine Steigerung der FHRE-Promotoraktivität nach Behandlung mit B(a)P. Die erhöhte Expression von FoxO1a scheint in einer (leichten) Verstärkung des durch den PAK hervorgerufenen Effektes zu resultieren. Die relative Erhöhung der FHRE-luc Aktivität lag unter basalen Bedingungen bei 50% für die geringste B(a)P Konzentration. Mit höheren Konzentrationen war höchstens eine leichte Steigerung erkennbar. Im Falle der FoxO1a-Überexpression wurde die Aktivitätssteigerung des Promotors für alle drei Konzentrationen verstärkt.

Neben der Wirkung des synthetischen Kohlenwasserstoffs 3-MC und des bei Verbrennungsprozessen entstehenden B(a)P wurde die Wirkung von FICZ auf die Aktivität des

FHRE-luc Konstruktes in HepG2 Zellen untersucht. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird FICZ als Photoprodukt zweier Tryptophanmoleküle nach UV-Bestrahlung gebildet. Sowohl die Bestrahlung von Keratinocyten mit UV-Strahlung als auch die Behandlung mit syntethisiertem FICZ wurden als Induktoren der Cyp1a1-Expression beschrieben (Wei et al., 1999). Dass dies auf der intrazellulären Bildung von FICZ beruht, wurde kürzlich gezeigt (Fritsche et al., 2007).

Unter basaler Expression der FoxO-Proteine (Abb. 3.10) hatten alle verwendeten FICZ-Konzentrationen eine Steigerung der FHRE-Promotoraktivität zur Folge. Die Behandlung der Zellen mit 100 und 200 nM FICZ resultierte in einer bis zu dreifachen Erhöhung der Luziferaseexpression.

Wie schon für die Substanzen 3-MC und B(a)P beschrieben, war die relative Aktivitätsveränderung durch FICZ nach Überexpression von FoxO1a besonders ausgeprägt (Abb. 3.11). Das Promotorkonstrukt reagierte in diesem Fall mit einer fünffachen Aktivitätssteigerung nach Behandlung mit 100 nM FICZ. Wurden FoxO3a oder FoxO4 verstärkt exprimiert, war zwar ebenfalls eine Steigerung zu verzeichnen, jedoch fiel diese schwächer aus.

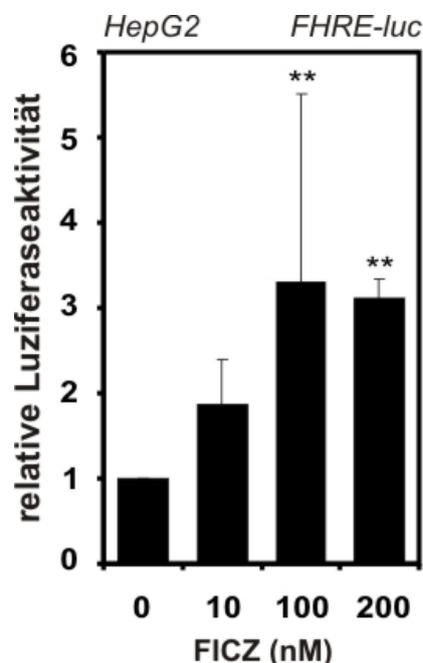


Abb. 3.10: FICZ steigert die Aktivität des FHRE-Promotorkonstruktes

Mit FHRE-luc und einem Kontrollplasmid transfizierte HepG2 Zellen wurden mit FICZ in unterschiedlichen Konzentrationen (10 nM, 100 nM und 200 nM) behandelt, gefolgt von der Bestimmung der relativen Luziferaseexpression. Die Daten geben die Mittelwerte aus 3-14 voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung wieder. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (** $P < 0,01$).

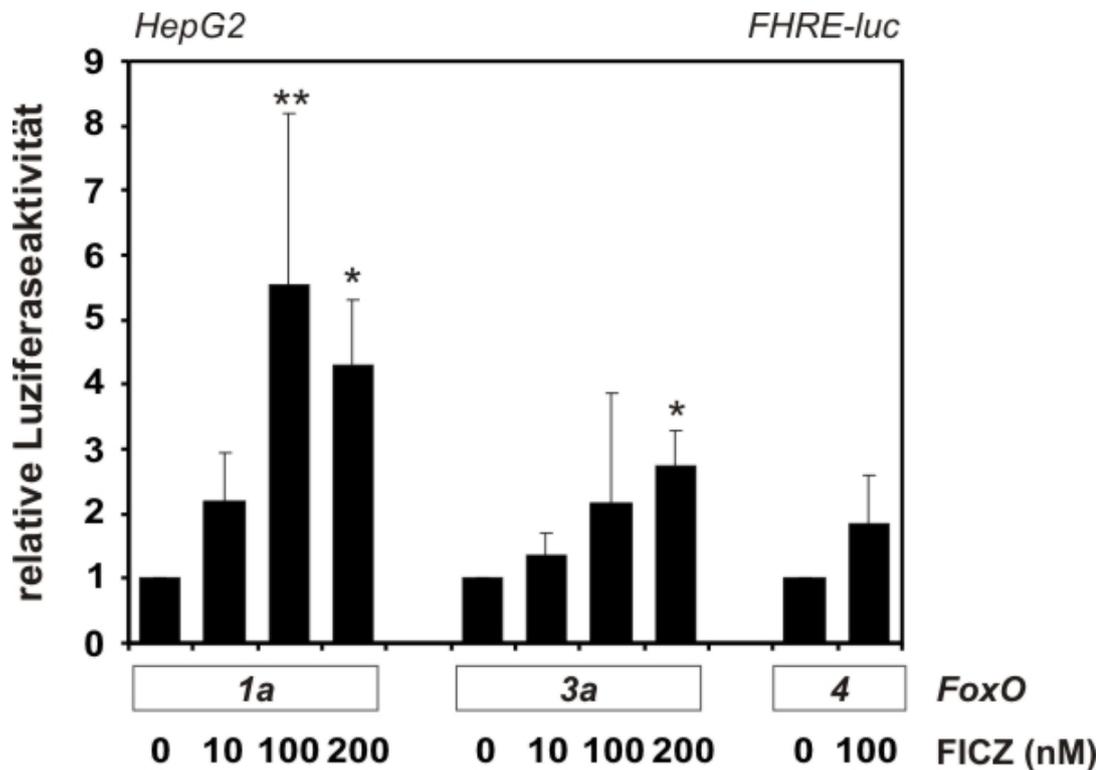


Abb. 3.11: Steigerung FoxO-spezifischer Promotoraktivität durch FICZ bei gleichzeitiger Überexpression von FoxO-Isoformen

HepG2 Zellen wurden 24 Stunden nach der Aussaat mit dem FHRE-luc und den für die 3 FoxO-Isoformen codierenden Plasmide cotransfiziert. 24 h später erfolgte die 18-stündige Behandlung mit unterschiedlichen FICZ-Konzentrationen (10 nM, 100 nM und 200 nM). Als Lösemittelkontrolle diente DMSO (0,1%). Die relative Luziferaseexpression wurde in den Lysaten bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus 3-8 voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Belastung von Zellen mit den Substanzen 3-Methylcholanthren, Benzo(a)pyren und FICZ zu einer Steigerung der Promotoraktivität des FHRE-luc Konstruktes führte. Dies war sowohl unter basaler endogener Expression von FoxO-Transkriptionsfaktoren sowie nach deren Überexpression der Fall. Die relative Erhöhung der Aktivität des FHRE-Konstruktes war je nach Stimulus unterschiedlich stark ausgeprägt. Konnten bis zu dreifache Steigerungen der Aktivität unter basaler FoxO-Expression beobachtet werden, konnten diese bei gleichzeitiger Überexpression von FoxO-Isoformen auf bis zu einer zehnfachen Aktivitätssteigerung im Vergleich zur Kontrollbehandlung erhöht werden. Für alle drei Stimuli war diese Wirkverstärkung nach FoxO1a Überexpression am stärksten beobachtbar.

Die Effekte, die in Bezug auf das FHRE-luc-Promotorkonstrukt durch die Kohlenwasserstoffe hervorgerufen wurden, zeigten, dass die Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren

durch 3-MC, B(a)P sowie FICZ, moduliert wurde. Zum einen wurde für die Experimente ein ausschließlich FoxO-responsives Konstrukt verwendet. Der Reporter lässt somit direkte Rückschlüsse auf die Änderung der FoxO-Aktivität zu. Zum anderen wurde gezeigt, dass die Überexpression von FoxO1a eine Verstärkung des Effektes zur Folge hatte. Dies ist nicht auf die generelle Erhöhung der Promotoraktivität nach Überexpression der FoxO-Proteine zurückzuführen, da in dem Fall ebenfalls auf die Kontrollbehandlung mit DMSO normiert wurde. Die genannten Gründe und Ergebnisse deuten darauf hin, dass die transkriptionelle Aktivität der FoxO-Faktoren, besonders von FoxO1a, durch die Behandlung von Zellen mit 3-MC, B(a)P und FICZ, gesteigert wird.

3.2.1.2 Einfluss von PAK und FICZ auf den Selenoprotein P-Promotor

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde ein künstliches Promotorkonstrukt verwendet. Dieses zeigte eine Erhöhung der Aktivität nach Stimulation mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen und FICZ. Auch FoxO-Zielgene könnten also mit einer Steigerung in der Promotoraktivität und erhöhter Expression reagieren. Um zusätzliche Erkenntnisse über die Auswirkung von Behandlung von Zellen mit PAK bzw. FICZ bzgl. der Aktivität der FoxO-Transkriptionsfaktoren und der Aktivität deren Zielgene zu erhalten, wurden Analysen unter Verwendung eines anderen Reportergenkonstrukts durchgeführt. Das Selenoprotein P-Luziferase-Promotorkonstrukt (SeP-luc) enthält ca. 1800 bp des SeP-Promotors, worin zwei FoxO-Bindestellen zu finden sind. Schematisch ist das Konstrukt in Abb. 3.12 dargestellt.

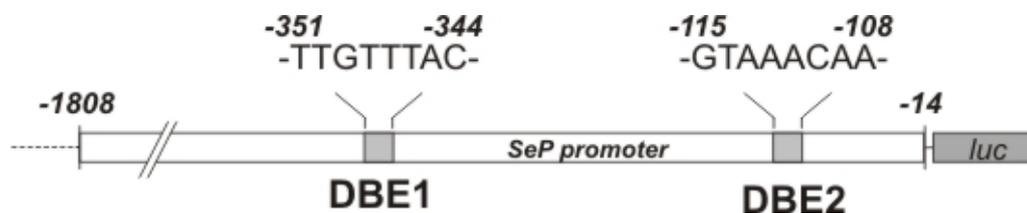


Abb. 3.12: Schematische Darstellung des verwendeten SeP-Promotorkonstruktes

Das SeP-luc Konstrukt enthält zwei FoxO-Bindestellen, wobei gezeigt werden konnte, dass die 2. Bindestelle eine größere Bedeutung für die Aktivität des Promotors besitzt als DBE1 (Walter et al., 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von FoxO1a zu einer Steigerung der SeP-Promotoraktivität führt (Walter et al., 2008), die durch eine Stimulation mit Insulin gesenkt wird.

Dass der SeP-Promotor nicht nur nach Überexpression von FoxO1a, sondern auch nach Überexpression der Isoformen 3a und 4 mit einer Steigerung der Promotoraktivität reagiert, geht aus Abbildung 3.13 hervor.

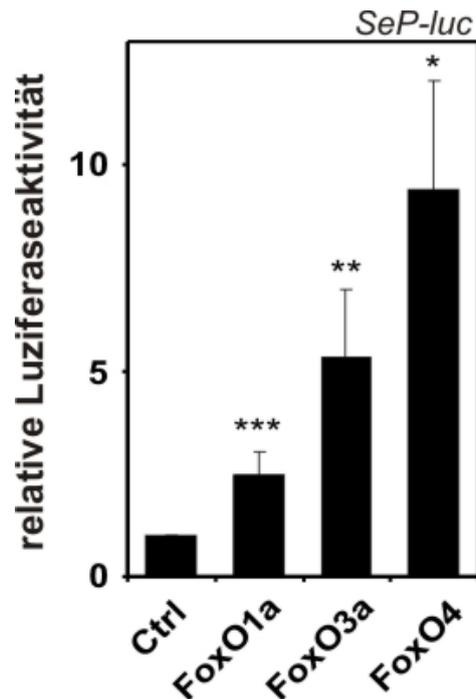


Abb. 3.13: Die Aktivität des Selenoprotein P Promotors wird durch FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 erhöht

HepG2 Zellen wurden mit dem SeP-luc und entweder einem Kontrollplasmid (Ctrl) oder einem der drei FoxO-Überexpressionsplasmide transfiziert. Die Aktivität des SeP-luc bei Cotransfektion des Kontrollplasmids wurde gleich eins gesetzt und die übrigen Aktivitäten darauf normiert. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Der Promotor des Selenoprotein P-Konstruktes wurde eindeutig nicht nur durch eine erhöhte Expression von FoxO1a aktiviert. In diesem Fall kam es zu einer 2-3-fachen Aktivitätssteigerung im Vergleich zur Kontrolle. Ebenfalls signifikante Erhöhungen der Promotoraktivität waren bei gleichzeitiger Überexpression von FoxO3a und FoxO4 zu beobachten. Die Überexpression von FoxO3a bewirkte eine um das fünffach erhöhte Aktivität und die vermehrte Expression von FoxO4 resultierte im Mittel sogar in einer neunfachen Erhöhung der SeP-Promotoraktivität.

Die Änderungen der SeP-Promotoraktivität durch Behandlung mit 3-MC unter basalen FoxO-Spiegeln sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Überraschenderweise reagierte der SeP-Promotor nicht mit einer Aktivitätssteigerung wie das FHRE-Promotorkonstrukt.

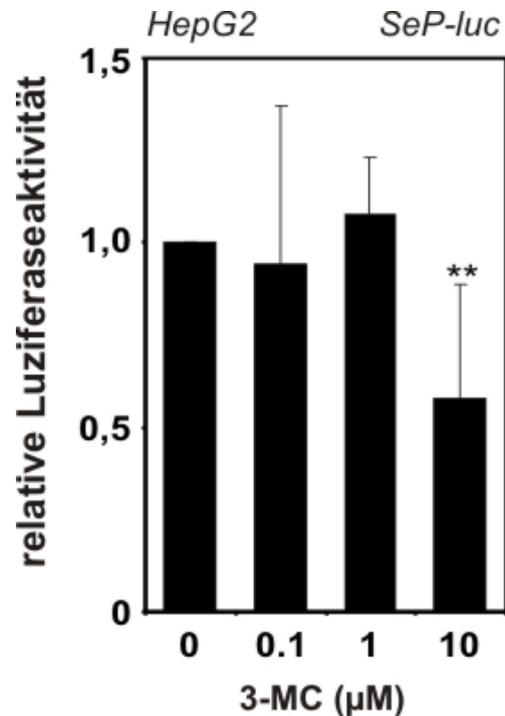


Abb. 3.14: 10 µM 3-MC senkt die Aktivität des Selenoprotein P Promotors

HepG2-Zellen wurden mit SeP-luc und einem Kontrollplasmid (pCI-Neo) cotransfiziert und 24 Stunden später mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen 3-MC (0,1, 1 und 10 µM) behandelt. Nach 18 Stunden wurden Lysate hergestellt, aus denen die relative Expression der Luziferase bestimmt wurde. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3-9 voneinander unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Die Behandlung der Zellen mit geringeren 3-MC Konzentrationen induzierten keinerlei Veränderungen der Aktivität des SeP-luc. Die Behandlung der Zellen mit 10 µM 3-MC rief jedoch eine signifikante Erniedrigung der Promotoraktivität auf fast die Hälfte hervor.

Die Überexpression der FoxO-Isoformen resultierte in einem ähnlichen Befund, wie in Abbildung 3.15 erkennbar ist. Hier führte eine Konzentration von 10 µM 3-MC und gleichzeitiger Überexpression von FoxO1a zu einer Senkung der Promotoraktivität von mindestens 50%. Unter vermehrter Expression der beiden anderen FoxO-Formen ließen sich keine Änderungen der Promotoraktivität erzielen.

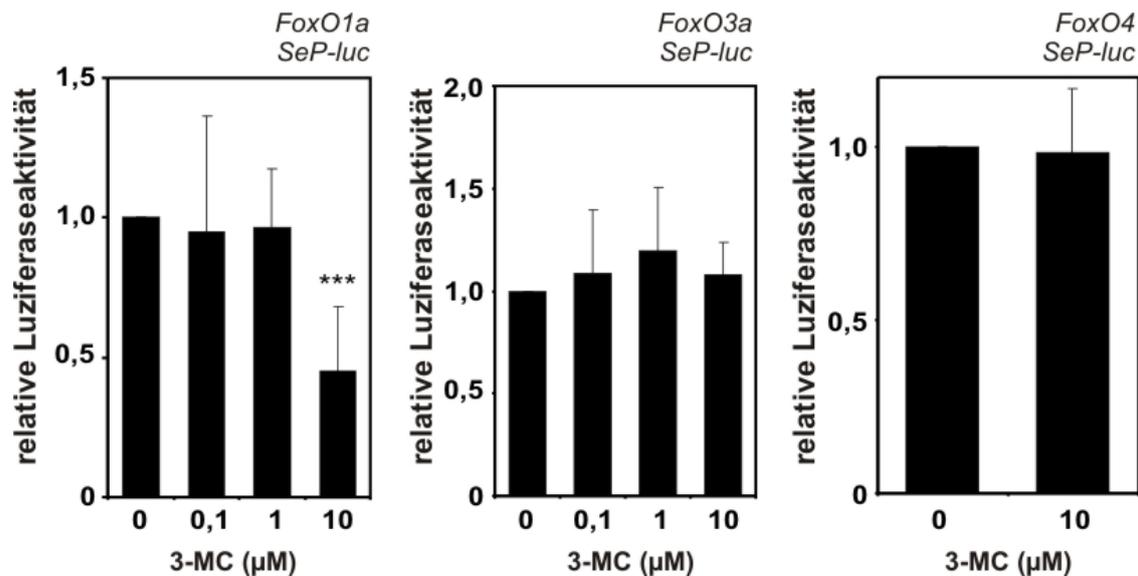


Abb. 3.15: 10 µM 3-MC verringert die SeP-Promotoraktivität bei gleichzeitiger Überexpression von FoxO1a

24 h nach der Cotransfektion von HepG2 Zellen mit SeP-luc und einem der 3 FoxO-Überexpressionsplasmide wurde für 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen 3-MC (0,1, 1 und 10 µM) oder DMSO (0,1%) behandelt. Die Luciferaseexpression wurde in den Lysaten bestimmt. Die Grafiken geben Mittelwerte aus 3-7 voneinander unterschiedlichen Experimenten \pm Standardabweichung wieder. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (***) $P < 0,001$.

Ähnlich wie im Fall des FHRE-luc Konstruktes reagierte auch das SeP-luc Konstrukt bei gleichzeitiger Überexpression von FoxO1a stärker auf den Stimulus als bei Überexpression der beiden anderen FoxO-Isoformen. Zusätzlich wurde auch der Effekt selbst nochmals verstärkt.

In Abbildung 3.16 sind die Ergebnisse für die Behandlung von mit SeP-luc transfizierten Zellen mit B(a)P unterschiedlicher Konzentrationen zusammengefasst. Die Behandlung dieser Zellen mit der geringsten Konzentration B(a)P (0,1 µM) resultierte in keiner der Transfektionskombinationen in einer Modulation der Promotoraktivität. Weder unter basalen FoxO-Spiegeln (Abb. 3.16A) noch nach Überexpression der FoxO-Isoformen 1a und 3a (Abb. 3.16B) wurde eine Änderung beobachtet. Erst bei Verwendung von höheren Konzentrationen konnte eine Modulation der SeP-luc Aktivität induziert werden. 1 µM B(a)P führten zu einer Aktivitätsverringerng um ca. 40% und 10 µM B(a)P senkte die Promotoraktivität um mindestens 60%.

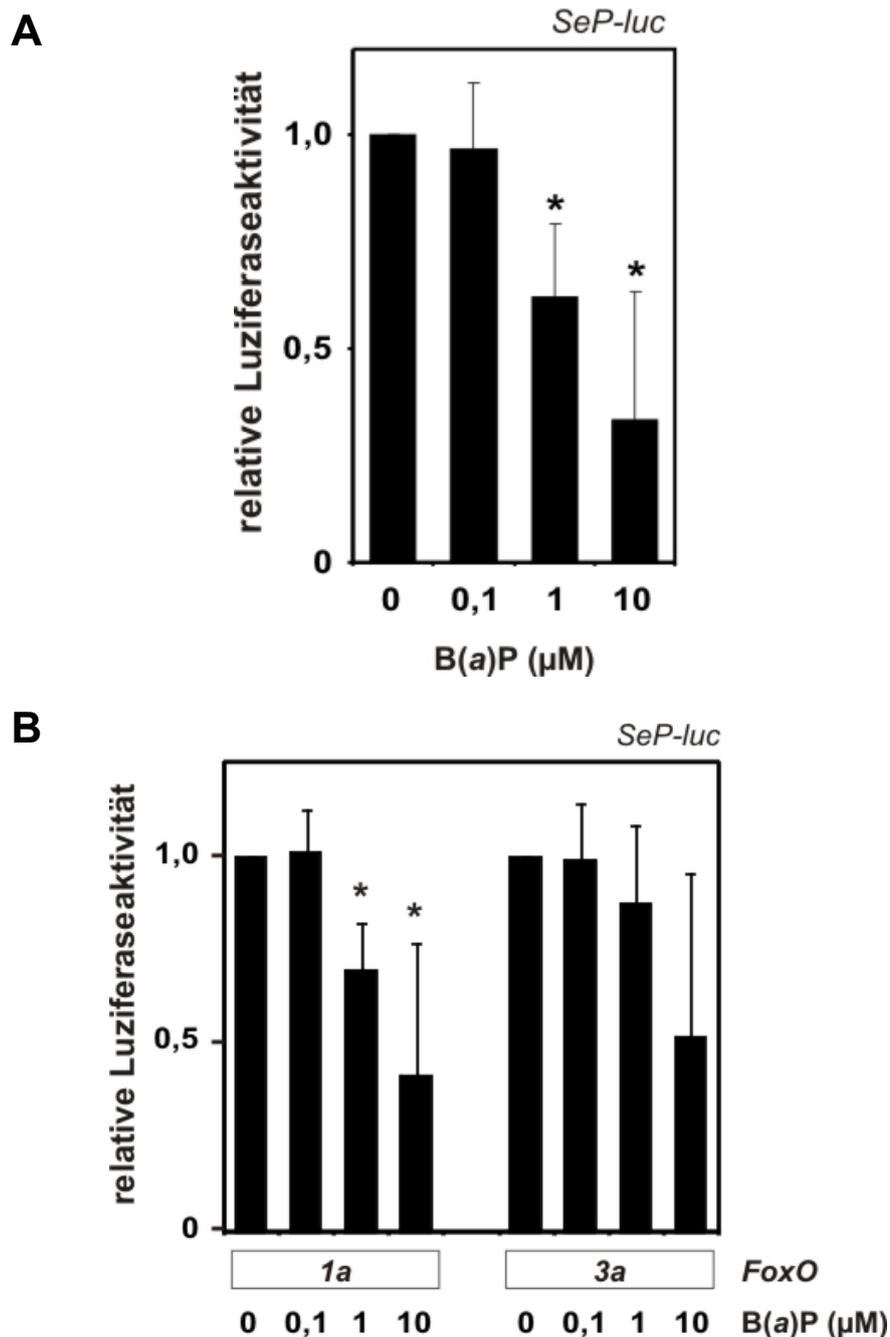


Abb. 3.16: Senkung der SeP-Promotoraktivität durch B(a)P

HepG2 Zellen wurden mit SeP-luc Plasmid sowie einem Kontrollplasmid (A) oder einem FoO1a/3a Überexpressionsplasmid (B) transfiziert und 24 h später mit unterschiedlichen Konzentrationen B(a)P (0,1, 1 und 10 µM) behandelt. 18 h später wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseexpression wurde ermittelt. Die Abbildungen sind Mittelwerte aus vier voneinander unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (* $P < 0,05$).

