HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Regulation der hepatischen Bildung von Coeruloplasmin: Zur Bedeutung insulinresponsiver Signalkaskaden und der Rolle von FoxO-Transkriptionsfaktoren

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Martin Leyendecker
aus Rheinberg

Düsseldorf, Mai 2011

aus dem IUF-Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung

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

Referent: Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz
Korreferent: Prof. Dr. Georg Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2011

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und diese in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht zu haben. Alle Angaben, die veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche gekennzeichnet.

_____

(Martin Leyendecker)

Düsseldorf, 02. Mai 2011

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis viii-xi

1. Einleitung 1

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und Schwermetalle 1

1.2 Die PI3K/Akt-Signalkaskade 2

1.3 Fox-Transkriptionsfaktoren und die Unterklasse „O“ 5

1.4 Regulation der Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren 6

1.4.1 Regulation der Expression des FoxO-Gens 6

1.4.2 Posttranslationale Modifikation 7

1.5 Zielgene und zelluläre Funktionen der FoxO Proteine 10

1.6 Fettleibigkeit und Insulinresistenz 12

1.7 Coeruloplasmin 14

1.8 Fragestellungen 16

2. Material und Methoden 17

2.1 Zellkultur 17

2.1.1 Stammhaltung und Anzucht eukaryontischer Zellen 17

2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen 19

2.1.3 Mykoplasmentest 19

2.2 Behandlung eukaryontischer Zellen 19

2.2.1 Neutralrot-Test zur Viabilitätsbestimmung 20

2.3 Transiente Transfektion von Zellen 21

2.3.1 Behandlung mit siRNA 21

2.3.2 Überexpression der FoxO-Proteine 22

2.4 Bakterienkultur 22

2.4.1 Anzucht der Bakterien 22

2.4.2 Herstellung von *E. coli*-Gefrierkulturen 23

2.5 Gewebe 24

2.6 Analyse von Proteinen 24

2.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford 24

2.6.2 Protein-Quantifizierung mittels BCA-Reaktion 25

2.6.3 Albumin-Depletion 25
2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 25
2.6.5 Elektrotransfer auf Membranen (Western-Blot) 27
2.6.6 Detektion oxidierter Proteine 28
2.6.7 Immunodetektion 29
2.6.8 Entfernung eines Antikörpers von der Membran 31
2.6.9 ELISA („Enzyme-linked immunosorbent assay“) 31
2.6.10 Immunfluoreszenzmikroskopie 31
2.7 Analyse von Nukleinsäuren 32
2.7.1 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA 32
2.7.2 RNA-Isolierung und Quantifizierung 33
2.7.3 Reverse Transkription 33
2.7.4 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-RT-PCR) 34
2.7.5 Agarose-Gelelektophorese 37

3. Ergebnisse 39
3.1. Insulin-induzierte Regulation der Cp-Synthese über den PI3K/Akt/FoxO-Signalweg 39
3.1.1 Insulin-vermittelte Kontrolle der Cp Expression 39
3.1.2 PI3K/Akt-abhängige Regulation der Cp-Expression 43
3.1.3 Untersuchung von Cp als Zielgen von FoxO-Proteinen 45
3.1.4 Modulation der Cp-Expression durch Kupferionen 50
3.2. Einfluss fettreicher Ernährung auf Cp-Bildung im *in vivo*-Maus-Modell 52
3.2.1 Modulation der Cp-mRNA-Bildung durch fettreiche Ernährung 52
3.2.2 Auswirkung einer Hochfett-Diät auf Cp-Spiegel im Serum 54
3.3. Wirkung von Metformin auf die Cp-Biosynthese 57
3.4. Regulation der FoxO-Expression 60

4. Diskussion 65
4.1 Regulation der hepatischen Bildung von Cp durch Insulin 65
4.2 Cp als Biomarker? 68
4.3 Modulation der Cp-Synthese durch Metformin 71