Aus den Ergebnissen des FHRE-luc (3.2.1.1) ging hervor, dass die Behandlung mit jeder der drei getesteten Substanzen, 3-MC, B(a)P und FICZ, zu einer Modulation der Aktivität des Promotors in die gleiche Richtung, nämlich einer Steigerung, führte. 3-MC sowie

B(a)P induzierten auch für den Selenoprotein P Promotor den gleichen Effekt: Die Promotoraktivität wurde gesenkt.

Interessanterweise reagierte das SeP-luc Konstrukt auf eine Behandlung mit FICZ nicht. Keine der verwendeten Konzentration von 10-200 nM FICZ verursachte eine Aktivitätsveränderung des SeP-Promotors (Abb. 3.17).

Weder im Fall von basalen, endogenen Proteinspiegeln der FoxO-Isoformen (Abb. 3.17A) noch nach Überexpression von FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 (Abb. 3.17B), wurde die Aktivität des SeP-luc moduliert.

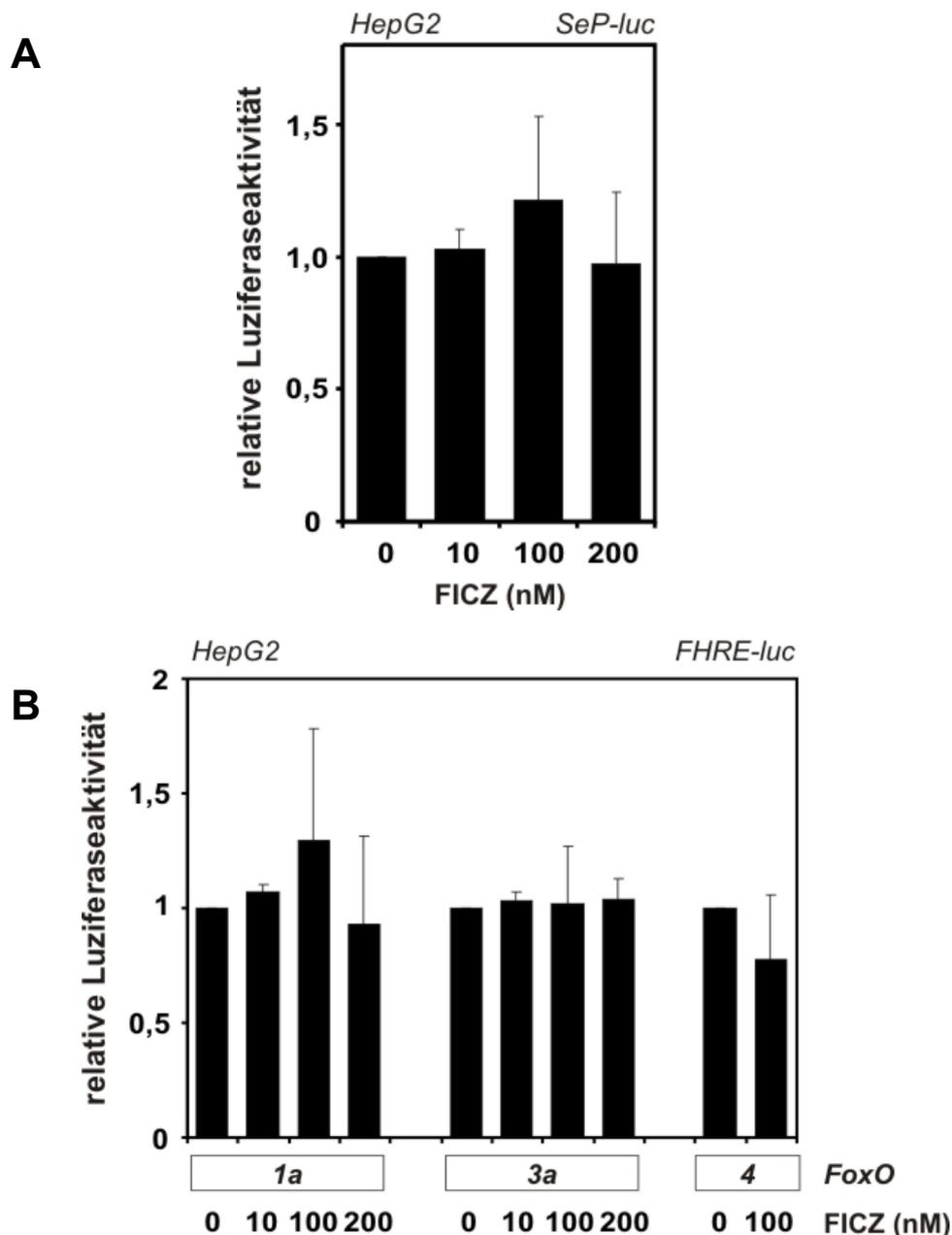


Abb. 3.17: Einfluss von FICZ auf die Aktivität des Selenoprotein P Promotors

HepG2 Zellen wurden entweder mit SeP-luc und einem Kontrollplasmid (A) oder einem der drei FoxO-Überexpressionsplasmide (B) transfiziert und 24 h später mit FICZ (10, 100 und 200 nM)

behandelt. DMSO (0,1%) diene als Lösemittelkontrolle. Nach der Lyse erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität. Die Daten sind Mittelwerte aus 3-5 voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Promotor des Selenoprotein P-Gens in völlig anderer Weise auf die Behandlung mit den Kohlenwasserstoffen reagierte als das FHRE-luc Konstrukt.

Mit einer Konzentration von 10 μ M 3-MC ließ sich sowohl basal als auch nach Überexpression von FoxO1a eine Senkung der Promotoraktivität von 50% erzielen. Die niedrigeren Konzentrationen sowie die Überexpression der beiden anderen FoxO-Isoformen induzierten keine Änderung der Promotoraktivität. Für die Behandlung mit B(a)P ergab sich ebenfalls eine Senkung der Aktivität. Dies trat bereits bei 1 μ M B(a)P auf, jedoch konnte dieser Effekt mit 10 μ M B(a)P auf eine Abnahme von über 50% im Vergleich zur Kontrolle erhöht werden.

Das Selenoprotein P-Reportergenkonstrukt reagierte in keiner Weise auf eine Behandlung mit FICZ. Es zeigte sich keine Änderung der Aktivität in dem Konzentrationsbereich zwischen 10 und 200 nM FICZ.

3.2.1.3 Einfluss von PAK und FICZ auf die Aktivität des Glucose 6-Phosphatase-Promotors

Die Expression der Glucose 6-Phosphatase steht ebenfalls unter der transkriptionellen Kontrolle der FoxO-Transkriptionsfaktoren. In den beiden vorangegangenen Kapiteln wurde beschrieben, dass die Reportergenkonstrukte FHRE-luc und SeP-luc nach Behandlung mit den Kohlenwasserstoffen unterschiedlich reagierten. Das ausschließlich FoxO-responsive Konstrukte zeigte durch die Behandlung eine Stimulation der Promotoraktivität, die Aktivität des SeP-luc hingegen wurde durch 3-MC und B(a)P gesenkt. Das G6Pase-luc-Konstrukt enthält den menschlichen Glucose 6-Phosphatase Promotor, der vor ein Luziferase-Gen kloniert ist (Schmoll et al., 1999) und wurde analog der beiden anderen Konstrukte auf Änderungen der Promotoraktivität untersucht.

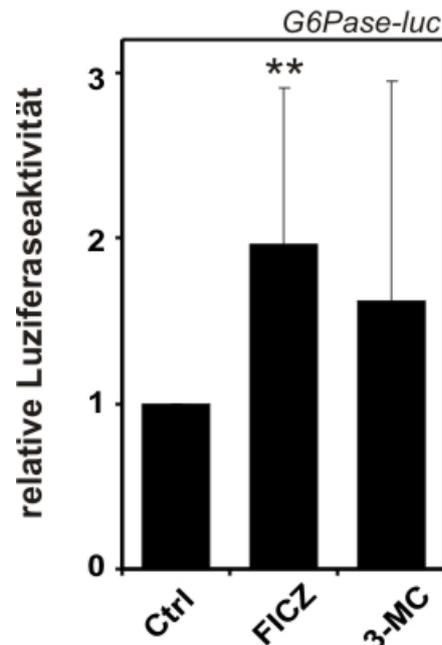


Abb. 3.18: Steigerung der G6Pase-Promotoraktivität durch FICZ und 3-MC

HepG2-Zellen wurden nach der Transfektion mit G6Pase-luc und einem Kontrollplasmid für 18 Stunden mit DMSO (0,1%), FICZ (100 nM) oder 3-MC (10 μ M) behandelt. Nach der Lyse wurde die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus 8-12 voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (** $P < 0,01$).

Unter basalen FoxO-Expressionsspiegeln (Abb. 3.18) kam es zu keiner eindeutigen Änderung der Aktivität des Promotors nach Behandlung mit 10 μ M 3-MC. Diese Konzentration wurde gewählt, weil sie bereits in den Experimenten mit dem FHRE-luc und dem SeP-luc den jeweils stärksten Effekt induziert hatte. Zwar war ein Trend zu einer Steigerung zu beobachten, jedoch reagierte das Konstrukt in zwei der acht durchgeführten Experimente mit einer Aktivitätsverringering.

Die Stimulation der transfizierten Zellen mit 100 nM FICZ resultierte in einer signifikanten Verdopplung der G6Pase-Promotoraktivität. Die Promotorkonstrukte SeP-luc (3.2.1.2) und G6Pase-luc reagierten in gegensätzlicher Weise: Die Aktivität des SeP-luc wurde durch Behandlung mit 3-MC signifikant verringert, wohingegen durch eine Behandlung mit FICZ kein Effekt auftrat. Die Aktivität des G6Pase-Konstruktes wies keine Modulation durch Inkubation mit 3-MC auf, jedoch eine Erhöhung durch Behandlung mit FICZ.

Auch für das G6Pase-luc Konstrukt sollte zunächst sichergestellt werden, dass die Überexpression jeder der FoxO-Isoformen zu einer Erhöhung der Promotoraktivität führt (Abb. 3.19).

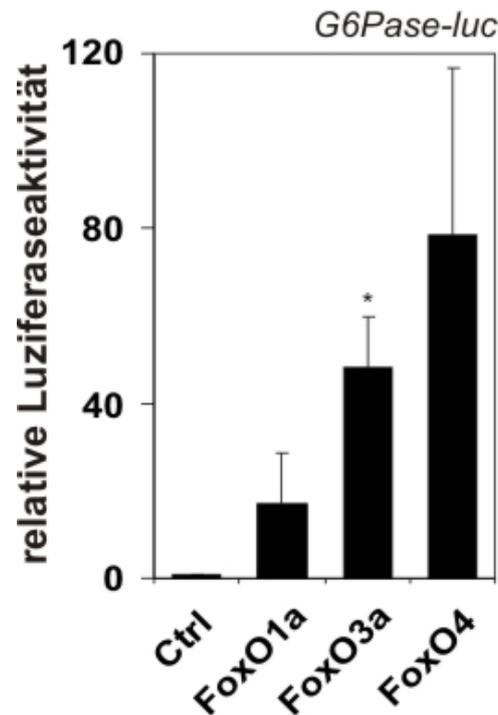


Abb. 3.19: Die Aktivität des G6Pase-Promotors wird durch FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 erhöht

HepG2-Zellen wurden mit G6Pase-luc, einem Kontrollplasmid oder einem der FoxO-Überexpressionsplasmide transfiziert. Die Aktivität der Cotransfektion mit dem Kontrollplasmid wurde gleich eins gesetzt und die übrigen Werte darauf normiert. Die Daten geben die Mittelwerte aus 3-5 voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung wieder. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (* $P < 0,05$).

Die vermehrte Expression von FoxO1a steigerte die Aktivität im Schnitt um das 17-fache, ein erhöhter FoxO3a-Spiegel führte zu einer 45-fachen und die Überexpression von FoxO4 zu einer 75-fachen Induktion des G6Pase-luc Konstruktes. Alle drei FoxO-Isoformen waren in der Lage, die Aktivität dieses Promotorkonstruktes in hohem Maß zu steigern.

Unter FoxO-Überexpressionsbedingungen wurde die Aktivitätsänderung des G6Pase-Promotors nach Behandlung mit 3-MC (10 μ M, Abb. 3.20A) und FICZ (100 nM, Abb. 3.20B) untersucht. Dazu wurden die Werte der Kontrollbehandlung gleich eins gesetzt und die übrigen Werte darauf normiert. Die Behandlung mit 3-MC resultierte bei Betrachtung der Einzelwerte zu 100% in einer Steigerung der Promotoraktivität. Das Ausmaß der Induktion war jedoch von Versuch zu Versuch sehr unterschiedlich.

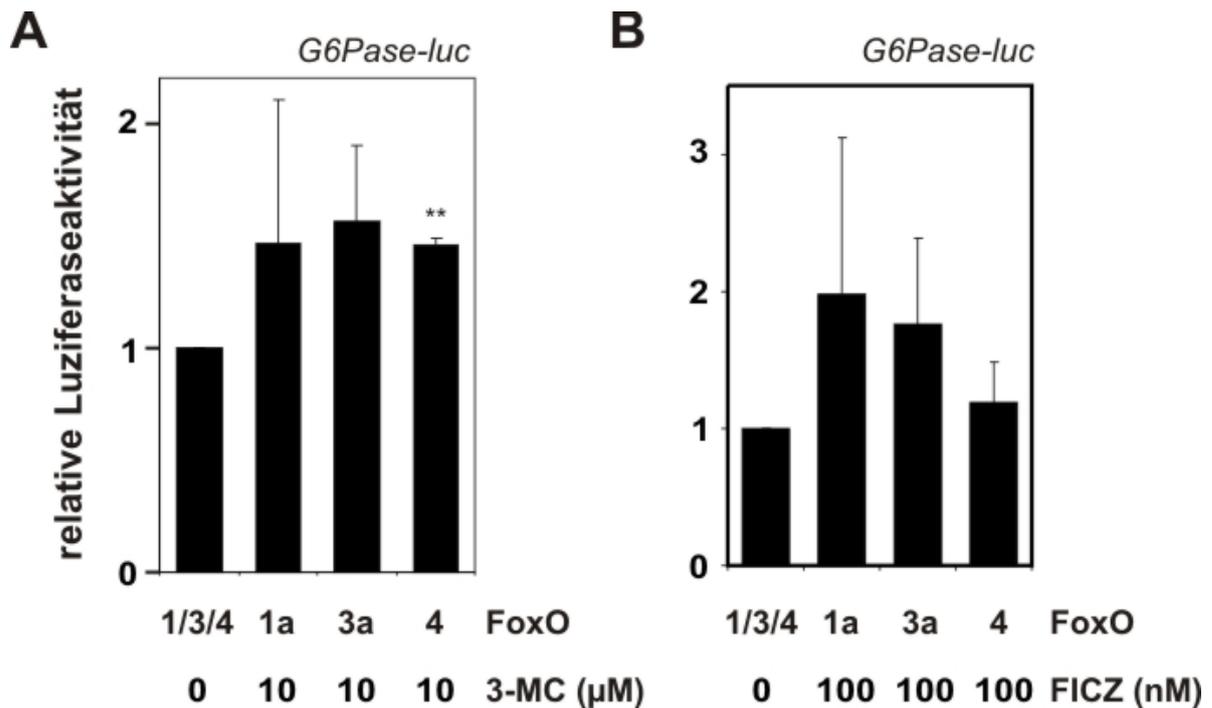


Abb. 3.20: 3-MC oder FICZ induzieren eine Erhöhung der G6Pase-Promotoraktivität

HepG2-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit G6Pase-luc und einem der 3 FoxO Überexpressionsplasmide mit 3-MC (10 μM) oder FICZ (100 nM) für 18 h behandelt. DMSO (0,1%) diente als Lösemittelkontrolle. Die Aktivitäten wurden später aus den Lysaten bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3-7 voneinander unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test ermittelt (** $P < 0,01$).

Die Behandlung der Zellen mit FICZ (Abb. 3.20B) resultierte ebenfalls in einer Erhöhung der Promotoraktivität. In einem der sieben durchgeführten Experimente ergab sich eine Senkung der G6Pase-luc-Aktivität nach Überexpression von FoxO1a und Stimulation mit FICZ.

Die verstärkte Expression der FoxO-Isoformen hatte eine starke Aktivitätssteigerung des Glucose 6-Phosphatasepromotors zur Folge. Das Ausmaß der Erhöhung war unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Behandlung mit FICZ induzierte im Mittel eine Verdopplung der Promotoraktivität unter basalen FoxO-Expressionsbedingungen. Nach Überexpression der FoxO-Isoformen wurde die Aktivität des Promotors durch 3-MC und FICZ stimuliert.

3.2.1.4 Aktivitätsänderungen des MnSOD-Promotors nach Behandlung mit 3-MC und FICZ

Als letzte durch FoxO regulierte Zielstruktur wurde ein Promotorkonstrukt der Mangan-superoxiddismutase (MnSOD-luc) betrachtet.

In Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Das MnSOD-Reportergenkonstrukt zeigte eine Erhöhung der Aktivität nach Überexpression von FoxO1a gegenüber dem Kontrollplasmid. Sowohl ohne als auch mit Überexpression von FoxO1a reagiert das Reportergenkonstrukt mit einer Aktivitätsverringering nach Behandlung mit 100 nM FICZ sowie 10 μ M 3-MC. Für die Stimulation mit 3-MC ist dieser Sachverhalt demnach mit dem für das SeP-luc beobachteten vergleichbar.

Da die Daten nur aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten stammen, lässt sich im Falle des MnSOD-luc Konstruktes nur von einer Tendenz sprechen, jedoch führten die Behandlungen in beiden Experimenten immer zu einer Senkung der Promotoraktivität gegenüber der DMSO-Behandlung.

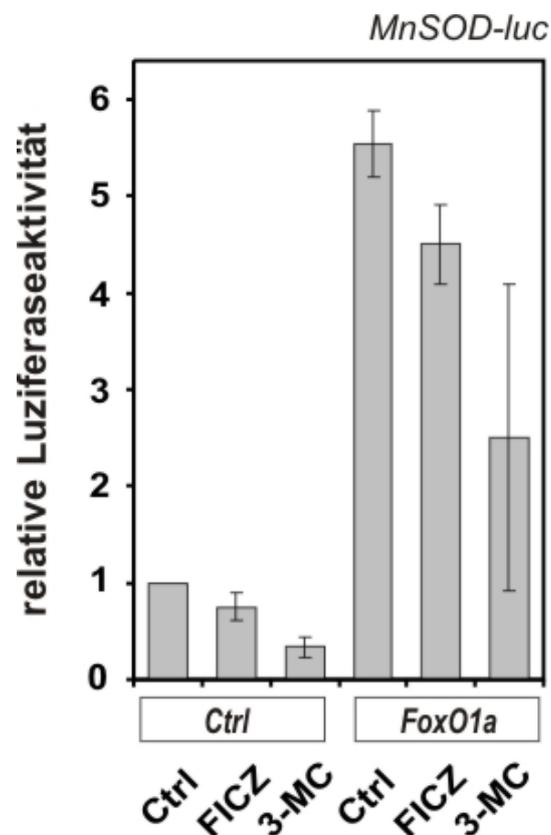


Abb. 3.21: Die Aktivität des MnSOD-Promotors wird durch 3-MC und FICZ gesenkt

HepG2 Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit MnSOD-luc, dem Kontrollplasmid pCI-Neo oder dem FoxO1a-Überexpressionsplasmid mit 3-MC (10 μ M), FICZ (100 nM) oder DMSO (0,1%) für 18 h behandelt. Nach Bestimmung der Luziferaseaktivität aus den Lysaten wurde die DMSO-Behandlung der Cotransfektion mit dem Kontrollplasmid gleich eins gesetzt und die

übrigen Daten darauf normiert. Die Daten sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten \pm der Schwankungen um den Mittelwert.

Die bisherigen Ergebnisse für die vier verschiedenen FoxO-responsiven Reportergenkonstrukte zeigen ganz unterschiedliche Antworten auf eine Behandlung mit 3-MC, B(a)P oder FICZ. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der Reporteranalysen aus den vorangegangenen Kapiteln zusammengefasst. Die zum Teil je nach überexprimierter FoxO-Isoform beobachteten Unterschiede sind nicht berücksichtigt.

Tab. 3.1: Übersicht über die Effekte, die die getesteten Substanzen auf die Reporterstrukturen auslösten^a

Reporterplasmid	3-MC	B(a)P	FICZ
FHRE-luc	↑ ^b	↑	↑
SeP-luc	↓	↓	—
G6Pase-luc	↑	n. a.	↑
MnSOD-luc	↓	n. a.	↓

^a Die Tabelle stellt die primären Tendenzen zusammen, mit der die Konstrukte FHRE-luc, SeP-luc, G6Pase-luc und MnSOD-luc in den Reporteranalysen auf die Behandlung mit den Substanzen 3-MC, B(a)P und FICZ reagierten. Die Varianzen bei Überexpression der unterschiedlichen FoxO-Isoformen oder durch unterschiedliche Konzentrationen werden nicht einbezogen.

^b Pfeil nach oben/unten: Aktivitätssteigerung/-senkung des Konstruktes; —: keine Änderung; n.a.: nicht analysiert.

Das ausschließlich FoxO-responsive FHRE-luc Konstrukt reagierte nach der Behandlung mit allen drei Substanzen mit einer Erhöhung der Promotoraktivität. Dies spricht für eine Steigerung der FoxO-Aktivität in Hinblick auf die Kontrolle der Transkription.

Der SeP-Promotor wurde durch Behandlung mit FICZ nicht beeinflusst. Durch die Behandlung mit 3-MC und B(a)P war jedoch eine Senkung der Aktivität zu beobachten. Dieser Umstand spricht für einen insulinmimetischen Effekt der PAK, gleichbedeutend mit einer Aktivitätsverminderung der FoxO-Proteine bzgl. Regulation der Transkription.

Umgekehrt induzierte für den G6Pase-Promotor besonders die Behandlung mit FICZ eine Stimulation der Promotoraktivität.

Das MnSOD-luc Promotorkonstrukt reagierte ähnlich wie das SeP-luc Konstrukt. Hier ließ sich zwar im Gegensatz zum SeP-luc auch durch FICZ eine Aktivitätssenkung induzieren. Die durch die 3-MC-Behandlung hervorgerufene Senkung der Promotoraktivität ist jedoch vergleichbar zu der des SeP-luc.

In einigen Fällen führte besonders die Überexpression von FoxO1a und weniger die der anderen Isoformen zu einer Verstärkung des durch die PAK oder FICZ induzierten Effektes.

3.2.2 Einfluss von 3-MC und FICZ auf die DNA-Bindungsfähigkeit von FoxO1a

Die Experimente des ausschließlich FoxO-responsiven Konstruktes FHRE-luc deuteten auf eine Aktivitätserhöhung der FoxO-Proteine bzgl. der transkriptionellen Regulation hin. Dies sollte in DNA-Bindungsexperimenten für die Substanzen FICZ und 3-MC überprüft werden. Das Prinzip dieses ELISA-basierten Systems wurde bereits in Kapitel 3.1 erläutert.

HepG2-Zellen wurden vor der Behandlung mit 10 μ M 3-MC und 100 nM FICZ für 24 h in serumfreiem Medium gehalten. Nach der Behandlung erfolgte die Isolation der Kerne, in denen aktives FoxO1a nachgewiesen wurde.

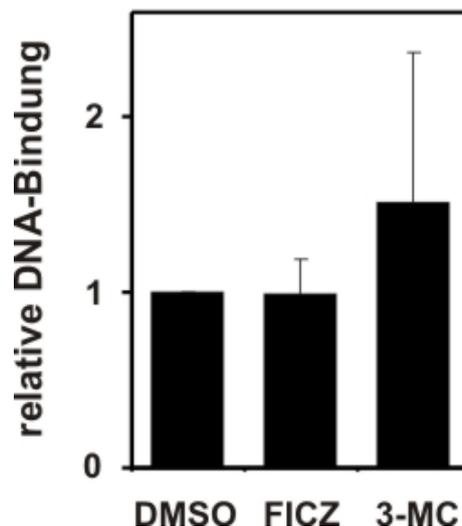


Abb. 3.22: Einfluss von 3-MC und FICZ auf die DNA-Bindfähigkeit von FoxO1a

HepG2-Zellen wurden 24 h in serumfreiem Medium gehalten bevor die Behandlung mit FICZ (100 nM), 3-MC (10 μ M) oder DMSO (0,1%) für zwei Stunden erfolgte. Die Zellen wurden lysiert und die Kerne extrahiert. Unter Zuhilfenahme eines ELISA-basierten Bindungstestsystems wurde die Bindungskapazität von FoxO1a bestimmt. Die Daten geben die Mittelwerte aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung wieder.

Tatsächlich zeigte sich eine leichte Tendenz zu einer Steigerung der FoxO-DNA-Bindung nach vorhergehender Behandlung der Zellen mit 3-MC, wie in Abbildung 3.22 erkennbar ist. Hingegen induzierte die Behandlung mit FICZ keinerlei Veränderung der DNA-Bindungskapazität von FoxO1a.

Die Daten bestätigen die Ergebnisse der Reporteranalysen des FHRE-luc Konstruktes nur zum Teil. In diesen Experimenten führte die Behandlung der Zellen mit FICZ zu einer starken und signifikanten Steigerung der Promotoraktivität. Dieser Effekt konnte in dem DNA-Bindungsexperiment zwar nicht beobachtet werden. Jedoch hatte eine Behandlung mit 3-MC im Reporterexperiment eine Aktivitätssteigerung des FHRE-luc zur Folge, die im Bindungsexperiment bestätigt werden konnte.

3.2.3 Durch Behandlung mit 3-MC induzierte Änderungen des mRNA-Spiegels von SeP

Die Aktivität des Selenoprotein P-Promotors wurde nach Behandlung mit 10 μ M 3-MC um fast die Hälfte verringert (3.2.1.2). Ob diese Verringerung der Promotoraktivität im Reporterexperiment auch auf der Ebene der mRNA-Expression beobachtet werden kann, wurde mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR untersucht.

Zur Analyse der SeP-mRNA Spiegel wurden HepG2 Zellen vor der Behandlung mit 3-MC für 24 h in serumfreiem Medium gehalten, um die Aktivierung von Signalwegen zu verringern. Anschließend wurden die Zellen für 8 und 18 h mit 10 μ M 3-MC oder 100 nM Insulin in serumfreiem Medium behandelt. Als Kontrolle für die Behandlung mit 3-MC diente 0,1% DMSO, als Kontrolle für die Insulinbehandlung entsprechend serumfreies Medium. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und für eine quantitative Echtzeit-PCR verwendet.

Es war eindeutig erkennbar (Abb. 3.23A), dass der SeP-mRNA Spiegel durch die Exposition mit 3-MC gesenkt wurde. Sowohl die 8-stündige als auch die 18-stündige Behandlung verringerte den relativen Gehalt der Selenoprotein P-mRNA um 50%. Wie in den Promotorstudien wirkt 3-MC demnach auch hier insulinmimetisch.

Für die Experimente der Echtzeit-PCR wurden zwei Kontrollen durchgeführt. Zum einen wurde der relative Gehalt der Cyp11a1 mRNA analysiert, da 3-MC bekanntermaßen die

Bildung von Cyp1a1 induziert (Abb. 3.23B, links). Dies wurde unter den gewählten Bedingungen erreicht. Als zweite Kontrolle wurde eine Behandlung der Zellen mit Insulin durchgeführt, was erwartungsgemäß zu einer Verringerung der SeP-mRNA führte. Die Behandlung mit Insulin induzierte in den Zellen für beide Zeitpunkte eine Abnahme des mRNA Spiegels um 50-60% (Abb.3.23B, rechts).

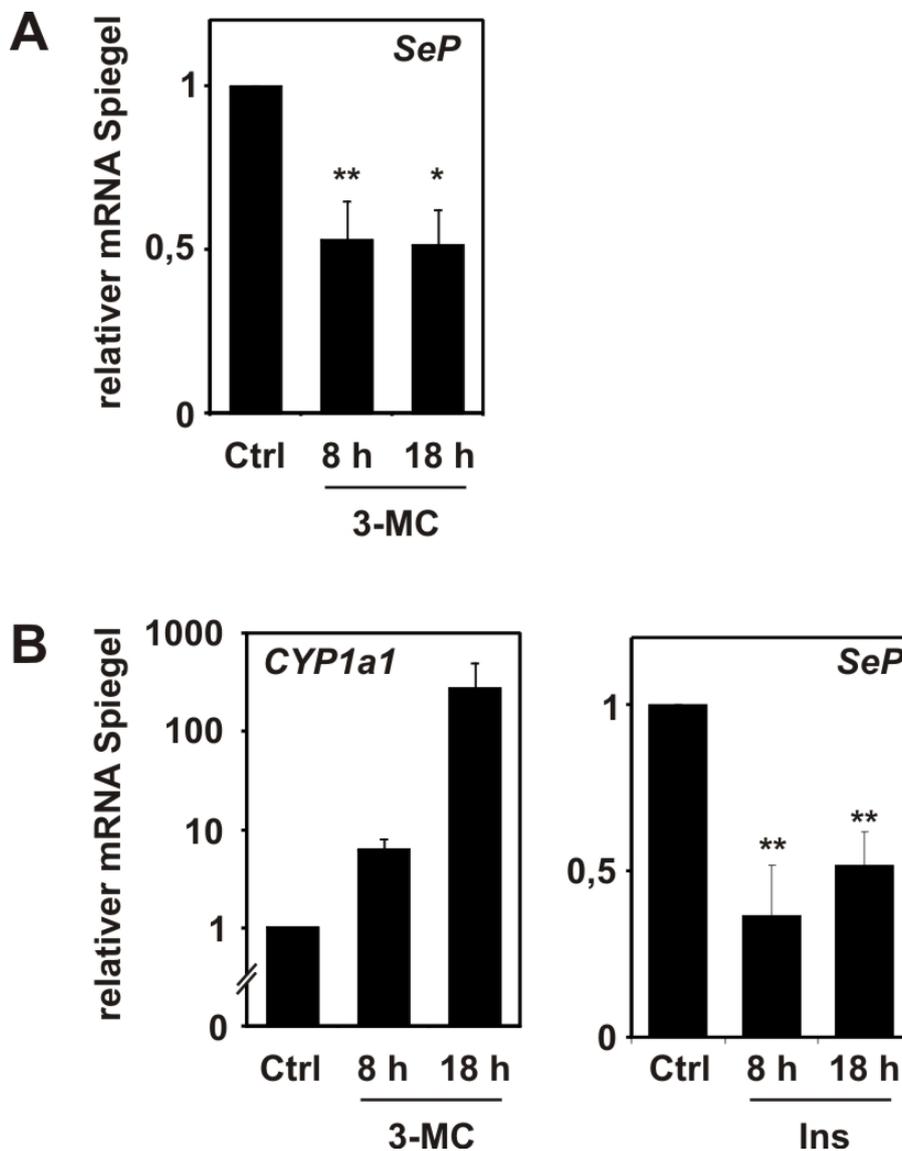


Abb. 3.23: Verringerung der SeP-mRNA durch 3-MC

HepG2 Zellen wurden 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Behandlung mit 3-MC (10 μ M) bzw. DMSO (0,1%) und Insulin (100 nM) für 8 und 18 h erfolgte in serumfreiem Medium, das für die Insulinbehandlung gleichfalls als Kontrolle diente. Anschließend wurde die Total-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relativen mRNA Spiegel von Selenoprotein P (SeP) und Cytochrom P450 1a1 (Cyp1a1) mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (**P<0,01; *P<0,05).

3.2.4 Wirkung der PAK und FICZ auf den durch Insulin induzierten Effekt

Die Aktivität der FoxO-Proteine wird unter anderem über den PI3K/Akt-Signalweg nach Stimulation mit Insulin beeinflusst. Insulin induziert eine Phosphorylierung der FoxO-Faktoren. Diese Phosphorylierung führt zu einer Deaktivierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren und zu ihrer Translokation vom Zellkern ins Cytoplasma.

Bezogen auf das Reportergenkonstrukt FHRE-luc wurde der gegenteilige Effekt durch 3-MC und FICZ induziert (3.2.1). Es stellte sich die Frage, ob Insulin in der Lage ist, diesen Effekt zu antagonisieren, bzw. ob umgekehrt 3-MC oder FICZ eine Antagonisierung des Insulin-vermittelten Effektes hervorruft.

Dazu wurde erneut das FHRE-Reportergenkonstrukt verwendet. HepG2 Zellen wurden mit dem FHRE-luc und einem Kontrollplasmid bzw. dem FoxO1a Überexpressionsplasmid transfiziert und mit 3-MC oder FICZ oder den Kombinationen aus Insulin/DMSO, Insulin/3-MC oder Insulin/FICZ für 18 Stunden behandelt.

Das Ergebnis dieser Coinkubationsexperimente ist in Abbildung 3.24 dargestellt. Wie in Kapitel 3.2.1 bereits beschrieben, reagierte das FHRE-luc Konstrukt nach der Kontrollbehandlung (DMSO) mit einer erhöhten Aktivität bei gleichzeitiger Überexpression von FoxO1a. Ebenso induzierten 3-MC (Abb 3.24A) und FICZ (Abb 3.24B) in beiden Fällen eine Steigerung der Promotoraktivität. Erwartungsgemäß führte die Stimulation der Zellen mit Insulin zu einer Abnahme der Promotoraktivität um 25%. Diese Abnahme wurde bei gleichzeitiger FoxO1a-Überexpression auf 70% erhöht.

Die gleichzeitige Behandlung mit Insulin und 3-MC bzw. FICZ resultierte in einer Promotoraktivität, die ungefähr in der Mitte derer liegt, die die Substanzen allein induzierten. Sowohl für die Transfektion mit dem Kontrollplasmid als auch nach Überexpression von FoxO1a lag die resultierende Promotoraktivität jedoch immer über der der Kontrollbehandlung mit DMSO.

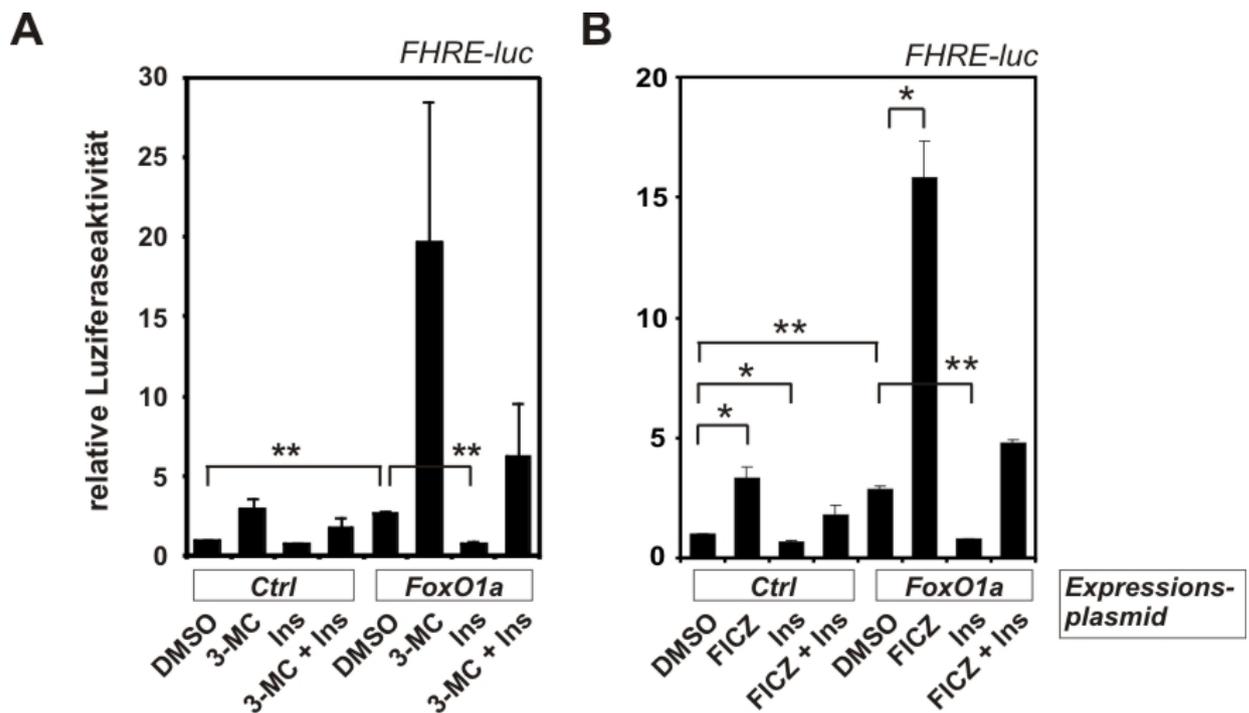


Abb. 3.24: Antagonisierung der insulin-induzierten Senkung FoxO-spezifischer Promotoraktivität durch 3-MC oder FICZ

HepG2-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem FHRE-luc Plasmid und einem Kontrollplasmid oder dem Überexpressionsvektor für FoxO1a für 18 h mit 3-MC (10 μ M, A) oder FICZ (100 nM, B), Insulin/DMSO (Ins; 100 nM/0,1%), 3-MC/Insulin (10 μ M/100 nM) oder FICZ/Insulin (100 nM/100 nM) behandelt. Als Lösemittelkontrolle diente DMSO (0,1%). Die Luziferaseaktivität wurde aus den Lysaten bestimmt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen t-Tests errechnet (* P <0,05; ** P <0,01).

Anders als für die Ergebnisse dieses Reportergenexperimentes lag die Kapazität von FoxO1a zur DNA-Bindung nach einer Coinkubation nicht zwischen den Effekten, die durch die Substanzen allein hervorgerufen wurden (Abb. 3.25). Die Coinkubation von FICZ und 3-MC mit Insulin führte im Bindungsexperiment nicht zu einer Antagonisierung der Effekte. FoxO1a reagierte nach Stimulation mit Insulin/DMSO mit einer Senkung der DNA-Bindungsfähigkeit um 50%. Weder durch die gleichzeitige Inkubation mit FICZ noch mit 3-MC wurde eine Verstärkung oder auch Schwächung dieses Effektes bewirkt.

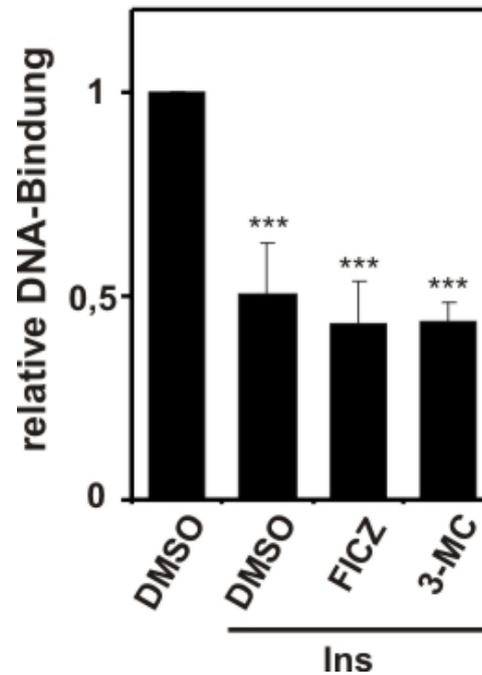


Abb. 3.25: Einfluss von 3-MC oder FICZ bei gleichzeitiger Inkubation mit Insulin auf die DNA-Bindefähigkeit von FoxO1a

HepG2-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium gehalten bevor die Behandlung mit FICZ/Insulin (beide 100 nM), 3-MC/Insulin (10 μ M/100 nM) oder DMSO (0,1%) bzw. DMSO/Insulin für zwei Stunden erfolgte. Die Zellen wurden lysiert und die Kerne extrahiert. Unter Zuhilfenahme eines ELISA-basierten DNA-Bindungstests wurde das Ausmaß der Bindung von FoxO an die DNA bestimmt. Die Daten geben die Mittelwerte aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung wieder. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen t-Tests errechnet ($***P < 0,001$).

Im Gegensatz zum FHRE-luc Reportergenkonstrukt reagierte das SeP-luc Promotorkonstrukt nicht mit einer Steigerung der Aktivität durch 3-MC, sondern mit einer Verringerung (3.2.1.2). Auch der mRNA-Spiegel des Selenoproteins P wurde durch die Behandlung mit 3-MC verringert (3.2.3).

Die Aktivität des Selenoprotein P-Promotors wurde durch die Inkubation der Zellen mit Insulin gesenkt (Abb. 3.26). Bei Coinkubation von 3-MC und Insulin erfolgte eine Verstärkung der durch die Substanzen allein induzierten Aktivitätssenkung. Insgesamt kam es unter basalen FoxO1a-Proteinspiegeln zu einer Aktivitätsverringern von 80%. Wurde FoxO1a überexprimiert, wurde die Aktivität des Promotors durch 3-MC und Insulin ebenfalls verringert, verglichen mit der DMSO-Behandlung. Bei simultaner Behandlung mit beiden Stimuli verblieb im Vergleich zur Kontrollbehandlung eine Aktivität von 30%.

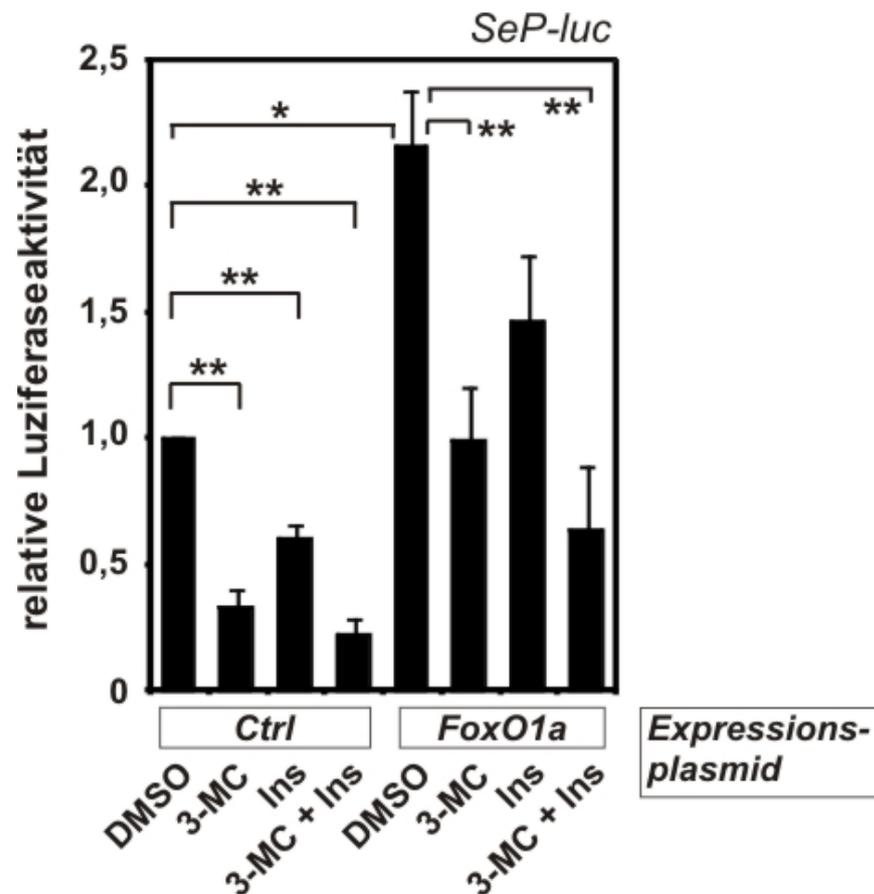


Abb. 3.26: Antagonisierung der Wirkung von Insulin auf den Selenoprotein P-Promoter durch 3-MC

HepG2 Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem SeP-luc Plasmid und einem Kontrollplasmid oder dem Überexpressionsvektor für FoxO1a für 18 h mit 3-MC (10 μ M), Insulin/DMSO (Ins; 100 nM/0,1%) oder 3-MC/Insulin (10 μ M/100 nM) behandelt. Als Lösemittelkontrolle diente DMSO (0,1%). Die Luziferaseaktivität wurde aus den Lysaten bestimmt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen t-Tests errechnet (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Auch für das G6Pase-luc Konstrukt wurde ein Reporterexperiment unter Coinkubation von FICZ mit Insulin durchgeführt (Abb. 3.27). Die Effekte der DMSO-Behandlung wurden jeweils gleich eins gesetzt. Wie bereits in Kapitel 3.2.3 beschrieben, war eine bis zu dreifache Steigerung der Promotoraktivität die Folge einer Behandlung der Zellen mit FICZ. Dies war sowohl bei basaler FoxO-Expression (Abb. 3.27A) als auch nach Überexpression von FoxO1a und FoxO3a (Abb. 3.27B) der Fall. In beiden Fällen resultierte die Stimulation mit Insulin in einer Abnahme der Aktivität des G6Pase-luc.