5. Zusammenfassung 74

Summary 75

6. Literaturverzeichnis 76

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

AFX	*ALL1-fused-gene from chromosome-X*
AICAR	*aminoimidazole-carboxamide-ribonucleotide*
Amp	Ampicillin
AMP	*adenosine monophosphate*
AMPK	*AMP-activated protein kinase*
ANOVA	*analysis of variance*
APS	*ammonium peroxydisulfate*
ATP	*adenosine triphosphate*
BAD	*BcL-X_L/BcL-2-associated death promoter*
Bcl-2	*B-cell lymphoma 2*
BIM	*Bcl-2 interacting mediator of cell death*
bp	Basenpaare
CAT	*catalase*
Cdk	*Cyclin-dependent kinase*
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
Cp	Coeruloplasmin
CP	*crossing point*
DBE	*DAF-16 binding element*
DMEM	*Dulbecco´s modified Eagle´s Medium*
DMSO	*dimethyl sulfoxide*
DNA	*deoxyribonucleic acid*
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
dNTP	*deoxyribonucleoside triphosphate*
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
ER-HBD	*estrogen receptor hormone binding domain*
EtOH	Ethanol
E2F-1	*E2 promotor binding factor-1*
FasL	*Fas-Ligand*

fkh-Gen	*forkhead*-Gen
FKHR	*forkhead in rhabdomyosarcoma*
FKHRL1	*forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1*
Fox	*forkhead-Box*
FoxO	*forkhead* Box Gruppe O
G6Pase	Glukose-6-Phosphatase
GADD45	*growth arrest and DNA damage 45*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT-4	Glukosetransporter-4
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSK-3	Glykogensynthasekinase-3
HAUSP	*herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*
HNF-4	*heptocyte nuclear factor-4*
HPRT-1	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1
HRP	*horseradish peroxidase*
IGF-1	*insulin-like growth factor 1*
IRE	Insulinresponsives Element
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JNK	*C-Jun N-terminal kinase*
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDL	*low density lipoprotein*
mRNA	*messenger ribonucleic acid*
mTOR	*mammalian target of rapamycin*
NAFLD	*non alcoholic fatty liver disease*
NES	*nuclear export sequence*
NLS	*nuclear localisation signal*
NOX	NADPH-Oxidasen
OxLDL	Oxidiertes LDL
PAA	Polyacrylamid

PAX	*paired box*
PBS	*phosphate buffered saline*
PBS/T	PBS + Tween 20
PCR	*polymerase chain reaction*
PDK	*phosphoinositide-dependent kinase*
PDGF	*platelet-derived growth factor*
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PGC1α	*peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activator 1-* α
PH-Domäne	*pleckstrin-homology*-Domäne
PI3K	Phosphoinositid 3'-Kinase
PIP_2	Phosphatidylinositol-4',5'-bisphosphat
PIP_3	Phosphatidylinositol-3',4',5'-trisphosphat
$p27^{kip1}$	Kinaseinhibitorprotein p27
PTB-Domänen	Phosphotyrosinbindungs-Domänen
PTEN	*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*
PTM	posttranslationale Modifikationen
PTPasen	Proteintyrosinphosphatasen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RICTOR	*rapamycin-insensitive companion of mTOR*
RNA	*ribonucleic acid*
ROS	*reactive oxygen species*
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SeP	Selenoprotein P
Ser	Serin
SH2-Domäne	*Src-homology 2*-Domäne
siRNA	*small-interference* RNA
SIRT	*silent information regulator 2*

Skp2	*S-phase kinase-associated protein 2*
SOD	Superoxiddismutase
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	*Tris-buffered saline*
TBS/T	TBS + Tween 20
TCF	*T-cell factor*
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylendiamin
Thr	Threonin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-*α*
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
Tx	4-Hydroxytamoxifen
T2DM	Typ 2-Diabetes mellitus
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

1. Einleitung

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und Schwermetalle

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind sowohl radikalische als auch nicht-radikalische Verbindungen, die durch Elektronen- oder Energietransfer auf molekularen Sauerstoff (O_2) entstehen (Klotz und Sies, 2009). Eine Hauptquelle von ROS in Zellen höherer Organismen ist die mitochondriale Atmungskette. So werden an verschiedenen Redoxzentren der Elektronentransportkette Superoxidanionradikale ($O_2^{-\cdot}$) als Nebenprodukt generiert, welche spontan oder katalysiert durch Superoxiddismutasen (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) disproportioniert werden (Chance et al., 1979). Die Anwesenheit von redoxaktiven Übergangsmetallionen wie Eisen (Fe) und Kupfer (Cu) in ihrer reduzierten Form (Fe(II); Cu(I)) führt in Reaktionen vom Fenton-Typ zur partiellen Reduktion von H_2O_2 und zur Produktion von Hydroxyl- ($^{\cdot}OH$) und Alkoxylradikalen ($^{\cdot}OR$) (Flitter et al., 1983; Goldstein et al., 1993). Ebenso können Metallionen wie Cu(II) Thiole wie das Tripeptid Glutathion (GSH) oxidieren und in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff die Cu(I)-bedingte Bildung von $O_2^{-\cdot}$ und H_2O_2 induzieren (Barthel et al., 2007; Misra, 1974).