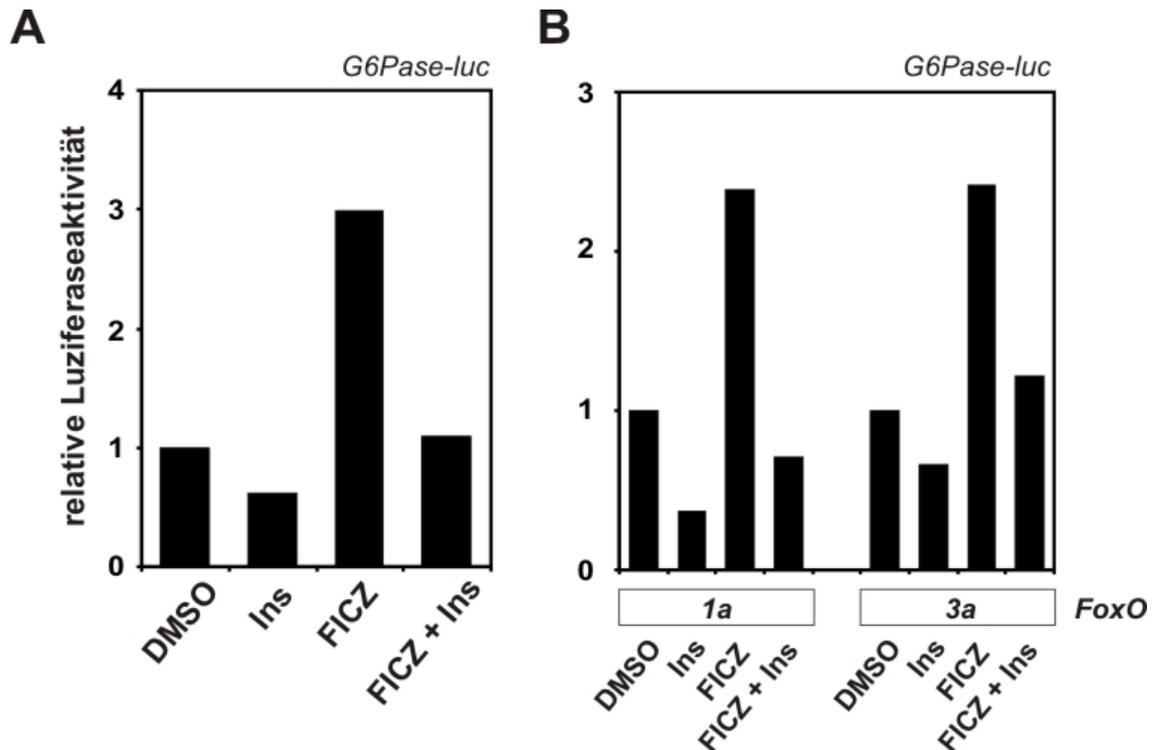


Abb. 3.27: Antagonisierung der durch Insulin induzierten Verringerung der G6Pase-Promotoraktivität durch Coinkubation mit FICZ

HepG2 Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit G6Pase-luc und einem Kontrollplasmid (pcI-Neo, A), dem FoxO1a- oder FoxO3a Überexpressionsplasmid (B) mit FICZ (100 nM), Insulin/DMSO (Ins; 100 nM/0,1%) oder FICZ/Insulin für 18 h behandelt. DMSO diente als Lösemittelkontrolle. Aus den Lysaten wurde die Luziferaseaktivität ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Behandlung mit beiden Substanzen, Insulin und FICZ, führte zu einer Promotoraktivität, die oberhalb der durch Insulin induzierten bzw. unterhalb der durch FICZ induzierten lag. Dieser Effekt wurde unter basalen FoxO-Proteinspiegeln (Abb. 3.27A) wie auch nach Überexpression von FoxO1a oder 3a (Abb. 3.27B) beobachtet. Im Falle des G6Pase-luc antagonisieren beide Substanzen einander in ganz ähnlicher Weise, wie es für das ausschließlich FoxO-responsive FHRE-luc beschrieben wurde.

FoxO-Proteine werden durch Akt nach Stimulation von Zellen mit Insulin phosphoryliert. Nach den vorangegangenen Ergebnissen müsste diese Phosphorylierung durch 3-MC entweder antagonisiert (Ergebnisse des FHRE-luc) oder verstärkt (Ergebnisse des SeP-luc) werden. Mittels Western Blot Analysen wurde dies untersucht.

Dafür wurden HepG2 Zellen für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Darauf wurden sie zum einen mit 3-MC und B(a)P in An- oder Abwesenheit von Insulin (Abb. 3.28A) für 8 Stunden inkubiert. Zum anderen erfolgte eine Präinkubation mit den PAK für 7,5 Stunden, woraufhin Insulin für weitere 30 Minuten zugegeben wurde (Abb. 3.28B). Die Zellen wurden lysiert und mit phosphospezifischen Antikörpern für Akt und FoxO1/3 mittels Immunoblot untersucht.

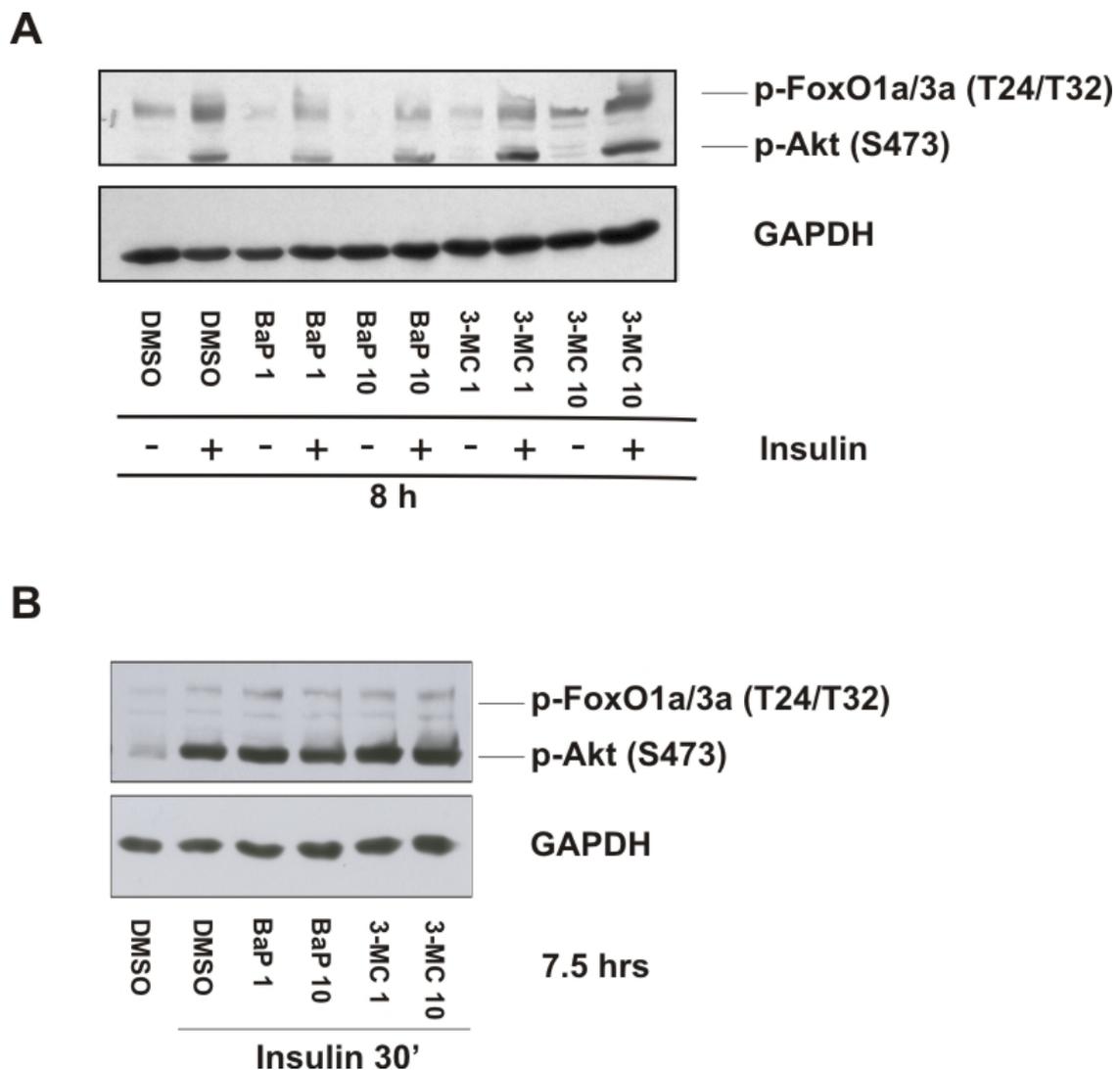


Abb. 3.28: Effekt von 3-MC und B(a)P auf durch Insulin induzierte Akt-Phosphorylierung

HepG2-Zellen wurden vor der Behandlung in serumfreiem Medium für 24 Stunden inkubiert. Darauf wurden die Zellen für 8 h mit 3-MC oder B(a)P (1 und 10 μ M) in An- oder Abwesenheit von Insulin (100 nM) behandelt (A) oder mit 3-MC oder B(a)P für 7,5 h präinkubiert, gefolgt von der Zugabe von Insulin für weitere 30 min (B). DMSO (0,1%) diente als Lösemittelkontrolle. Die Analyse der Phosphorylierung von Akt erfolgte mit phosphospezifischen Antikörpern mittels Western Blot aus den Lysaten. Die hier gezeigten Western Blots sind für drei voneinander unabhängige Experimente repräsentativ.

Die Substanzen 3-MC und B(a)P induzierten nach einer Behandlungsdauer von acht Stunden keine oder nur eine sehr schwache Akt-Phosphorylierung. Die Coinkubation mit Insulin führte zu einer erhöhten Akt-Phosphorylierung. Auch die FoxO-Isoformen 1 und 3 wurden durch die Coinkubation mit Insulin stärker phosphoryliert als in Abwesenheit von Insulin. Die Coinkubation von B(a)P mit Insulin schien in einer leicht verringerten Phosphorylierung von Akt und FoxO1/3 im Vergleich zur Kontrolle zu resultieren. Dieser Umstand konnte in den Spuren der mit 3-MC behandelten Proben nicht festgestellt werden.

Wurde mit den PAK vorinkubiert und 30 Minuten vor der Lyse Insulin hinzupipettiert (Abb. 3.28B), konnte keine Verstärkung oder Schwächung der durch Insulin hervorgerufenen Phosphorylierung von Akt beobachtet werden.

Die Western Blot-Analysen zeigen, dass keine eindeutigen Veränderungen in der durch Insulin induzierten Phosphorylierung von Akt und FoxO1/3 durch zusätzliche Stimulation mit den PAK hervorgerufen wurden. Die in den Reporterexperimenten beobachteten Änderungen der Promotoraktivität werden somit vermutlich nicht über den PI3K/Akt Signalweg hervorgerufen. Wenn die PAK über diese Signalkaskade Einfluss auf die FoxO-Transkriptionsfaktoren ausüben würden, müssten zudem alle Promotorkonstrukte mit Aktivitätsveränderungen in die gleiche Richtung, entweder einer Steigerung oder einer Senkung, reagieren.

Die Phosphorylierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Akt führt zu einer Delokalisation der FoxO-Faktoren aus dem Zellkern ins Cytoplasma. Nach Coinkubation von 3-MC bzw. FICZ mit Insulin wurde die Lokalisation von FoxO1a-Fusionsproteinen untersucht. Dazu wurden HepG2 Zellen nach der Transfektion mit einem FoxO1a-EGFP Plasmid für zwei Stunden mit DMSO (0,1%) 3-MC (10 μ M) oder FICZ (100 nM) jeweils in An- oder Abwesenheit von Insulin (100 nM) behandelt. Die Lokalisation des FoxO1a-Fusionsproteins wurde fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

Abbildung 3.29 zeigt repräsentative Bilder dieser Untersuchungen. Die Behandlung mit DMSO führte zu einer relativ gleichmäßigen Verteilung der FoxO1a-GFP Proteine. Sie waren sowohl kernständig als auch cytoplasmatisch lokalisiert. Unter gleichzeitiger Stimulation mit Insulin wurde eine Delokalisierung der FoxO1a-GFP Proteine aus dem Zellkern beobachtet. Für den größten Teil der Zellen war FoxO1a-GFP im Cytoplasma lokalisiert.

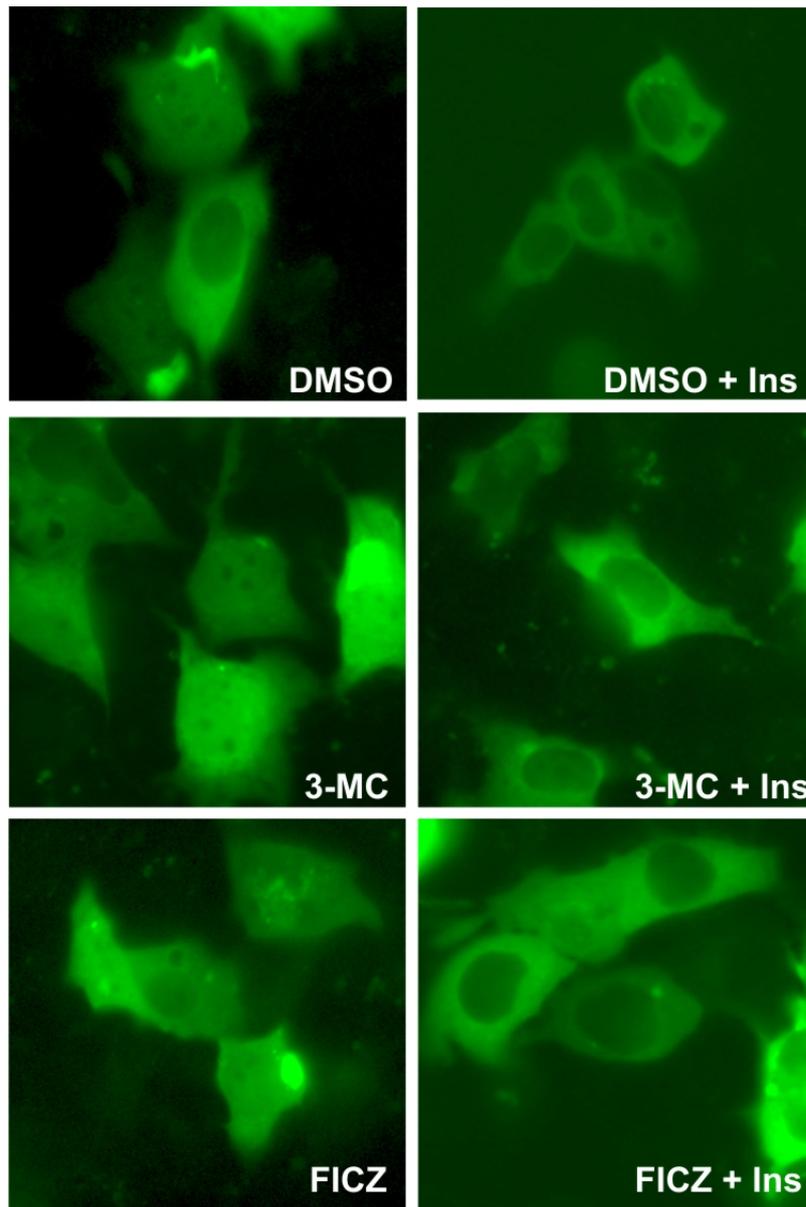


Abb. 3.29: Einfluss von 3-MC und FICZ auf die durch Insulin induzierte Exklusion von FoxO1a aus dem Zellkern

HepG2-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit einem FoxO1a-EGFP Plasmid für zwei h mit DMSO (0,1%), 3-MC (10 μ M) oder FICZ (100 nM) jeweils in An- oder Abwesenheit von Insulin (100 nM) behandelt. Die Lokalisationsveränderungen von FoxO1a-GFP wurden fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Die gezeigten Bilder repräsentieren drei voneinander unabhängige Versuche mit ähnlichen Ergebnissen.

Wurden die Zellen mit 3-MC oder FICZ behandelt, war wie nach DMSO-Behandlung eine relative Gleichverteilung der FoxO1a-Fusionsproteine in den Zellkompartimenten zu beobachten. Weder durch Inkubation von 3-MC mit Insulin noch durch Behandlung mit FICZ und Insulin wurde der durch Insulin hervorgerufene Effekt minimiert. Die FoxO1a-

GFP Proteine waren wie nach der Behandlung mit Insulin allein hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert.

Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen aus den Western Blot Analysen. Die Phosphorylierung der FoxO-Faktoren durch Akt ist mit einer Exklusion der FoxO-Proteine aus dem Zellkern verbunden. Weder im Western Blot ergaben sich eindeutige Veränderungen der durch Insulin induzierten Phosphorylierung durch gleichzeitige Behandlung mit 3-MC, noch war ein Einfluss von 3-MC auf den insulininduzierten Zellkernausschluss der FoxO1a-GFP Proteine ersichtlich.

3.2.5 Bedeutung der FoxO- und HNF-4 α -Bindestellen innerhalb des Selenoprotein P-Promotors für die durch 3-MC induzierte Aktivitätsveränderung

Reportergenanalysen ergaben in Kapitel 3.2.1, dass die Aktivität eines ausschließlich FoxO-responsiven Promotors, des FHRE-luc, durch die Exposition mit 3-MC, B(a)P und FICZ moduliert wird. Die transkriptionsstimulierende Aktivität der FoxO-Faktoren wurde hierbei gesteigert, da es zu einer Erhöhung der Luziferaseaktivität kam. Untersuchungen am SeP-luc-Konstrukt zeigten ebenfalls, dass 3-MC die Promotoraktivität moduliert, jedoch war hier eine Senkung der Promotoraktivität festzustellen. Auch der mRNA-Spiegel des Selenoproteins P wurde durch Stimulierung von Zellen mit 3-MC gesenkt.

Die Konsensussequenz des DNA-Bindeelementes für FoxO-Transkriptionsfaktoren lautet GTAAA(T/C)AA. Wie bereits erwähnt, beinhaltet der Promotor des Selenoprotein P-Gens zwei FoxO-Bindestellen. Das DBE1 an der Position -351 bis -344 ist ein inverses Element. Ein klassisches Motif befindet sich innerhalb der Positionen von -115 bis -108 (DBE2). Durch Verwendung von Reporterkonstrukten, die Mutationen in diesen DBE aufweisen, wurde analysiert, ob die Bindestellen für FoxO-Proteine essentiell für die durch 3-MC induzierte Aktivitätssenkung des Selenoprotein P Promotors sind.

In Abbildung 3.30A sind die verwendeten mutierten SeP-luc Konstrukte schematisch dargestellt. In der Mutante SeP-Mut1-luc ist innerhalb des DBE1 die Base an Position -349 von einem G zu einem C mutiert. Umgekehrt ist in SeP-Mut2-luc das C in Position -110 gegen ein G ausgetauscht. Die Doppelmutante (SeP-Mut1/2-luc) weist beide Mutationen in den DBE auf. Bei der Deletionsmutante (SeP- Δ 234-luc) ist ein größerer Teil des Promotors inklusive des DBE1 entfernt.

Der Promotor des Selenoprotein P-Gens beinhaltet nicht nur Bindestellen für FoxO-Proteine, sondern auch zahlreiche Bindestellen für andere Regulatoren der Transkription. Als für die Expression von Selenoprotein P wichtiger regulatorischer Faktor wurde kürzlich der hepatische nukleäre Faktor HNF-4 α identifiziert (Speckmann et al., 2008). Die Bindestelle für HNF-4 α (HBE1) liegt innerhalb des Selenoprotein P Promotors zwischen den beiden DBE. Punktmutationen in HBE1 führten zu einer verringerten SeP-Promotoraktivität (Speckmann et al., 2008).

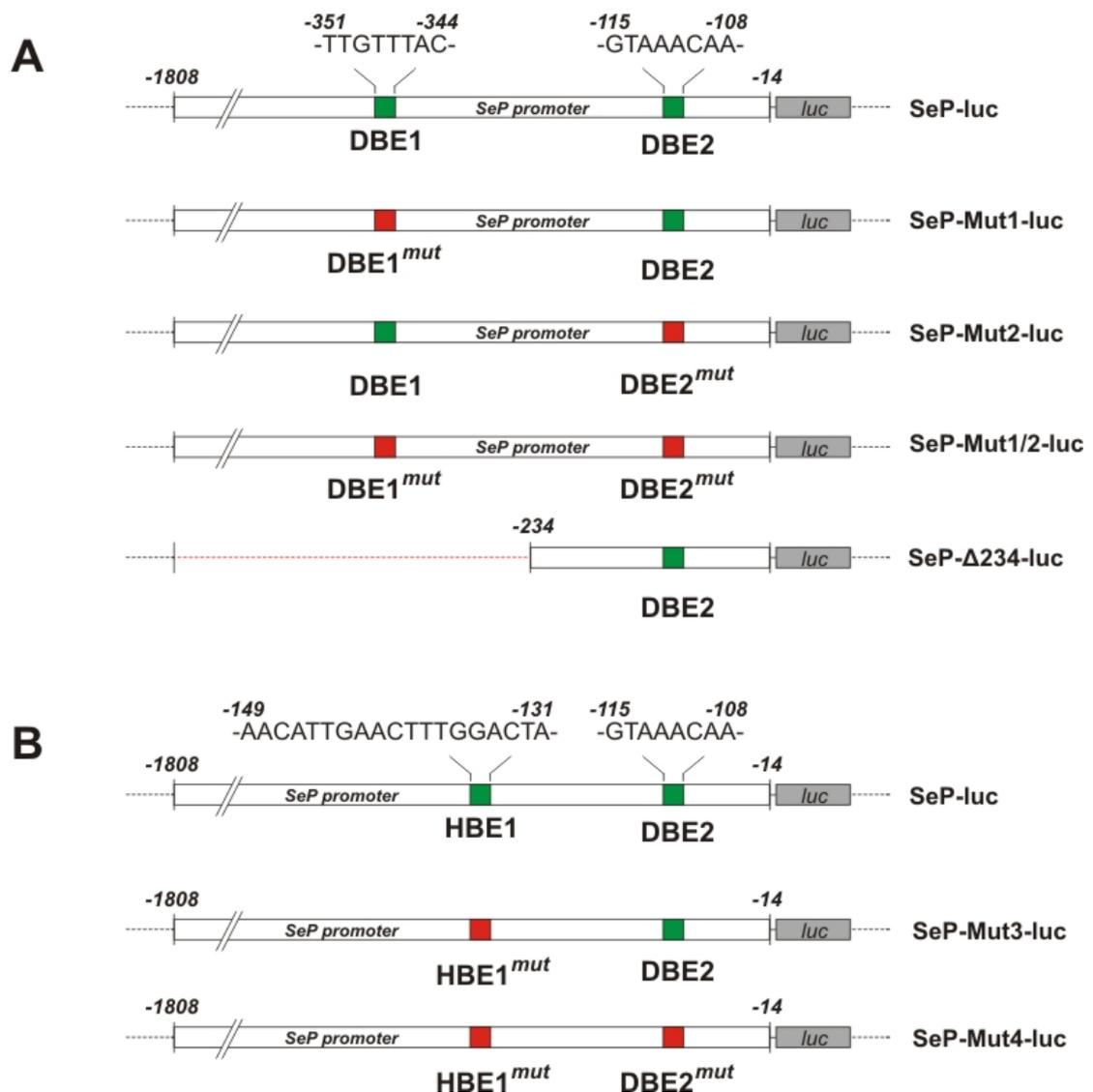


Abb. 3.30: Schematische Darstellung der Selenoprotein P-Promotorkonstrukte mit mutierten Bindestellen für FoxO-Proteine und HNF-4 α

Der Selenoprotein P Promoter enthält zwei Bindestellen für FoxO-Transkriptionsfaktoren (DBE1 und 2, A) sowie ein Bindeelement für HNF-4 α (B). Diese Bindeelemente sind in den mutierten Konstrukten durch Basenaustausch und Deletion verändert bzw. entfernt worden.

Die Reportergenkonstrukte mit der mutierten HBE1 sind in Abbildung 3.30B schematisch dargestellt. Das HNF-4 α -Bindeelement bildet folgende Basenfolge: (-149)-AACATTGAACTTTGGACTA-(-131). In SeP-Mut3-luc sind einige Basen dieser Sequenz wie folgt verändert: -AACATGTAAAGTGTGAATA- (Speckmann et al., 2008). Die Doppelmutante SeP-Mut4-luc weist die beschriebenen Mutationen in dem HBE1 und im DBE2 auf.

HNF-4 α wird in Leberzellen exprimiert. Die bisher dargestellten Untersuchungen zu einem Einfluss von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und FICZ auf FoxO-Transkriptionsfaktoren wurden in humanen Hepatomzellen durchgeführt. Interessanterweise wurde in Keratinocyten keine Aktivitätserhöhung des FHRE-luc-Konstruktes nach Behandlung mit 3-MC beobachtet (Abb. 3.31).

Dazu wurden HaCaT-Zellen mit dem FHRE-luc-Konstrukt transfiziert und 24 h später für eine Dauer von 18 Stunden mit 3-MC und FICZ behandelt. Es zeigte sich, dass der durch 3-MC induzierte Effekt auf das FHRE-Promotorkonstrukt scheinbar eine Zell-Spezifität aufwies. In Hepatomzellen reagierte das Konstrukt mit einer Aktivitätssteigerung durch die 3-MC-Behandlung. In Keratinocyten wurde eine Senkung der Promotoraktivität beobachtet. Die Behandlung mit FICZ erhöhte die Aktivität des FHRE-luc-Konstruktes in HaCaT Zellen. Auch in Leberzellen war diese erhöht (Kap. 3.2.1).

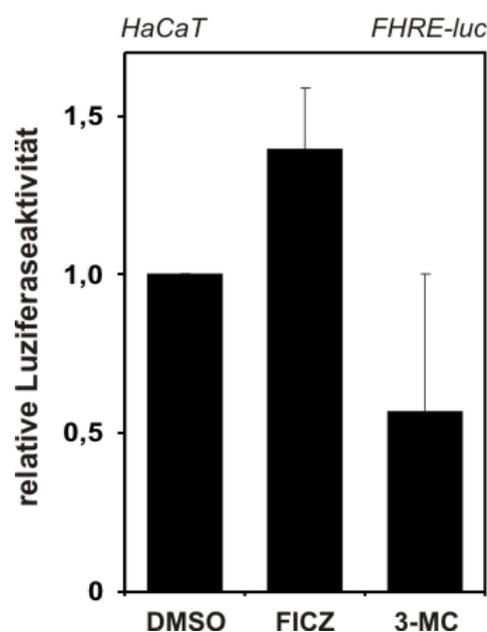


Abb. 3.31: Einfluss von FICZ und 3-MC auf die FoxO-spezifische Promotoraktivität in Keratinocyten

HaCaT Zellen wurden mit dem FHRE-luc Konstrukt transient transfiziert. 24 h später erfolgte die Behandlung mit FICZ (100 nM), 3-MC (10 μ M) oder DMSO (0,1%) für 18 h. Die relative

Luziferaseaktivität wurde aus den Lysaten bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

Bezüglich der Wirkung einer Behandlung von 3-MC auf mit dem FHRE-luc Konstrukt transfizierte Zellen wäre also ein Einfluss eines leberspezifischen Faktors wie HNF-4 α denkbar.

Dies wurde anhand der mutierten Selenoprotein P Luziferasekonstrukte analysiert. Dazu wurden HepG2 Zellen mit einem der SeP-Mut-luc Konstrukte und entweder einem Kontrollplasmid oder dem FoxO1a Überexpressionsplasmid transfiziert. 24 Stunden später erfolgte die Behandlung mit 3-MC (10 μ M) oder DMSO (0,1%) für 18 Stunden.

Das SeP-Mut1-luc-Konstrukt (Abb. 3.32A) reagierte auf eine Behandlung mit 3-MC sowohl unter basalen FoxO1a-Proteinspiegeln als auch nach FoxO1a-Überexpression mit einer Senkung der Promotoraktivität, wenngleich in geringerem Maße als SeP-luc (vgl. Abb. 3.14, 3.15). Die Mutation der DBE1 führte demnach nicht zu einer Aufhebung des durch 3-MC induzierten Effektes im Vergleich zum SeP-luc mit intakten DBE. Zudem erhöhte die Überexpression von FoxO1a die Aktivität dieses Konstruktes trotz Mutation einer FoxO-Bindestelle um mehr als das Doppelte. Diese Steigerung der Aktivität bei erhöhten FoxO1a-Spiegeln wurde bei Mutation des DBE2 nicht mehr beobachtet (Abb. 3.32B). Dass dem zweiten FoxO-Bindeelement eine größere Rolle in der Kontrolle des Selenoprotein P Promotors zukommt als dem DBE1, wurde bereits beschrieben (Walter et al., 2008). Unter basalen FoxO-Expressionsspiegeln hatte eine Stimulation mit 3-MC auch für das SeP-Mut2-luc eine Aktivitätsverringering zur Folge. Eine Mutation innerhalb des DBE2 resultiert ebenfalls nicht eindeutig in einer Änderung des durch mit 3-MC hervorgerufenen Effektes im Vergleich zum unmutierten SeP-luc. Erst bei Verwendung der Doppelmutante SeP-Mut1/2-luc (Abb. 3.32C) konnte weder unter Kontrollbedingungen noch unter vermehrter Expression von FoxO1a eine Veränderung der Promotoraktivität durch 3-MC nachgewiesen werden. Hier war in beiden Fällen keine Erniedrigung der Promotoraktivität zu beobachten. Die Stimulation mit 3-MC führte bei dem Deletionskonstrukt SeP- Δ 234-luc (Abb. 3.32D) ähnlich dem Konstrukt, bei dem DBE1 punktuell mutiert ist, ebenfalls zu einer Abnahme in der Aktivität des Promotors.

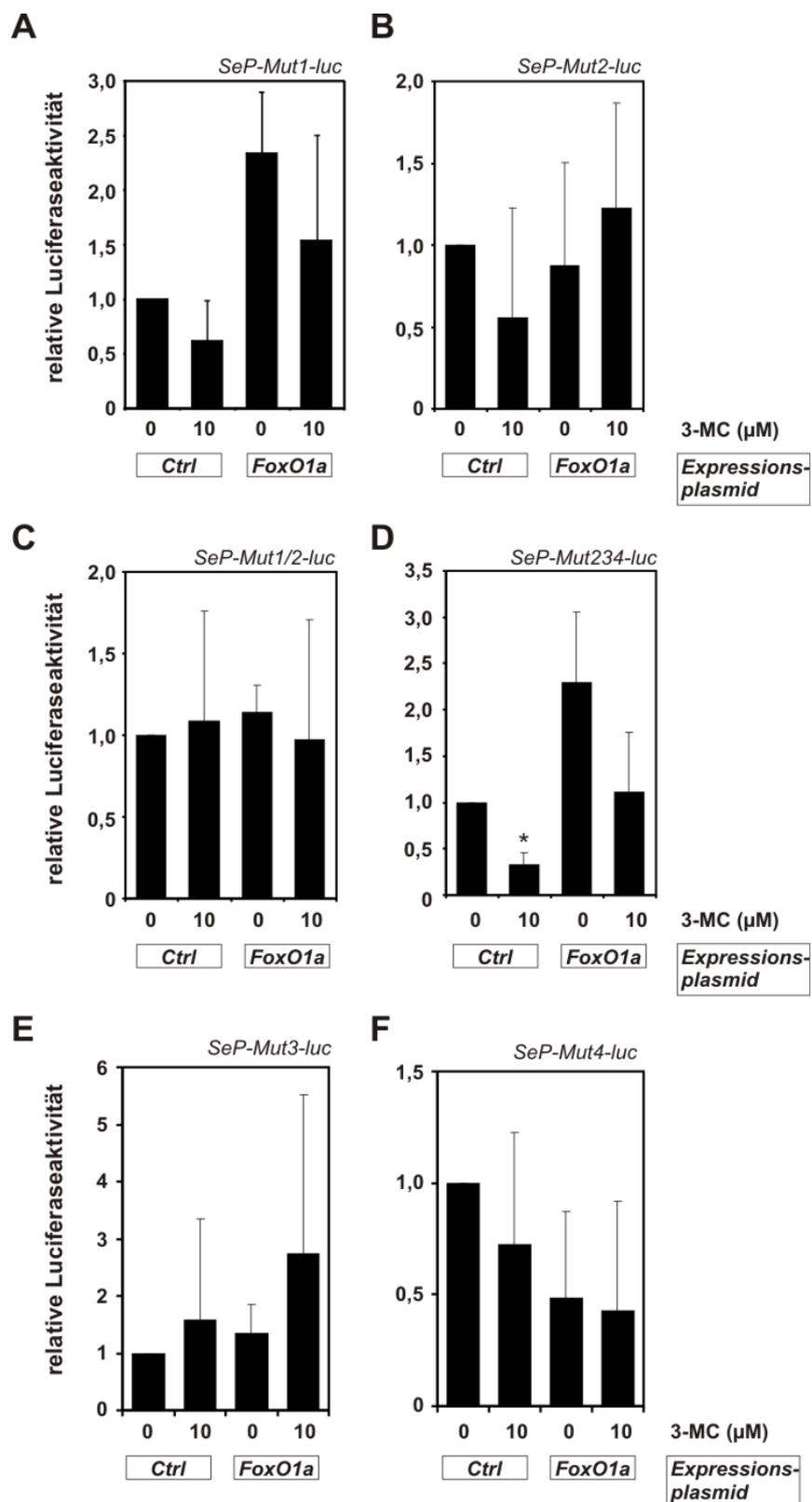


Abb. 3.32: Die durch 3-MC induzierte Aktivitätsverminderung des Selenoprotein P-Promotors wird durch Mutation der FoxO-Bindeelemente aufgehoben

HepG2-Zellen wurden mit einem von sechs SeP-luc Konstrukten, bei denen DNA-Bindestellen für FoxO-Proteine und/oder HNF-4 α mutiert waren, transfiziert. Gleichzeitig wurde entweder ein Kontrollplasmid (Ctrl) oder ein FoxO1a-Überexpressionsplasmid cotransfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit 10 μ M 3-MC oder DMSO (0,1%) für 18 h behandelt. Die Luziferaseaktivi-

tät wurde aus den Lysaten ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen t-Tests errechnet ($*P < 0,05$).

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass FoxO-Transkriptionsfaktoren an dem durch 3-MC induzierten Effekt beteiligt sind. Die durch 3-MC-Behandlung hervorgerufene Senkung der Promotoraktivität des SeP-luc konnte erst durch eine Mutation beider FoxO-Bindeelemente aufgehoben werden.

Die Aktivität des Promotorkonstruktes SeP-Mut3-luc (Abb. 3.32E), das Mutationen innerhalb der Bindestelle für den leberspezifischen Faktor HNF-4 α beinhaltet, wurde durch die Behandlung mit 3-MC kaum verändert. Auch hier schien die Verringerung der Promotoraktivität, die für das SeP-luc durch 3-MC induziert wurde, aufgehoben zu sein. Bei Betrachtung der Einzelwerte der Analysen sei jedoch erwähnt, dass die Veränderungen der Aktivität bzgl. dieses Konstruktes Schwankungen unterlagen. Es ergaben sich sowohl Aktivitätsverringernungen als auch -steigerungen. Daher konnte nicht geklärt werden, ob die alleinige Mutation der HNF-4 α -Bindestelle im Promotor des SeP-Gens eindeutig zu einer Aufhebung des durch 3-MC induzierten Effektes führt. Obwohl beide FoxO-Bindeelemente in diesem Konstrukt unverändert sind, kam es kaum zu einer Promotoraktivitätserhöhung bei Überexpression von FoxO1a. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Experimente aus den Aktivitätsuntersuchungen des SeP-Mut4-luc (Abb. 3.32F), bei dem zusätzlich zur HBE die DBE1 verändert ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich der durch die Behandlung mit 3-MC induzierte Effekt auf die Aktivitätsmodulation des SeP-luc Promotorkonstruktes durch eine Mutation der beiden FoxO-Bindestellen aufheben ließ. Eine Mutation innerhalb der Bindestelle für HNF-4 α führte zu keinem eindeutigen Ergebnis, jedoch konnte die Beteiligung von HNF-4 α an dem durch 3-MC induzierten Effekt bzgl. des Selenoprotein P-Promotors nicht ausgeschlossen werden.

3.3 Modulation der FoxO-Expression in HepG2-Zellen

Zur Expression der FoxO-Transkriptionsfaktoren selbst ist bisher relativ wenig bekannt. Für einige Wachstumsfaktoren wie PDGF (Platelet-derived growth factor) und FGF

(fibroblast growth factor) wurde eine reprimierende Funktion bzgl. der Expression der FoxO-Proteine beschrieben (Essaghir et al., 2009).

Die mRNA-Spiegel der drei FoxO-Isoformen FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 wurden nach Stimulation von HepG2-Zellen mit 3-MC, FICZ und Insulin nach 8 und 18 Stunden analysiert. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden vor der Behandlung in serumfreiem Medium kultiviert. Nach der Behandlung erfolgte die Isolation der RNA, Umschreibung in cDNA und die Durchführung einer quantitativen Echtzeit-PCR.

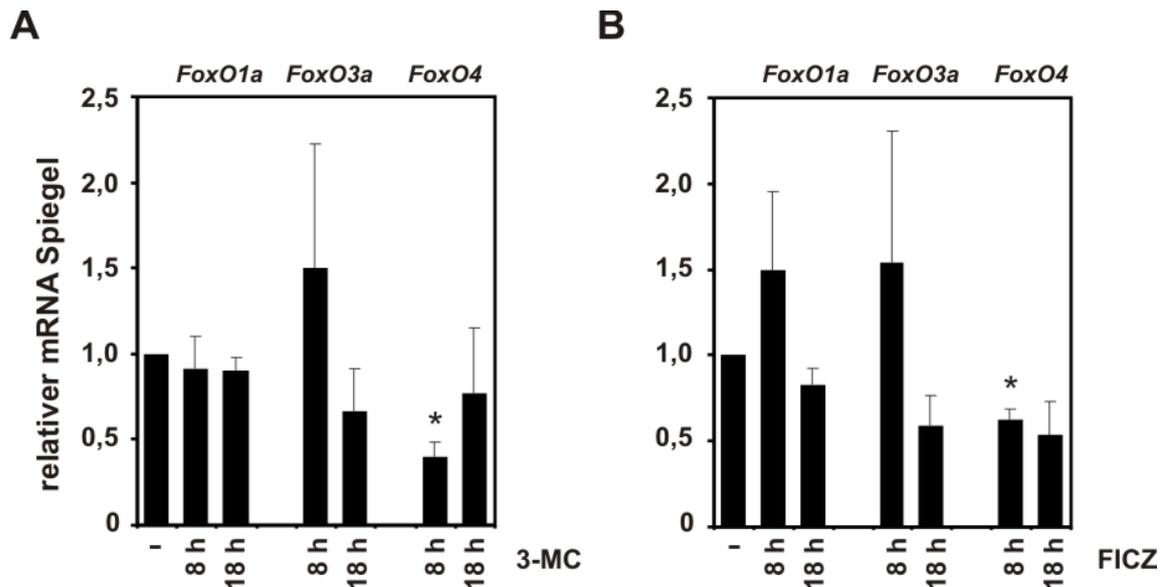


Abb. 3.33: FoxO mRNA-Spiegel nach Belastung von Zellen mit 3-MC und FICZ

HepG2-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 70% herangezogen und danach für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Behandlung mit 3-MC (10 μ M), FICZ (100 nM) oder DMSO (0,1%) erfolgte für 8 oder 18 h. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und diese in eine quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt. Die Transkripte wurden auf β -Actin-Transkripte normiert und die Kontrollbehandlung wurde gleich eins gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen T-Tests errechnet (* $P < 0,05$).

Sowohl eine Behandlung mit 3-MC (Abb. 3.33A) als auch mit FICZ (Abb. 3.33B) hatte keine Änderung des mRNA-Spiegels von FoxO1a zur Folge. Der mRNA-Gehalt von FoxO3a schien nach 8 Stunden zunächst anzusteigen und nach 18 Stunden Behandlung zu sinken. Eine signifikante Erniedrigung der mRNA wurde nur bei einer der drei FoxO-Isoformen, dem FoxO4, beobachtet.

Die Aktivität der FoxO-Proteine wird über den PI3K/Akt Signalweg nach Stimulation von Zellen mit Insulin negativ reguliert. Abb. 3.34 zeigt, dass auch Veränderungen in der FoxO-Expression als Folge einer Insulinbehandlung auftreten.

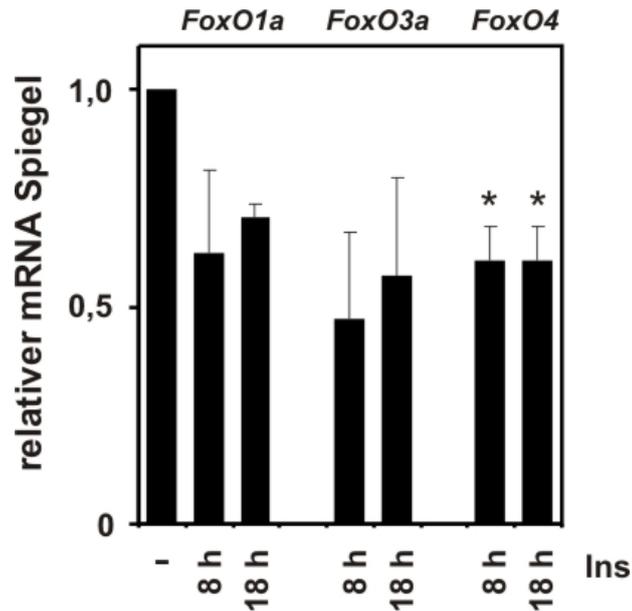


Abb. 3.34: Der relative mRNA-Gehalt aller drei FoxO-Isoformen wird durch Insulinbehandlung verringert

HepG2 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 70% herangezogen und danach für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Behandlung mit Insulin (Ins) erfolgte für 8 oder 18 h. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und diese in eine quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt. Die Transkripte wurden auf β -Actin-Transkripte normiert und die Kontrolle gleich eingesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen t-Tests errechnet ($*P < 0,05$).

Die Behandlung der Zellen mit Insulin hatte für alle drei FoxO-Isoformen eine Abnahme des mRNA-Gehaltes zur Folge. Durchschnittlich wurde die Expression um 30-50% verringert.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von Nickelionen auf FoxO-Transkriptionsfaktoren

Die Gruppe der FoxO-Transkriptionsfaktoren wird durch Kupfer- und Zinkionen negativ reguliert (Walter et al., 2006). Durch Behandlung von HepG2-Zellen mit Cu^{2+} wurde PI3K-abhängig eine Phosphorylierung der FoxO-Proteine durch Akt beschrieben. Dies hatte eine rasche Translokation von FoxO1a-GFP Fusionsproteinen aus dem Zellkern ins Cytoplasma zur Folge.

Aus Vorarbeiten war bekannt, dass Nickelionen eine signifikante Phosphorylierung von Akt induzieren. Eine Exklusion von FoxO1a-GFP aus dem Zellkern konnte hingegen nicht beobachtet werden (Eckers, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit Nickelionen unter den gewählten Versuchsbedingungen zu zellulärem Stress führt. Zudem sollte untersucht werden, ob trotz der Induktion einer Akt-Phosphorylierung durch Ni^{2+} keine Phosphorylierung und Inaktivierung der FoxO-Faktoren auftritt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von HepG2 Zellen mit Nickelionen bis zu Konzentrationen von 1 mM kaum zu einer Abnahme der darauffolgenden Bildung von Kolonien führte. Der Unterschied zu einer Behandlung mit Cu^{2+} war sehr deutlich zu sehen. HepG2 Zellen bildeten nach einer vorangegangenen Cu^{2+} - Behandlung sehr viel weniger Kolonien aus. Dass die Zellviabilität durch Belastung mit Cu^{2+} stark beeinträchtigt wurde, durch Ni^{2+} jedoch nicht, wurde ebenfalls durch die Untersuchung der Neutralrot-Inkorporation der Zellen gezeigt. Die Fähigkeit der Zellen, den Farbstoff Neutralrot aufzunehmen zu können, wurde durch eine Behandlung mit Nickelionen nicht gesenkt.