ROS wirken als sekundäre Botenstoffe und erfüllen wichtige physiologische Funktionen. NADPH-Oxidasen (NOX) erzeugen in kontrollierter Weise ROS, welche die Immunabwehr, Zellproliferation und Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion unterstützen (Lambeth, 2004). So führt die Aktivierung von NOX in Phagozyten nach Aufnahme von Krankheitserregern in das Phagosom zur Produktion von $O_2^{-\cdot}$ und zu einer durch ROS induzierten mikrobizidalen Antwort (Babior et al., 2002). In Säugerzellen verstärkt H_2O_2 neben anderen ROS die Tyrosinrezeptor-vermittelte Signaltransduktion durch Oxidation und Inaktivierung von Proteintyrosinphosphatasen (PTPasen) (Barthel und Klotz, 2005; Toledano et al., 2010). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass durch Hemmung des H_2O_2 abbauenden Enzyms Peroxiredoxin die lokale Signalwirkung von H_2O_2 in der Rezeptorregion ermöglicht wird (Toledano et al., 2010).

Der kontinuierlichen Produktion von ROS im aeroben Metabolismus stehen antioxidative Schutzsysteme gegenüber (Sies, 1993). Schwermetallionen bilden nicht nur ROS, sondern übernehmen auch als Ko-Faktoren in antioxidativen Enzymen wie der Kupfer und Zink

enthaltenden Cu,Zn-SOD wichtige Funktionen. So sind sie sowohl an der enzymatischen Aktivität als auch an der Strukturstabilisierung des Proteins beteiligt (Hart et al., 1999; Lynch et al., 2006; Rotilio et al., 1972). Ein Ungleichgewicht zwischen Anti- und Prooxidantien zu Gunsten der Prooxidantien wird als „oxidativer Stress“ bezeichnet und kann zu gestörter Signaltransduktion und struktureller Veränderung diverser Zellkomponenten führen (Sies, 1985). Speziell das hochreaktive $^{\cdot}OH$ schädigt DNA, was zur Bildung von Basenpaarmutationen, Deletionen und Insertionen führen kann (Wiseman et al. 1996). Lipidperoxidation erhöht die Viskosität von Zellmembranen, und die Oxidation von Proteinen kann deren Funktionsverlust und proteolytische Degradation zur Folge haben (Richter, 1987; Stadtman et al., 1997; Valko et al., 2006)**.** Die Akkumulation oxidativer Schäden in Zellen und Geweben während des Lebens wird als mögliche Ursache für Alterungsprozesse und mit dem Altern assoziierte Krankheiten diskutiert (Vina et al., 2007).

Neben ihren Funktionen als ROS-Produzenten und Ko-Faktoren im antioxidativen System induzieren Schwermetalle insulinähnliche Effekte in Zellen und Organismen. So weisen Hepatozyten der Ratte nach Cu(II)- oder Zn(II)-Exposition eine verminderte Glukoneogenese *in vitro* und Rattenlebern einen erhöhten Glykogenspiegel *in vivo* auf (Rana et al., 1985; Tolbert et al., 1981). In diesem Zusammenhang konnte die Arbeitsgruppe Klotz in früheren Studien zeigen, dass Cu(II) und Zn(II) über einen noch unbekannten molekularen Mechanismus in „insulinmimetischer“ Weise den Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg in menschlichen HepG2-Leberkarzinomzellen aktivieren (Eckers et al., 2009; Walter et al., 2006). Diese Rezeptortyrosinkinase (RTK)-vermittelte Signalkaskade wird neben Insulin und anderen Wachstumsfaktoren auch durch Stressimpulse wie ROS stimuliert (Klotz et al., 2000; Wang et al., 2000). Da Zn(II) – im Gegensatz zu Cu(II) – keine Redoxaktivität aufweist, kann ROS-Produktion jedoch nicht die Vorraussetzung für die Schwermetall-induzierte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs sein (Barthel et al., 2007; Ostrakhovitch et al., 2002).