Die toxische Wirkung von Nickel auf Zellen und Organismen scheint stark von den gewählten Rahmenbedingungen abzuhängen. Unterschiede sind durch die Wahl des Zellsystems (z. B. immortalisierte Zellen vs. Primärzellen), der Nickelkonzentration, der Expositionsdauer sowie der Beschaffenheit der Nickelkomponente selbst zu erklären. Es wurde beispielsweise beschrieben, dass NiCl_2 oxidative Schäden der DNA hervorruft, jedoch erst in cytotoxischen Konzentrationen (Dally und Hartwig, 1997). Eine andere Studie berichtete von durch basisches Nickelcarbonat verursachten DNA-Schäden unter Beteiligung von ROS bereits im mikromolaren Bereich (M'Bemba-Meka et al., 2007).

Glutathion (GSH, γ -Glutamylcysteinylglycin) kommt in eukaryotischen Zellen in millimolaren Konzentrationen vor. Änderungen des Verhältnisses von GSH zu GSSG (Glutathiondisulfid) spiegeln das Redox-Gleichgewicht innerhalb von Zellen wider (Schafer und Buettner, 2001).

Wie in Abschnitt 3.1 gezeigt wurde, konnten keine erhöhten Spiegel des Glutathiondisulfids nach Exposition von HepG2 Zellen mit Ni^{2+} beobachtet werden. Eine Induktion von oxidativem Stress scheint demnach nach einer Behandlungsdauer von 60 Minuten in HBSS durch Nickelionen nicht stattzufinden. Dies steht im Gegensatz zu einer Behandlung mit Kupferionen. Hier verursachten bereits geringe Konzentrationen eine Erhöhung des GSSG-Spiegels in HepG2 Zellen.

Die Depletion von Glutathion und die Aktivitätsverminderung von antioxidativ wirkenden Enzymen bei Exposition mit Nickelkomponenten wurden als Wirkmechanismen bzgl. toxikologischer Effekte diskutiert (Das et al., 2008). Dies steht aus den bereits zuvor erwähnten Gründen nicht zwingend mit den hier vorliegenden Ergebnissen im Widerspruch. Viele Studien zur Wirkweise von Nickelkomponenten gehen auf Untersuchungen an Tiermodellen zurück, bei denen die chronische und langfristige Exposition mit Nickelionen analysiert wird. Selbst im Rahmen von Untersuchungen, die sich auf die Zellkultur beschränken, kommt es zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. 10 μM Kupferionen, verdünnt in HBSS, induzierten eine Phosphorylierung von Akt. Wurden die gleichen Zellen mit in DMEM verdünnten Kupferionen behandelt, trat eine Phosphorylierung erst bei Verwendung von 500 μM Cu^{2+} auf (Walter, 2006). Der Grund dafür ist vermutlich eine Komplexbildung der Kupferionen durch in DMEM enthaltene Aminosäuren. Ein weiteres Beispiel für die Relevanz der Bedingungen bzgl. einer Modulation von zellulären Prozessen durch Schwermetallionen wurde durch den Vergleich zweier Zelllinien deutlich. Die Phosphorylierung von Akt durch Nickelionen konnte lediglich in HepG2-Zellen beobachtet werden. Unter identischen Versuchsbedingungen wurde Akt in HeLa-Zellen jedoch nicht aktiviert (Eckers, 2006).

Es lässt sich also feststellen, dass die Bedingungen für die vorliegenden Experimente nicht zu einer Verringerung der Zellviabilität oder einer Erhöhung des GSSG-Gehaltes in HepG2 Zellen führten. Die einstündige Exposition mit Nickelionen schien keine Bildung von ROS zu induzieren. ROS können demnach als Ursache für die Nickel-induzierte Akt-Phosphorylierung ausgeschlossen werden. Dies konnte im Übrigen bereits auch für die Cu^{2+} -induzierte Akt-Aktivierung beschrieben werden (Ostrakhovitch et al., 2002).

Obwohl die Stimulation mit Kupferionen mit der Bildung von ROS einhergeht, ging die Phosphorylierung von Akt der Bildung von ROS zeitlich voran.

Eine Delokalisation der FoxO-Proteine nach Stimulation der Zellen mit Nickelionen wurde nicht hervorgerufen. Als direkte Akt-Substrate schienen die FoxO-Faktoren trotz einer Phosphorylierung von Akt demnach nicht inaktiviert zu werden. Die Nickel induzierte Phosphorylierung eines weiteren Akt-Substrates, der Glycogensynthasekinase-3 (GSK-3), wurde jedoch beschrieben (Eckers, 2006).

Der Einfluss von Nickelionen auf FoxO-Proteine sollte im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden. Dazu wurde zum einen der Phosphorylierungszustand der FoxO-Proteine und zum anderen deren Fähigkeit zur DNA-Bindung nach Stimulation der Zellen mit Nickelionen untersucht. Es zeigte sich, dass die Stimulation der Zellen mit Insulin und Kupferionen eine Verringerung der Bindung von FoxO1a an die DNA-Sequenz zur Folge hatte. Die Behandlung mit Nickelionen induzierte in dieser Hinsicht keine Veränderung. Die FoxO-Isoformen 1 und 3 wurden in Folge einer Behandlung mit Insulin und Cu^{2+} phosphoryliert. Nach Exposition der Zellen mit Ni^{2+} ließ sich nur eine sehr schwache Phosphorylierung detektieren.

Diese Ergebnisse machen erneut den Unterschied bzgl. der Wirkung der Metallionen auf den Akt/FoxO-Signalweg deutlich. Die Stärke der durch die Metallionen hervorgerufenen Akt-Phosphorylierung korreliert unter Umständen mit einer nachfolgenden Phosphorylierung von Akt-Substraten. Kupferionen induzierten eine weitaus stärkere Akt-Phosphorylierung als Nickelionen, und das bereits unter Verwendung von geringeren Konzentrationen (Eckers, 2006). Selbst die zehnfach höhere Ni^{2+} -Konzentration induzierte im Vergleich nur eine um einiges schwächere Aktivierung von Akt. Dies führt zu der Vermutung, dass es einen Schwellenwert zur Phosphorylierung der Akt-Substrate gibt. Wie erwähnt, reichte die Ni^{2+} -induzierte Akt-Phosphorylierung zur Deaktivierung von GSK-3 aus. Für die FoxO-Proteine scheint dies nicht eindeutig der Fall zu sein. Zwar ist eine sehr schwache Phosphorylierung im Western Blot zu beobachten, jedoch wird weder die Lokalisation noch die Fähigkeit zur Bindung an die DNA verändert.

Als Mechanismus für die Aktivierung von Signalwegen durch Metallionen kann nicht nur die Beteiligung von ROS diskutiert werden. Auch die Interaktion mit Proteinen, besonders mit darin enthaltenen Thiolgruppen, kann eine Ursache für die Modulation von Signalwegen sein. Der PI3K/Akt-Signalweg wird an unterschiedlichen Punkten durch Phosphatasen kontrolliert (s. Einleitung). Der Proteingruppe der Proteintyrosinphosphata-

sen ist ein Cysteinrest mit niedrigem pK-Wert im aktiven Zentrum gemein. Die Thiolgruppe stellt ein starkes Nucleophil dar und kann leicht oxidiert werden. Die Inhibierung der Phosphataseaktivität durch Redoxprozesse oder kovalente Blockierung des aktiven Zentrums führt als Konsequenz zu einer Phosphorylierung der kontrollierten Substrate. Schwermetallionen wie Kupfer oder Nickel können mit den Thiolgruppen von Phosphatasen reagieren und so indirekt zu einer Phosphorylierung von Proteinkinasen wie Akt führen. Tatsächlich wurde die Interaktion von Kupfer- und Zinkionen mit PTPasen beschrieben und die Induktion insulinmimetischer Effekte durch Metallionen dahingehend diskutiert (Barthel et al., 2007; Haase und Maret, 2005; Kim et al., 2000).

Abschließend konnte im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Akt durch die Behandlung von HepG2-Zellen mit Nickelionen unter subcytotoxischen Bedingungen stattfindet. Eine durch Ni^{2+} induzierte Erhöhung des GSSG-Gehaltes konnte nicht beobachtet werden, so dass ROS an der hervorgerufenen Akt-Phosphorylierung unbeteiligt sind. Im Vergleich dazu induzieren Kupferionen zwar eine stärkere Phosphorylierung von Akt, jedoch geht diese mit einer Verringerung der Zellviabilität und Erhöhung des Glutathiondisulfidgehaltes einher.

Weiterhin hatte die Behandlung der Zellen mit Nickelionen keinen Einfluss auf FoxO-Proteine. Die Ursache liegt möglicherweise in der Stärke der durch die Nickelbelastung hervorgerufenen Phosphorylierung der Kinase Akt.

4.2 Wirkung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und FICZ auf die FoxO-Signaltransduktion

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss einer anderen Substanzgruppe auf FoxO-Transkriptionsfaktoren untersucht.

Die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe B(a)P und 3-MC und das Carbazol FICZ sind Induktoren des AhR-Signalweges. Dabei gehören B(a)P und 3-MC zu den klassischen AhR-Agonisten, FICZ hingegen zu den nicht-klassischen. Der Gemeinsamkeit, z. B. die Expression von Cyp1a1 zu induzieren, stehen auch Unterschiede gegenüber. FICZ unterscheidet sich nicht nur strukturell von den beiden anderen Kohlenwasserstoffen. Seine Bildung aus Tryptophan wird durch UV-Strahlung initiiert. Dies geschieht nicht nur in vitro, sondern auch in dermalen Keratinocyten (Fritsche et al., 2007). Ob FICZ nach seiner Bildung in vivo vom Hautgewebe in die Leber transportiert

wird, ist nach bisheriger Kenntnis noch Spekulation. Jedoch wurde kürzlich der Nachweis von FICZ-Metaboliten in menschlichem Urin beschrieben (Wincent et al., 2009). Untersuchungen dahingehend, ob FICZ als intrazellulär gebildetes Molekül außer dem Ah-Rezeptor noch andere Transkriptionsfaktoren beeinflusst, sind von hohem Interesse. Die Aufnahme von Benzo(a)pyren kann vom Organismus über die Atemwege oder über den Gastrointestinaltrakt aus Nahrungsmitteln erfolgen. Die Metabolisierung erfolgt in der Leber. 3-MC besitzt hingegen keine für den Menschen physiologische Relevanz. Es stellt eine Modellsubstanz für einen AhR-Agonisten dar und wird in Tiermodellen aufgrund seiner hohen Kanzerogenität zur experimentellen Erzeugung von Tumoren eingesetzt.

Durch die Inkubation von humanen Hepatomzellen mit den Substanzen 3-MC, B(a)P und FICZ wurde eine Steigerung der Aktivität eines ausschließlich FoxO-responsiven Promotorkonstruktes induziert (Kap. 3.2.1). Eine Erhöhung der FoxO-kontrollierten Expression von Zielgenen hätte z. B. eine vermehrte Bildung von Selenoprotein P, Mangansuperoxiddismutase und Glucose 6-Phosphatase zur Folge. Dies würde zu einer Verstärkung der Abwehr gegen oxidativen Stress und zu einer Erhöhung des Glucose-spiegels führen. Die Wirkung durch PAK und FICZ wäre also der durch Insulin induzierten entgegengesetzt.

Die Betrachtung der Promotoren des Selenoprotein P- und des Mangansuperoxiddismutase-Gens (Kap. 3.2 und 3.4) resultierte in einem überraschenden Ergebnis. Sowohl die Promotoraktivität des SeP- als auch die des MnSOD-Reporterkonstruktes wurde durch eine Behandlung mit 3-MC gesenkt. Dabei wurden keine Veränderungen der Promotoraktivität des SeP-luc nach Inkubation der Zellen mit FICZ beobachtet. Durch Behandlung mit B(a)P reagierte das Konstrukt jedoch analog. Auf der Ebene der mRNA Expressionspiegel konnten diese Ergebnisse für Selenoprotein P nach Echtzeit-PCR-Analysen bestätigt werden. Die mRNA-Expression von Selenoprotein P wurde durch eine Exposition der Zellen mit 3-MC vermindert. Selenoprotein P wird von der Leber sekretiert und in extrahepatische Gewebe transportiert, in denen es als Selenquelle für andere Selenenzyme dienen kann. Gezeigt werden konnte dies am Beispiel der cytosolischen Glutathio-peroxidase (Steinbrenner et al., 2006). Als Konsequenz einer Exposition mit 3-MC oder B(a)P wäre eine verringerte Sekretion von Selenoprotein P aus der Leber möglich. Dieser

Umstand könnte zu einer Verminderung des Schutzes gegen oxidativen Stress in extrahepatischen Geweben als Antwort auf die Belastung mit PAK in der Leber führen.

FoxO-Transkriptionsfaktoren werden über den Insulinsignalweg negativ reguliert. Die Glucose 6-Phosphatase (G6Pase) katalysiert die Hydrolyse von Glucose 6-Phosphat zu Glucose und bildet so einen essentiellen Teilschritt der Gluconeogenese. Die Expression der G6Pase steht ebenfalls unter der Regulation von FoxO-Proteinen. Die durchgeführten Reporteranalysen zur Modulation der G6Pase-Promotoraktivität nach Behandlung der Zellen mit 3-MC und FICZ hatten eine Stimulation des Promotors zum Ergebnis. Somit ähnelte die Aktivitätsveränderung dieses Promotors, ausgelöst durch die Behandlung mit 3-MC und FICZ, dem des FoxO-responsiven Promotorkonstruktes FHRE-luc. Die Gluconeogenese würde demnach zumindest bzgl. dieses Teilschrittes durch 3-MC und FICZ gesteigert.

Für eine Exposition mit einem anderen AhR-Agonisten, dem TCDD, wurde eine Modulation von Enzymen, die in den Glucosemetabolismus involviert sind, beschrieben. In hepatischen Geweben, die aus mit TCDD behandelten Mäusen isoliert wurden, wurde eine Verringerung der Glucokinase-mRNA beschrieben (Boverhof et al., 2005). Die Glucokinase katalysiert in der Leber die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose 6-Phosphat. Eine Expressionsverminderung hat demnach einen erhöhten Glucosespiegel zur Folge. Die Stimulierung der G6Pase-Expression durch 3-MC und FICZ hat dementsprechend die gleiche Konsequenz wie die durch Microarraydaten erhaltenen Ergebnisse der Studie mit TCDD-behandelten Mäusen.

Scheinbar unterliegt die Wirkung von TCDD auf den Glucosemetabolismus jedoch keiner Systematik, da eine Verminderung der Expression und der Aktivität der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) nach Gabe von TCDD ebenfalls in einigen Studien beschrieben wurde (Boverhof et al., 2005; Viluksela et al., 1995). Die Expression der PEPCK wurde als FoxO-reguliert beschrieben (Schmoll et al., 2000). Ob die Veränderungen bzgl. der PEPCK durch TCDD-Behandlung FoxO-kontrolliert auftraten, wurde nicht untersucht.

Allerdings wurde für die Repression der PEPCK-Expression nach Behandlung mit AICAR, dem Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid, eine von dem Insulinsignalweg unabhängige Signaltransduktion diskutiert (Lochhead et al., 2000).

Die Ergebnisse der erwähnten Studien sowie dieser Arbeit lassen vermuten, dass

- (i) der Glucosemetabolismus nicht systematisch von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen oder deren Derivaten moduliert wird,
- (ii) die Repression oder Induktion eines FoxO-regulierten Zielgens trotz einer unter Umständen insulinmimetischen Wirkung unabhängig vom PI3K/Akt-Signalweg auftreten kann und
- (iii) die Variation in der Antwort FoxO-regulierter Zielgene auf PAK und FICZ auf das Vorhandensein von Bindestellen für Co-Regulatoren innerhalb des Promotors zurückzuführen ist.

Obwohl alle in dieser Arbeit untersuchten Promotoren unter der Kontrolle von FoxO-Transkriptionsfaktoren stehen, waren die Reaktionen auf eine Behandlung mit PAK oder FICZ unterschiedlich. Die Gene, die für Proteine codieren, die primär oder sekundär eine Rolle in der Abwehr gegen oxidativen Stress spielen, wurden durch die Behandlung mit PAK oder FICZ in ihrer Expression reprimiert. Der Promotor des G6Pase-Gens wurde durch die Behandlung in seiner Aktivität jedoch stimuliert.

Wäre die generelle Aktivierung des Insulinsignalweges oder auch einer anderen Signalkaskade, die die Aktivität der FoxO-Proteine moduliert, Grund für den Einfluss der PAK und FICZ, müsste dies in einer Aktivitätsänderung der Promotoren resultieren, die jeweils in die gleiche Richtung geht. Ein ausschließlich insulinmimetischer Effekt, ausgelöst durch PAK oder FICZ, kann demnach so gut wie ausgeschlossen werden. Die Promotoren der FHRE- und G6Pase-luc-Konstrukte hätten in diesem Fall mit einer Aktivitätsverringerng reagieren müssen. Ebenso können Signalwege, die zu einer Steigerung der Aktivität zur transkriptionellen Regulation von FoxO-Proteinen führen, ebenfalls ausgeschlossen werden. Zwar ist die Phosphorylierung der FoxO-Faktoren durch JNK verbunden mit einer gesteigerten Expression von Zielgenen, die für Proteine codieren, die der Verringerung von oxidativem Stress entgegenwirken. Jedoch wurde in den vorliegenden Analysen genau für diese Proteine eine Verminderung der Promotoraktivität nach Behandlung mit 3-MC beobachtet.

Obwohl die Modulation eines ausschließlich FoxO-responsiven Promotorkonstruktes untersucht worden war, sollte geklärt werden, ob FoxO-Transkriptionsfaktoren für den durch PAK oder FICZ induzierten Effekt verantwortlich sind. Ebenfalls könnte die unterschiedliche Reaktion der Zielgenpromotoren durch das Vorliegen von Co-Regulatoren zu erklären sein.

Dies führte zu Analysen unter Verwendung von Reportergenkonstrukten des SeP-luc, die eine Mutation der FoxO-Bindestellen oder der Bindestelle für HNF-4 α aufwiesen.

Der durch die Behandlung mit 3-MC induzierte Effekt einer Aktivitätssenkung von SeP-luc konnte erst nach Verwendung des Promotorkonstruktes, bei dem beide FoxO-Bindestellen mutiert waren, aufgehoben werden. Dies zeigt, dass das Vorliegen beider FoxO-Bindestellen nötig ist, um den durch 3-MC induzierten Effekt zu erreichen. Durch Mutation der HNF-4 α -Bindestelle innerhalb des Promotors resultierte die Änderung der Promotoraktivität teils in einer Senkung und teils in einer Steigerung. Im Mittel ergibt sich, dass auch hier eine Aufhebung des durch 3-MC induzierten Effekts auftritt. Dieses Ergebnis ist jedoch nicht eindeutig, so dass dahingehend genauere Untersuchungen vorgenommen werden müssten. Für das verwendete Konstrukt ist anzumerken, dass die Erhöhung der Promotoraktivität nach Überexpression von FoxO1a unter basaler Behandlung mit DMSO vergleichsweise gering ausfiel. Das verwendete Konstrukt besitzt nach wie vor zwei intakte Bindestellen für FoxO-Proteine, so dass zumindest zu erwarten gewesen wäre, dass die Aktivität des Promotors um den gleichen Faktor erhöht wird wie für das wildtypische SeP-luc Promotorkonstrukt. Das deutet darauf hin, dass das Fehlen einer intakten HBE bereits zu Veränderungen der Promotorrespons unter basalen Bedingungen führt.

Augenscheinlich spielt für die Regulation der Expression von Zielgenen nicht nur die räumliche Nähe der FoxO- und HNF-Bindestellen zueinander eine Rolle. In primären Rattenhepatocyten wurde gezeigt, dass die vorhergehende Behandlung der Ratten mit Resveratrol zu einer Verringerung der Bindung von HNF4 an die eigene DNA-Bindestelle führte. Hingegen wurde die Rekrutierung von HNF4 zu der FoxO-Bindestelle verstärkt (Ganjam et al., 2009). Resveratrolbehandlung führte demnach zu einer Erhöhung der direkten Interaktion von HNF4 und FoxO1a.

Die Interaktion dieser beiden Transkriptionsfaktoren und die reprimierende Funktion von FoxO-Faktoren auf die Bindung von HNF4 an HNF4-Bindestellen der DNA wurde bereits 2003 beschrieben (Hirota et al., 2003).

Neben dem leberspezifischen Faktor wurden viele weitere Co-Regulatoren für die Proteine der FoxO-Familie beschrieben.

Eine Bindung von FoxO1a an PGC-1 α erfolgt am C-terminalen Bereich und umgekehrt bindet PGC-1 α an den N-terminalen Bereich von FoxO1a (Puigserver et al., 2003).

Die Anwesenheit beider Regulatoren wurde für manche Zielgene als essentiell beschrieben. So konnte für einige Zielgene gezeigt werden, dass PGC-1 α zur Expressionskontrolle nicht ausreicht, sondern auf das Vorhandensein von FoxO-Faktoren angewiesen ist und umgekehrt (Puigserver et al., 2003; Olmos et al., 2009).

Neben den erwähnten Co-Regulatoren für FoxO-Proteine wurden viele andere beschrieben und es kommen weitere hinzu. Die beschriebenen Möglichkeiten der Interaktion machen deutlich, dass die Expressionsregulation von Zielgenen auf unterschiedlichste Weise erfolgen kann. Dies hängt nicht immer nur in direkter Weise mit einem Stimulus selbst zusammen und scheint nicht auf einer grundsätzlichen Systematik zu beruhen.

Die direkte oder indirekte Interaktion der FoxO-Proteine mit Co-Regulatoren scheint für die zum Teil divergierenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die naheliegendste Erklärung zu sein.

Dabei ist festzustellen, dass

- (i) die Aktivität der Expressionskontrolle von FoxO-Transkriptionsfaktoren bzgl. FoxO-regulierter Zielgene von 3-MC, B(a)P sowie FICZ moduliert wurde,
- (ii) FoxO-Proteine für den induzierten Effekt verantwortlich sind, da bei Mutation der FoxO-Bindestellen im Promotor des Selenoprotein P-Gens der Effekt aufgehoben wurde,
- (iii) die unterschiedlichen Reaktionen der Zielgenpromotoren auf eine Behandlung mit PAK und FICZ am wahrscheinlichsten auf das Fehlen oder Vorhandensein von Bindestellen für Proteine, die als Co-Regulatoren wirken können, zurückzuführen sind und
- (iv) der durch PAK und FICZ induzierte Effekt unter Umständen auf das Vorhandensein eines leber-spezifischen Cofaktors zurückzuführen ist, da das FoxO-responsive Promotorkonstrukt FHRE-luc auf eine Behandlung mit 3-MC in Keratinocyten anders reagierte als in Hepatomzellen.

Die Behandlung von Leberzellen mit der „Modellsubstanz“ 3-Methylcholanthren, dem bei unvollständigen Verbrennungsprozessen entstehenden Benzo(a)pyren und dem aus Tryptophan entstehenden FICZ führt nach den dargestellten Ergebnissen zu einer Steigerung der Aktivität von FoxO-Proteinen bzgl. der Transkriptionskontrolle (Abb.4.1). Durch potentielle Co-Regulatoren wirkt sich das auf die Promotoraktivität von FoxO-regulierten Zielgenen unterschiedlich aus.

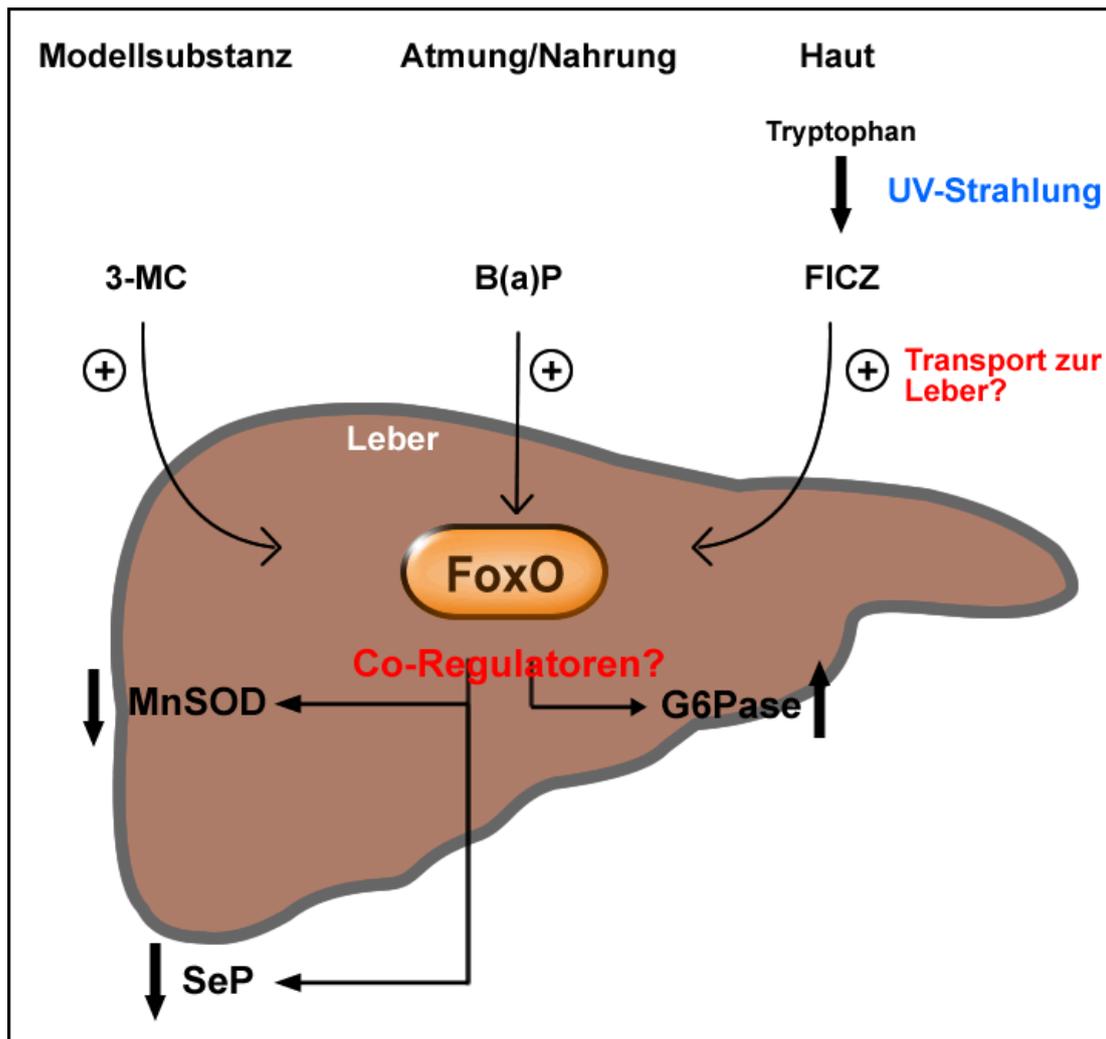


Abb. 4.1: Graphische Darstellung der im zweiten Teil dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse

FoxO-Transkriptionsfaktoren werden durch die Substanzen 3-MC, B(a)P und FICZ moduliert. Die Auswirkung der Behandlung mit PAK und FICZ auf die Expression FoxO-regulierter Zielgene lässt die Involvierung eines oder mehrerer Co-Regulatoren vermuten.

4.3 Modulation der relativen FoxO mRNA-Spiegel

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind die posttranslationalen Modifikationsmöglichkeiten von FoxO-Proteinen durch unterschiedliche Kinasen gut untersucht. Im Rahmen des dritten Teils dieser Arbeit wurden die relativen mRNA Spiegel der drei FoxO-Isoformen FoxO1a, 3a und 4 nach Stimulation von humanen Hepatomzellen mit 3-MC, FICZ und Insulin untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass besonders die FoxO4 mRNA-Spiegel vermindert wurden. Der Gehalt an FoxO4-mRNA sank um 40-60% gegenüber der Kontrollbehandlung.

In einigen Studien wurde bereits über Unterschiede der mRNA-Expression im Vergleich der FoxO-Isoformen untereinander berichtet. Kamei et al. beschrieben, dass die Expression von FoxO1 und 3 unter Hungerbedingungen bei Mäusen um das 7-8-fache erhöht ist. FoxO4 mRNA-Spiegel hingegen waren nur um das Doppelte induziert (Kamei et al., 2003). Auch dass nach Depletion von FoxO4 in Mäusen keine Veränderungen bezüglich der embryonalen Entwicklung auftraten, die Depletion der FoxO1 und 3 Isoformen jedoch zu Schäden führte, lässt vermuten, dass die physiologische Rolle von FoxO4 sich von der der beiden anderen Isoformen unterscheidet.

In den im Rahmen dieser Arbeit erstellten Expressionsanalysen wurde für den FoxO1a mRNA-Spiegel nach einer Behandlung mit 3-MC und FICZ keine Modulation beobachtet. Auch der Expressionsspiegel von FoxO3a zeigte keine eindeutige Veränderung. Eine Ähnlichkeit in der Expressionsregulation von FoxO1a und 3a kann also ebenfalls vermutet werden.

Das Expressionsverhalten der FoxO-Faktoren nach Insulinstimulation unterscheidet sich diesbezüglich von der Stimulation mit 3-MC und FICZ, da die mRNA-Spiegel aller drei Isoformen gesenkt wurden. Eine Stimulation von Zellen mit Insulin scheint nicht nur dazu zu führen, dass die FoxO-Transkriptionsfaktoren über den PI3K/Akt Signalweg phosphoryliert und inaktiviert werden, sondern dass auf der Ebene der mRNA-Expression ebenfalls eine durch Insulin induzierbare Regulation vorliegt. Ob sich dies bei längerfristiger Behandlung mit Insulin auch auf der Ebene des Proteins bestätigen lässt, bleibt zu untersuchen.

Die Funktion der FoxO-Transkriptionsfaktoren und des Insulinsignalweges wurde in den letzten Jahren besonders in Hinblick auf Alterungsprozesse untersucht. Durch Analysen der Lebensspanne von *C. elegans*, die Mutationen an unterschiedlichen Stellen des Insulinsignalweges aufwiesen, wurde die Bedeutung in Bezug auf Alterungsprozesse deutlich. So zeigte sich bei Nematoden, die eine Mutation im Insulinrezeptor- oder PI3K-Ortholog DAF-2 bzw. AGE-1 Gen aufwiesen, mindestens eine Verdopplung der Lebensspanne (Kenyon et al., 1993; Morris et al., 1996). Analog konnte für Mäuse, bei denen der Insulinrezeptor im Fettgewebe durch Mutation nicht funktionsfähig war, ebenfalls eine Verlängerung der Lebenszeit von 18% beschrieben werden (Blüher et al., 2003). Wurde der Spiegel von FoxO3a in humanen dermalen Fibroblasten verringert, konnte eine Erhöhung der zellulären Seneszenz beobachtet werden. Als Seneszenzmarker wurden

unter anderem die Erhöhung der Zellverdopplungsrate und eine Erhöhung der p21/p53 Proteinexpression beschrieben (Kyoung et al., 2005). FoxO-Proteine scheinen dementsprechend auch in Säugern eine gewisse Rolle bei Alterungsprozessen zu spielen.

Bei einem Defekt des Insulinrezeptors werden FoxO-Proteine nicht mehr PI3K/Akt vermittelt phosphoryliert. Dies resultiert zunächst einmal in einer Erhöhung von aktiven FoxO-Faktoren. Ebenso kommt es bei verringerter Nahrungsaufnahme (kalorische Restriktion) zu verminderten Insulinspiegeln. Unter diesen Bedingungen konnte z. B. in Fruchtfliegen eine Erhöhung der Lebensspanne beobachtet werden (Clancy et al., 2002).

Ob dafür eine verminderte Inaktivierung von FoxO-Proteinen durch geringere Aktivierung des Insulinsignalweges verantwortlich ist, ist derzeit Diskussionsgegenstand.

Unter Hungerbedingungen kommt es also zu einer Erhöhung der FoxO mRNA-Spiegel (Kamei et al., 2003). Ebenso führt die Deaktivierung des Insulinsignalweges zu einer Erhöhung der Lebensspanne.

In den vorliegenden Expressionsanalysen wurde zwar nicht die Folge einer Insulindepletion auf die mRNA-Spiegel der FoxO-Transkriptionsfaktoren untersucht. Dennoch induzierte die Gegenwart von Insulin exakt den gegenteiligen Effekt wie eine Insulindepletion auf Basis der mRNA Spiegel der FoxO-Faktoren.

Eine Verminderung der FoxO-Expressionsspiegel und putativ des Proteinspiegels nach langfristiger Stimulation mit Insulin würde demnach nicht nur aufgrund posttranslationaler Modifikation zu einer Verringerung von aktiven FoxO-Proteinen führen. Inwiefern eine langfristige Insulinbehandlung im Umkehrschluss in einer Verkürzung der Lebensspanne resultiert, bleibt bisher Spekulation.

Es bleibt zu bemerken, dass sich die hier beschriebenen Analysen auf Kurzzeitbehandlungen von 8 oder 18 Stunden beziehen. Dass die Wahl des Zeitpunktes eine maßgebliche Rolle spielt, zeigen kontroverse Ergebnisse zur Untersuchung von FoxO-Expressionsmustern nach Stimulation mit AICAR. Erhöhte Spiegel der FoxO1a und 3a mRNA wurde in Muskelgeweben von mit AICAR behandelten Mäusen gefunden (Nystrom und Lang, 2008). In der gleichen Studie wurde nach Behandlung von C2C12 Muskelzellen mit AICAR und Metformin für 24 Stunden eine Verringerung der mRNA Spiegel beschrieben. Ähnliche Ergebnisse wurden in Leberzellen gezeigt, bei denen die Behandlung mit AICAR zu einer Verringerung des FoxO1a Proteinspiegels und zur Abnahme der Promotoraktivität der Glucose 6-Phosphatase führte (Barthel et al., 2002). Eine Erhöhung des FoxO3a mRNA-Spiegels wurde hingegen in C2C12 Muskelzellen

nach einer Behandlungsdauer von nur 6 Stunden beschrieben (Williamson et al., 2009). Diese Studien zeigen, dass die Expressionsprofile sich innerhalb eines Zeitfensters von 24 Stunden stark unterscheiden können. Für die für diese Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen wurden zwar zwei Zeitpunkte innerhalb dieses Zeitfensters gewählt. Jedoch lassen sich dadurch keine Erkenntnisse über die Auswirkung von chronischer Behandlung mit 3-MC, FICZ und auch Insulin auf die FoxO-Expressionsspiegel und die Folgen für den Organismus gewinnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Umweltfaktoren auf FoxO-Proteine für drei Ebenen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass trotz einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch subtoxische Nickelkonzentrationen eine posttranslationale Modulation der FoxO-Faktoren nicht auftritt.

Die Aktivität der FoxO-Proteine zur transkriptionellen Regulation von Zielgenen wurde auf Basis von Reporterstudien untersucht. Dass die Aktivität der FoxO-Faktoren in dieser Hinsicht moduliert wird, wurde durch Behandlung von Hepatomzellen mit 3-MC, B(a)P und FICZ erstmalig gezeigt. Es konnte am Beispiel des Selenoprotein P-Promotors gezeigt werden, dass zur Induktion des Effektes beide FoxO-Bindeelemente vorhanden sein müssen.

Ebenfalls wurde beschrieben, dass eine Modulation durch Behandlung mit den Substanzen 3-MC, FICZ und Insulin bereits auf der Ebene der mRNA-Expression der FoxO-Isoformen stattfindet.

5 Zusammenfassung

FoxO-Transkriptionsfaktoren regulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen durch die Kontrolle der Expression von Zielgenen. Durch die FoxO-gesteuerte Synthese von Proteinen wie der Mangansuperoxiddismutase (MnSOD) und des Selenoproteins P (SeP) unterstützen sie die endogene Abwehr gegen oxidativen Stress. FoxO-Proteine regulieren nicht nur die Bildung antioxidativ wirkender Proteine, sondern werden auch selbst auf posttranslationaler Ebene durch oxidativen Stress moduliert. Umweltfaktoren wie Schwermetalle und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) aktivieren Signalwege innerhalb der Zelle entweder durch direkte Interaktion mit Proteinen oder durch die Induktion der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Behandlung menschlicher Hepatomzellen mit subtoxischen und nichtoxidierenden Nickelkonzentrationen eine Aktivierung der FoxO phosphorylierenden Ser/Thr-Kinase Akt hervorruft, die Aktivität von FoxO-Proteinen jedoch unbeeinflusst bleibt. Im Gegensatz dazu ging die durch Kupfer induzierte Phosphorylierung von Akt sowie FoxO-Proteinen sowohl mit der FoxO-Inaktivierung als auch cytotoxischen Effekten und einer Erhöhung des Glutathion-disulfidspiegels einher.

Ebenso wurde beschrieben, dass xenobiotischer Stress, ausgelöst durch eine Behandlung von Hepatomzellen mit den PAK Benzo(a)pyren [B(a)P] und 3-Methylcholanthren (3-MC), und das Tryptophan Photoprodukt FICZ die transkriptionssteigernde Aktivität von FoxO-Faktoren und die Promotoraktivität der Glucose 6-Phosphatase erhöht. Im Gegensatz dazu wurden die Promotoraktivitäten der für SeP und MnSOD codierenden Gene durch die Behandlung mit 3-MC gesenkt. In Übereinstimmung mit den Reporteranalysen wurde die mRNA-Expression von Selenoprotein P durch eine Behandlung mit 3-MC verringert. Dass die Bindung von FoxO-Proteinen an beide FoxO-Bindestellen des SeP-Promotors für die durch 3-MC induzierte Verringerung der SeP-Promotoraktivität essenziell ist, wurde durch Punktmutationen innerhalb der Bindestellen gezeigt.

Neben der Aktivität wird auch die Expression der FoxO-Proteine durch PAH und FICZ moduliert, wie anhand der Verringerung der mRNA-Spiegel von FoxO4 nach Stimulation von Zellen mit 3-MC oder FICZ gezeigt werden konnte. Darin ähnelt die zelluläre Reaktion auf diese Xenobiotika der Antwort auf Insulin, das eine Verringerung der mRNA-Spiegel der FoxO-Isoformen 1a, 3a und 4 in Hepatomzellen induziert.

Summary

FoxO transcription factors are crucial modulators of various cellular processes, controlling the expression of target genes such as those coding for manganese superoxide dismutase (MnSOD) and selenoprotein P (SeP), thereby supporting defense against oxidative stress. Environmental stimuli such as heavy metal ions and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) modulate signaling pathways both by interaction with proteins or by inducing the generation of reactive oxygen species (ROS).

Exposure of hepatoma cells to nickel ions at subcytotoxic doses did not translate into modulation of FoxO activity despite an activation of the Ser/Thr-kinase Akt. The cellular response to nickel ions under these conditions is most likely independent of the formation of ROS, since there were no increased levels of glutathione disulfide detectable.

FoxO activity was then found to be modulated in response to exposure of cells to PAH or the tryptophan photoproduct FICZ. Both PAH and FICZ caused an increased activity of a FoxO-responsive promoter construct as well as of glucose 6-phosphatase promoter activity. In contrast, the activities of promoters of genes coding for MnSOD or SeP were decreased in response to exposure to the PAH 3-methylcholanthrene (3-MC). In line with the promoter effects, 3-MC also decreased steady-state levels of SeP mRNA. The response of the SeP promoter to 3-MC was abrogated by point mutations introduced at the two identified FoxO binding elements of the SeP promoter, implying that interaction of FoxO proteins with these sites is essential for the downregulation of promoter activity.

In addition to FoxO activity being modulated by xenobiotics, it was then demonstrated that FoxO expression was also modulated by exposure of cells to PAH or FICZ. FoxO4 mRNA levels were downregulated in hepatoma cells exposed to 3-MC or FICZ. Similarly, insulin treatment caused a downregulation of mRNA levels of FoxO 1a, 3a and 4 in hepatoma cells.

6 **Literaturverzeichnis**

Abdelmohsen K, Gerber PA, von Montfort C, Sies H, Klotz LO (2003) Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* **278**: 38360-38367

Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M (1997) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* **7**: 776-789

Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC (1998) Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics.* **47**: 187-199

Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* **113**:548-555

Andjelković M, Maira SM, Cron P, Parker PJ, Hemmings BA (1999) Domain swapping used to investigate the mechanism of protein kinase B regulation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and Ser473 kinase. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 5061-5072

Barthel A, Ostrakhovitch EA, Walter PL, Kampkötter A, Klotz LO (2007) Stimulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling by copper and zinc ions: mechanisms and consequences. *Arch. Biochem. Biophys.* **463**: 175-182

Barthel A, Schmoll D, Krüger KD, Roth RA, Joost HG (2002) Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase. *Endocrinology.* **143**:3183-3186

Beyersmann D, Hartwig A (2008) Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* **82**: 493-512

Biggs III WH, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 7421-7426

Blander G, Guarente L (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 417-35

Blüher M, Kahn BB, Kahn CR (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science.* **299**, 572-574

Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P (1997) Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control.* **8**: 444-472

Bogoyevitch MA, Kobe B (2006) Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 1061-1095

Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, Hammermann J, Henn T, Lampert F (1997) Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene.* **14**: 195-202

Boström CE, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, Rannug A, Törnqvist M, Victorin K, Westerholm R (2002) Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.* **110**: 451-488

Bouchard C, Marquardt J, Bras A, Medema RH, Eilers M (2004) Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J.* **23**: 2830-2840

Boverhof DR, Burgoon LD, Tashiro C, Chittim B, Harkema JR, Jump DB, Zacharewski TR (2005) Temporal and dose-dependent hepatic gene expression patterns in mice provide new insights into TCDD-Mediated hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **85**: 1048-1063

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. **303**: 2011-2015

Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J. Cell. Biol.* **156**: 817-828

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. **96**: 857-868

Burnell AM, Houthoofd K, O'Hanlon K, Vanfleteren JR (2005) Alternate metabolism during the dauer stage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* **40**: 850-856

Calnan DR, Brunet A (2008) The FoxO code. *Oncogene*. **27**: 2276-2288

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. **282**: 1318-1321

Carlson BA, Novoselov SV, Kumaraswamy E, Lee BJ, Anver MR, Gladyshev VN, Hatfield DL (2004) Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]^{Sec} (*Trsp*) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function. *J. Biol. Chem.* **279**: 8011-8017

Carter ME, Brunet A (2007) FOXO transcription factors. *Curr. Biol.* **17**:113-114

Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J.* **5**: 1221-1227

- Chance B, Sies H, Boveris A (1979)** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* **59**: 527-605
- Chance B, Williams GR (1956)** The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* **17**: 65-134
- Cantley LC (2002)** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* **296**: 1655-1657
- Clancy DJ, Gems D, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L (2002)** Dietary restriction in long-lived dwarf flies. *Science.* **296**: 319
- Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK (1993)** Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature.* **364**: 412-420
- Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR (1998)** Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J.* **335**: 1-13
- Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BM, Serrano M, Lam EW (2000)** Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J. Biol. Chem.* **275**: 21960-21968
- Crews S, Fan C (1999)** Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 580-587
- Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, Nakajima T, Fukamizu A (2004)** Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 10042-10047
- Dally H, Hartwig A (1997)** Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis.* **18**: 1021-1026
- Das KK, Das SN, Dhundasi SA (2008)** Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian. J. Med. Res.* **128**: 412-425

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery
Cell **91**: 231-241

Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2002) FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J. Cell. Biol.* **156**: 531-542

Dreher I, Jakobs TC, Köhrle J (1997) Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. Response of selenoprotein P expression to cytokines in liver cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 29364-29371

Eckers A, Reimann K, Klotz LO (2009) Nickel and copper ion-induced stress signaling in human hepatoma cells: analysis of phosphoinositide 3'-kinase/Akt signaling. *Biometals*. **2**: 307-316

Eckers A (2006) Zur Regulation der Expression von Selenoproteinen durch Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie. Diplomarbeit an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Elbekai RH, Korashy HM, Wills K, Gharavi N, El-Kadi AO (2004) Benzo[a]pyrene, 3-methylcholanthrene and beta-naphthoflavone induce oxidative stress in hepatoma hepa 1c1c7 Cells by an AHR-dependent pathway. *Free Radic. Res.* **38**: 1191-1200

Essaghir A, Dif N, Marbehant CY, Coffey PJ, Demoulin JB (2009) The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. *J. Biol. Chem.* **284**: 10334-10342

Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC (2005) Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science*. **308**: 1181-1184

Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, Burgering BM (2004) FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J.* **23**: 4802-4812

Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanché H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A (2009) Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**: 2700-2705

Frescas D, Valenti L, Accili D (2005) Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes *J. Biol. Chem.* **280**: 20589-20595

Fritsche E, Schäfer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, Hübenthal U, Cline JE, Hajimiragha H, Schroeder P, Klotz LO, Rannug A, Fürst P, Hanenberg H, Abel J, Krutmann J (2007) Lightning up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 8851-8856

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 481-507

Fukuoka M, Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Umemura S, Fukamizu A (2003) Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. *Int. J. Mol. Med.* **12**: 503-508

Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, Hisatsune H, Nishikawa S, Nakayama K, Nakayama K, Ikeda K, Motoyama N, Mori N (2004) Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **279**: 34741-34749

Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N (2000) Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem. J.* **349**: 629-634

Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N (2002) FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **277**: 26729-26732

Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ III, Emanuel BS, Rovera G, Barr FG (1993) Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat. Genet.* **5**: 230-235

Ganjam GK, Dimova EY, Unterman TG, Kietzmann T (2009) FoxO1 and HNF-4 are involved in regulation of hepatic glucokinase gene expression by resveratrol. *J. Biol. Chem.* **284**: 30783-30797

Goldstein BJ, Bittner-Kowalczyk A, White MF, Harbeck M (2000) Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J. Biol. Chem.* **275**: 4283-4289

Greer EL, Brunet A (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**: 7410-7425

Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T (1999) Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J. Biol. Chem.* **274**: 17184-17192

Haase H, Maret W (2005) Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biometals.* **18**: 333-338

Henry EC, Kende AS, Rucci G, Totleben MJ, Willey JJ, Dertinger SD, Pollenz RS, Jones JP, Gasiewicz TA (1999) Flavone antagonists bind competitively with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the aryl hydrocarbon receptor but inhibit nuclear uptake and transformation. *Mol. Pharmacol.* **55**: 716-725

Herrman JL (1977) The properties of a rat serum protein labelled by the injection of sodium selenite *Biochim. Biophys. Acta.* **500**: 61-70

Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* **413**: 179-183

Hill KE, Lloyd RS, Burk RF (1993) Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein P mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 537-541

Hill KE, Lloyd RS, Yang JG, Read R, Burk RF (1991) The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J. Biol. Chem.* **266**: 10050- 10053

Hines RN, Mathis JM, Jacob CS (1988) Identification of multiple regulatory elements on the human cytochrome P450IA1 gene. *Carcinogenesis.* **9**: 1599-1605

Hirota K, Daitoku H, Matsuzaki H, Araya N, Yamagata K, Asada S, Sugaya T, Fukamizu A (2003) Hepatocyte nuclear factor-4 is a novel downstream target of insulin via FKHR as a signal-regulated transcriptional inhibitor. *J. Biol. Chem.* **278**: 13056-13060

Hosaka T, Biggs III WH, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK, Arden KC (2004) Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 2975-2980

Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM, Tindall DJ (2005) Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 1649-1654

Ihm CG, Park JK, Kim HJ, Lee TW, Cha DR (2002) Effects of high glucose on interleukin-6 production in human mesangial cells. *J. Korean. Med. Sci.* **17**: 208-212

Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP (2003) FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J. Biol. Chem.* **278**: 35959-35967

Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* **14**: 142-146

Kamei Y, Mizukami J, Miura S, Suzuki M, Takahashi N, Kawada T, Taniguchi T, Ezaki O (2003) A forkhead transcription factor FKHR upregulates lipoprotein lipase expression in skeletal muscle. *FEBS Lett.* **536**: 232-236

Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Yamasaki Y (2005) Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **37**: 1595-1608

Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I (1999) Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J. Biol. Chem.* **274**: 13519-13524

Kenner KA, Anyanwu E, Olefsky JM, Kusari J (1996) Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling. *J. Biol. Chem.* **271**: 19810-19816

Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**: 461-464

Kim JH, Cho H, Ryu SE, Choi MU (2000) Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu²⁺ ion. *Arch. Biochem. Biophys.* **382**: 72-80

Kim HP, Roe JH, Chock PB, Yim MB (1999) Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate. *J. Biol. Chem.* **274**: 37455-37460

Klaman LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, Moghal N, Lubkin M, Kim YB, Sharpe AH, Stricker-Krongrad A, Shulman GI, Neel BG, Kahn BB (2000) Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissuespecific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 5479-5489

Klotz LO, Kröncke KD, Buchczyk DP, Sies H (2003) Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Nutr.* **133**: 1448-1451

Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature.* **419**: 316-321

Kops GJ, de Ruiter ND, Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature.* **398**: 630-634

Korashy HM, El-Kadi AO (2006) The role of aryl hydrocarbon receptor and the reactive oxygen species in the modulation of glutathione transferase by heavy metals in murine hepatoma cell lines. *Chem. Biol. Interact.* **162**: 237-248

Korashy HM, El-Kadi AO (2004) Differential effects of mercury, lead and copper on the constitutive and inducible expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR)-regulated genes in cultured hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *Toxicology.* **201**: 153-172

Kortylewski M, Feld F, Krüger KD, Bahrenberg G, Roth RA, Joost HG, Heinrich PC, Behrmann I, Barthel A (2003) Akt modulates STAT3-mediated gene expression through a FKHR (FOXO1a)-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**: 5242-5249

Krotkiewska B, Banas T (1992) Interaction of Zn²⁺, and Cu²⁺, Ions with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from bovine heart and rabbit muscle. *Int. J. Biochem.* **24**: 1501-1505

Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N, Issad T. (2008) O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Lett.* **582**: 829-834

Kyoung Kim H, Kyoung Kim Y, Song IH, Baek SH, Lee SR, Hye Kim J, Kim JR (2005) Down-regulation of a forkhead transcription factor, FOXO3a, accelerates cellular senescence in human dermal fibroblasts. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **60**: 4-9

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* **369**: 156-160

Kyriakis JM, Avruch J (1990) pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J. Biol. Chem.* **265**: 17355-17363

Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685

Leevers SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999) Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**: 219-225

Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C (2000) 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* **49**:896-903

Mahmud DL, Amlak M, Deb DK, Plataniias LC, Uddin S, Wickrema A (2002) Phosphorylation of forkhead transcription factors by erythropoietin and stem cell factor prevents acetylation and their interaction with coactivator p300 in erythroid progenitor cells. *Oncogene.* **21**: 1556-1562

Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A (2003) Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 11285-11290

M'Bemba-Meka P, Lemieux N, Chakrabarti SK (2007) Role of oxidative stress and intracellular calcium in nickel carbonate hydroxide-induced sister-chromatid exchange, and alterations in replication index and mitotic index in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch. Toxicol.* **81**:89-99

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM (2000) AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature.* **404**: 782-787

Meyer BK, Pray-Grant MG, Vanden Heuvel JP, Perdew GH (1998) Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 978-988

Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* **13**: 20-25

Misra HP (1974) Generation of Superoxide Free Radical during the Autoxidation of Thiols. *J. Biol. Chem.* **249**: 2151-2155

Moore BW, McGregor D (1965) Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J. Biol. Chem.* **240**: 1647-1653

Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1996) A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **382**: 536-539

Mostert V, Wolff S, Dreher I, Köhrle J, Abel J (2001) Identification of an element within the promoter of human selenoprotein P responsive to transforming growth factor-beta. *Eur. J. Biochem.* **268**: 6176-6181

- Mostert V, Lombeck I, Abel J (1998)** A novel method for the purification of selenoprotein P from human plasma: Arch. Biochem. Biophys. **357**: 326-330
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L (2004)** Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. Cell **116**: 551-563
- Murga C, Laguinge L, Wetzker R, Cuadrado A, Gutkind JS (1998)** Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma. J. Biol. Chem. **273**: 19080-19085
- Nakae J, Barr V, Accili D (2000)** Differential regulation of gene expression by insulin and IGF-1 receptors correlates with phosphorylation of a single amino acid residue in the forkhead transcription factor FKHR. EMBO J. **19**: 989-996
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ (2004)** Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. J. Biol. Chem. **279**: 23847-23850
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP (2000)** Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. Biochem. Pharmacol. **59**: 65-85
- Nemoto S, Finkel T (2002)** Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. Science. **295**: 2450-2452
- Nowak K, Killmer K, Gessner C, Lutz W (2007)** E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. Biochim. Biophys. Acta. **1769**: 244-252
- Nystrom GJ, Lang CH (2008)** Sepsis and AMPK Activation by AICAR Differentially Regulate FoxO-1, -3 and -4 mRNA in Striated Muscle. Int. J. Clin. Exp. Med. **1**: 50-63

O'Brien RM, Granner DK (1996) Regulation of gene expression by insulin. *Physiol. Rev.* **76**: 1109-1161

Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature.* **389**: 994-999

Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA (2005) JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 4494-4499

Olmos Y, Valle I, Borniquel S, Tierrez A, Soria E, Lamas S, Monsalve M (2009) Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1alpha in the induction of oxidative stress genes. *J. Biol. Chem.* **284**: 14476-14484

Omicinski CJ, Redlich CA, Costa P (1990) Induction and developmental expression of cytochrome P450IA1 messenger RNA in rat and human tissues: detection by the polymerase chain reaction. *Cancer Res.* **50**: 4315-4321

Ostrakhovitch EA, Lordnejad MR, Schliess F, Sies H, Klotz LO (2002) Copper ions strongly activate the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway independent of the generation of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**: 232-239

Perdew GH (1988) Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **263**: 13802-13805

Pierrou S, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerback S, Carlsson P (1994) Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *EMBO J.* **13**: 5002-5012

Plas DR, Thompson CB (2003) Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J. Biol. Chem.* **278**: 12361-12366

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature*. **423**: 550-555

Qu S, Su D, Altomonte J, Kamagate A, He J, Perdomo G, Tse T, Jiang Y, Dong HH (2007) PPAR α mediates the hypolipidemic action of fibrates by antagonizing FoxO1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**: 421-434

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**: 481-487

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991a) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**: 4244-4250

Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR (2002) A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell*. **2**: 81-91

Rannug U, Rannug A, Sjoberg U, Li H, Westerholm R, Bergman J. (1995) Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem. Biol.* **2**: 841-845

Rannug A, Rannug U, Rosenkranz HS, Winqvist L, Westerholm R, Agurell E, Grafstrom AK (1987) Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J. Biol. Chem.* **262**: 15422-15427

Ravichandran LV, Chen H, Li Y, Quon MJ (2001) Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol. Endocrinol.* **15**: 1768-1780

Rena G, Prescott AR, Guo S, Cohen P, Unterman TG (2001) Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targetting. *Biochem. J.* **354**: 605-612

Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P (1999) Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **274**: 17179-17183

Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2003) Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 4012-4017

Rudd MD, Johnston DA, Kazianis S, Butler AP (2003) Cloning and analysis of a FoxO transcription factor from *Xiphophorus*. *Gene.* **302**: 31-41

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Samuel VT, Choi CS, Phillips TG, Romanelli AJ, Geisler JG, Bhanot S, McKay R, Monia B, Shutter JR, Lindberg RA, Shulman GI, Veniant MM (2006) Targeting foxo1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action. *Diabetes.* **55**: 2042-2050

Sasco AJ, Secretan MB, Straif K (2004) Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer.* **45**: 3-9

Sauve AA, Wolfberger C, Schramm VL, Boeke JD (2006): The biochemistry of sirtuins. *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 435-465

Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 1191-1212

Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR (2002) Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 6247-6260

Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, Walther R, Unterman TG (2000) Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B α and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J. Biol. Chem.* **275**: 36324-36333

Schmoll D, Wasner C, Hinds CJ, Allan BB, Walther R, Burchell A (1999) Identification of a cAMP response element within the glucose-6-phosphatase hydrolytic subunit gene promoter which is involved in the transcriptional regulation by cAMP and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *Biochem. J.* **338**: 457-463

Schmoll D, Allan BB, Burchell A (1996) Cloning and sequencing of the 5' region of the human glucose-6-phosphatase gene: transcriptional regulation by cAMP, insulin and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *FEBS Lett.* **383**: 63-66

Schwerdtle T, Hamann I, Jahnke G, Walter I, Richter C, Parsons JL, Dianov GL, Hartwig A (2007) Impact of copper on the induction and repair of oxidative DNA damage, poly(ADP-ribosyl)ation and PARP-1 activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**: 201-210

Searle AJF, Tomasi A (1982) Hydroxyl Free Radical Production in Iron-Cysteine Solutions and Protection by Zinc. *J. of inorg. Biochemistry.* **17**: 161-166

Sies H (1997) Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* **82**: 291-295

Sies H (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**: 1058-1071

Speckmann B, Walter PL, Alili L, Reinehr R, Sies H, Klotz LO, Steinbrenner H (2008) Selenoprotein P expression is controlled through interaction of the coactivator PGC-1 α with FoxO1 α and hepatocyte nuclear factor 4 α transcription factors. *Hepatology.* **48**: 1998-2006

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. **95**: 29-39

Steinbrenner H, Bilgic E, Alili L, Sies H, Brenneisen P (2006) Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. *Free Radic. Res.* **40**: 936-943

Stocker H, Andjelkovic M, Oldham S, Laffargue M, Wymann MP, Hemmings BA, Hafen E (2002) Living with lethal PIP3 levels: viability of flies lacking PTEN restored by a PH domain mutation in Akt/PKB. *Science*. **295**: 2088-2091

Streeper RS, Svitek CA, Chapman S, Greenbaum LE, Taub R, O'Brien RM (1997) A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin, *J. Biol. Chem.* **272**: 11698-11701

Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y (2005) JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J. Cell. Biol.* **170**: 295-304

Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegue E, DePinho RA, Gilliland DG (2007) FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell*. **128**: 325-339

Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ Jr, DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*. **296**: 530-534

Valenti L, Rametta R, Dongiovanni P, Maggioni M, Fracanzani AL, Zappa M, Lattuada E, Roviario G, Fargion S (2008) Increased expression and activity of the transcription factor FOXO1 in nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes*. **57**: 1355-1362

van der Horst A, Vries-Smits AM, Brenkman AB, van Triest MH, van den BN, Colland F, Maurice MM, Burgering BM (2006) FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat. Cell. Biol.* **8**: 1064-1073

van der Horst A, Tertoolen LGJ, de Vries-Smits LMM, Frye RA, Medema RH, Burgering, BMT (2004) FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(Sirt1). *J. Biol. Chem.* **279**: 28873-28879

Vanfleteren JR, Braeckman BP (1999) Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol. Aging.* **20**: 487-502

Viluksela M, Stahl BU, Rozman KK (1995) Tissue-specific effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **135**: 308-315.

Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **103**: 931-943

Wada T, Sasaoka T, Funaki M, Hori H, Murakami S, Ishiki M, Haruta T, Asano T, Ogawa W, Ishihara H, Kobayashi M (2001) Overexpression of SH2-containing inositol phosphatase 2 results in negative regulation of insulin-induced metabolic actions in 3T3-L1 adipocytes via its 5'-phosphatase catalytic activity. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 1633-1646

Walter PL, Steinbrenner H, Barthel A, Klotz LO (2008) Stimulation of selenoprotein P promoter activity in hepatoma cells by FoxO1a transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**: 316-321

Walter PL, Kampkötter A, Eckers A, Barthel A, Schmoll D, Sies H, Klotz LO (2006) Modulation of FoxO signaling in human hepatoma cells by exposure to copper or zinc ions. *Arch. Biochem. Biophys.* **454**: 107-113

Walter PL (2006) Aktivierung des Akt/FoxO-Signalweges durch Insulin und Schwermetallionen: transkriptionelle Regulation der Biosynthese von Selenoprotein P. Dissertation

an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Wang F, Marshall CB, Li GY, Yamamoto K, Mak TW, Ikura M (2009) Synergistic Interplay between Promoter Recognition and CBP/p300 Coactivator Recruitment by FOXO3a. *ACS Chem. Biol.* **DOI:** 10.1021/cb900190u

Wei YD, Rannug U, Rannug A (1999) UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chem. Biol. Interact.* **118:** 127-140

Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H (1989) The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell.* **57:** 645-658

Willcox BJ, Donlon TA, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, Masaki KH, Willcox DC, Rodriguez B, Curb JD (2008) FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105:** 13987-13992

Williams SN, Shih H, Guenette DK, Brackney W, Denison MS, Pickwell GV, Quattrochi LC (2000) Comparative studies on the effects of green tea extracts and individual tea catechins on human CYP1A gene expression. *Chem. Biol. Interact.* **128:** 211-229

Williamson DL, Butler DC, Alway SE (2009) AMPK inhibits myoblast differentiation through a PGC-1alpha-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297:** E304-314

Wincent E, Amini N, Luecke S, Glatt H, Bergman J, Crescenzi C, Rannug A, Rannug U (2009) The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J. Biol. Chem.* **284:** 2690-2696

Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, Fukamizu A (2004) Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer

partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J. Biol. Chem.* **279**: 23158-23165

Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y (1993) Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 25846-25856

Zhao X, Gan L, Pan H, Kan D, Majeski M, Adam SA, Unterman TG (2004) Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *Biochem. J.* **378**: 839-849

Zheng WH, Kar S, Quirion R (2000) Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHRL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 39152-39158

Zhou W, Cao Q, Peng Y, Zhang QJ, Castrillon DH, DePinho RA, Liu ZP (2009) FoxO4 inhibits NF-kappaB and protects mice against colonic injury and inflammation. *Gastroenterology.* **137**: 1403-1414

Publikationen und Tagungsbeiträge

Eckers A, Klotz LO (2009) Heavy-metal ion induced insulin-mimetic signaling. Redox Report. **14**(4): 141-146

Eckers A, Reimann K, Klotz LO (2009) Nickel and copper ion-induced stress signaling in human hepatoma cells: analysis of phosphoinositide 3'-kinase/Akt signaling. Biometals. **2**: 307-316

Walter PL, Kampkötter A, Eckers A, Barthel A, Schmoll D, Sies H, Klotz LO (2006) Modulation of FoxO signaling in human hepatoma cells by exposure to copper or zinc ions. Arch. Biochem. Biophys. **454**:107-113

Eckers A, Haarmann-Stemmann T, Abel J, Krutmann J, Klotz LO. 13th Joint Meeting der Signal Transduction Society (STS): Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes, Weimar, 28.-30.10.2009: Impact of polycyclic aromatic hydrocarbons on FoxO signaling. Reisekostenstipendium der STS.

Eckers A, Klotz LO. Signal Transduction and Disease, RWTH Aachen, 27.-30.09.2009: Modulation of FoxO signaling by polycyclic aromatic hydrocarbons.

Eckers A, Klotz LO. Society for Free Radical Research (SFRR), Rom, Italien, 26.-29.08 2009: Xenobiotic stress alters FoxO-responsive signaling. Young investigator award

Eckers A, Reimann K, Klotz LO. Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, 10.-12.03.2009: Einfluss von Nickelionen auf die PI3K/Akt/FoxO-Signalkaskade.

Eckers A, Klotz LO. FEBS/SFRR-Europe Free radical summer school 2008 "Lipid Peroxidation and Free Radical-Signalling: Roles in Pathophysiology", Spetses, Griechen-

land, 30.08.-05.09.2008: Effect of heavy metal stress on FoxO signaling. Stipendium des FEBS Youth Travel Fund.

Eckers A, Klotz LO. SFRR-Europe Meeting 2008 "Free radicals and nutrition", Berlin, 05.-09.07.2008: Heavy metal stress-induced modulation of FoxO signaling.

Eckers A, Walter PL, Barthel A, Kampkötter A, Klotz LO. 49. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Toxikologie, Mainz, 11.-13.03.2008: Insulinmimetische Aktivierung zellulärer Signalprozesse durch Schwermetallionen.

Eckers A, Klotz LO. 4. Annual Meeting of the GRK 1033, Schloss Mickeln, Düsseldorf, 22.-23.11.2007: Einfluss von Schwermetallionen auf FoxO-Signaltransduktion.

Eckers A, Klotz LO. MiMage/Link-Age joint summer school „Models and Methods in Ageing Research“, Les Diablerets, Schweiz, 18.-22-09.2007: Impact of heavy metal stress on FoxO signaling.

Eckers A, Reimann K, Klotz LO. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Altersforschung, Karlsruhe, 10.11.2007: Heavy metal stress as a modulator of senescence-related signalling.

Eckers A, Klotz LO. Jahrestagung der Signal Transduction Society „Signal Transduction - Receptors, Mediators and Genes“, Weimar, 01.-03.11.2007: Insulin-mimetic effect of heavy metal stress on FoxO signaling. Reisekostenstipendium der STS.

Eckers A, Klotz LO. Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 22.06.2007: Einfluss von Schwermetallionen auf Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie.

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz für die interessante Themenstellung und die fachliche Betreuung. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die wissenschaftlichen Diskussionen und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Dr. Thomas Haarmann-Stemmann bedanke ich mich für die Unterstützung bei den PCR-Analysen und für interessante und lustige Momente.

Kerstin Reimann gilt mein Dank für eine wunderbare, kreative Zusammenarbeit und Freundschaft und für die Durchführung der Glutathionmessung.

Mein Dank gilt Frau Dr. Niloofar Ale-Agha und Frau Elisabeth Sauerbier für Hilfe bei experimentellen und theoretischen Fragestellungen sowie die angenehme, warme Büroatmosphäre.

Bei Herrn Dr. Peet Schröder möchte ich mich für konstruktive Diskussionen und sein stets offenes Ohr bedanken. Zudem für die überlassenen Carotinspenden.

Lirija, Dir danke ich für Deine Freundschaft und Deine Aufheiterungen während der letzten dreieinhalb Jahren! Dabei bin ich gerade erst gekommen.

Ich bedanke mich bei allen anderen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Klotz, die mich auf diesem Weg begleitet haben für eine schöne Zeit.

Mein Dank gilt, einer Tradition folgend, Frau Annette Quarkbeutel, für viele fruchtbare Diskussionen.

Herrn Dr. Bodo Speckmann sei für die Überlassung der SeP-Mut3-luc und SeP-Mut4-luc Konstrukte gedankt.

Allen Freunden und Kollegen der molekularen Altersforschung des IUF danke ich für das freundliche und angenehme Arbeitsklima.

Ich bedanke mich bei meiner Freundin Melanie Richartz für ein offenes Ohr, Geduld und das mehrmalige Ins-Gedächtnis-Rufen, was danach kommt: Fette Beute.

Ich danke Frau Ida Thöne (nicht nur) für den Ausspruch: Das, was Du da oben hast, das kann dir keiner mehr nehmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Andreas. Ich danke ihm für seine liebevolle Geduld und die Hilfe bei strukturellen Fragen.

Ich danke meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihre Liebe.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 02.12.2009

(Anna Eckers)