1.2 Die PI3K/Akt-Signalkaskade

Der Insulinrezeptor (InsR) gehört zur Familie der RTK und ist ein über Disulfidbrücken stabilisiertes Heterotetramer, bestehend aus zwei α- (135 kDa) und zwei ß-Untereinheiten (95 kDa). Die α-Untereinheiten sind extrazellulär lokalisiert und weisen die Bindungsstelle für

Insulin auf. Jede der beiden ß-Untereinheiten ist über eine extrazelluläre Domäne mit den α-Untereinheiten verbunden und besitzt eine intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität. Die Bindung von Insulin an die α-Untereinheiten führt zu einer Konformationsänderung und in Folge dessen zur Autophosphorylierung und Aktivierung der Tyrosinkinase-Domänen (Lee et al., 1994; Schenker et al., 1988). Insulinrezeptorsubstrate (IRS) erkennen die aktivierten Tyrosinkinasen und binden über ihre Phosphotyrosinbindungs (PTB)-Domänen am InsR. Durch die Bindung werden die IRS ebenfalls an Tyrosinresten phosphoryliert und können wiederum von Interaktionspartnern mit Src-homology 2 (SH-2)-Domänen erkannt und gebunden werden (Virkamäki et al., 1999). Eines dieser SH-2-Domänen enthaltenen Adapterproteine ist die regulatorische Untereinheit von Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K), welche zur Familie der Lipidkinasen gehören. Die PI3-Kinasen der Klasse 1a sind Heterodimere, bestehend aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen Untereinheit (p110). Die regulatorische p85-Untereinheit besitzt zwei SH-2 Domänen zur spezifischen Bindung an Tyrosin- phosphorylierte IRS oder Rezeptorkinasen und reguliert die Aktivierung und Positionierung der katalytischen p110-Untereinheit in der Nähe der Plasmamembran. Dort katalysiert p110 die Phosphorylierung seines Substrats Phosphatidylinositol-4',5'-bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-3',4',5'-trisphosphat (PIP_3) (Cantley, 2002). Die Serin/Threoninkinase Akt sowie PDK („phosphoinositide-dependent kinase") werden durch direkte Bindung über ihre pleckstrin-homology (PH)-Domänen an PIP_3 ko-lokalisert. Dies begünstigt die PDK- vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung der Akt an Threonin (Thr)-308 und Serin (Ser)-473. Dabei phosphoryliert PDK1 die Akt an Thr-308, welches in der katalytischen Domäne von Akt lokalisiert ist. Die Identität des bereits in der Literatur als PDK2 bezeichneten Enzyms, welches Akt carboxyterminal an Ser-473 phosphoryliert, wird hingegen kontrovers diskutiert (Cantley, 2002; Lizcano und Alessi, 2002). Ein möglicher Kandidat für die PDK2 ist ein Komplex aus mTOR („mammalian target of rapamycin") und RICTOR („rapamycin-insensitive companion of mTOR"), der in 3T3-L1-Adipozyten die Phosphorylierung der Akt an Ser-473 stimuliert (Hresko et al., 2005). Die aktivierte Serin/Threoninkinase Akt dissoziiert von der Plasmamembran und phosphoryliert Substrate sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern an spezifischen Motiven (Lizcano und Alessi, 2002). Zu den Substraten der Akt gehören unter anderem die Glykogensynthasekinase-3 (GSK-3), deren Phosphorylierung an Ser-9 ihre Inaktivierung und damit eine Steigerung der Glykogensynthese in der Leber bedeutet (van Weeren et al., 1998). Die Phosphorylierung und Inaktivierung der proapoptotischen Proteine BAD („BcL-X_L/BcL-2-associated death promoter") und Caspase 9 durch Akt verhindert den programmierten Zelltod und bewirkt das

Überleben der Zelle (Datta et al., 1999). Zudem wurde eine mögliche Regulation der subzellulären Translokation des Glukosetransporters-4 (GLUT-4) zur Zelloberfläche von Muskelzellen durch Insulin-aktivierte Akt beschrieben, wodurch die Aufnahme von Glukose aus dem Blut stimuliert wird (Coffer et al., 1998; Wang et al., 1999). Weitere Substrate der Akt sind FoxO-Proteine, die eine Unterklasse der großen Familie der Fox-Transkriptionsfaktoren darstellen und eine zentrale Rolle als Vermittler von Wachstumsfaktor-induzierten Signalen auf Ebene der Genexpression einnehmen.

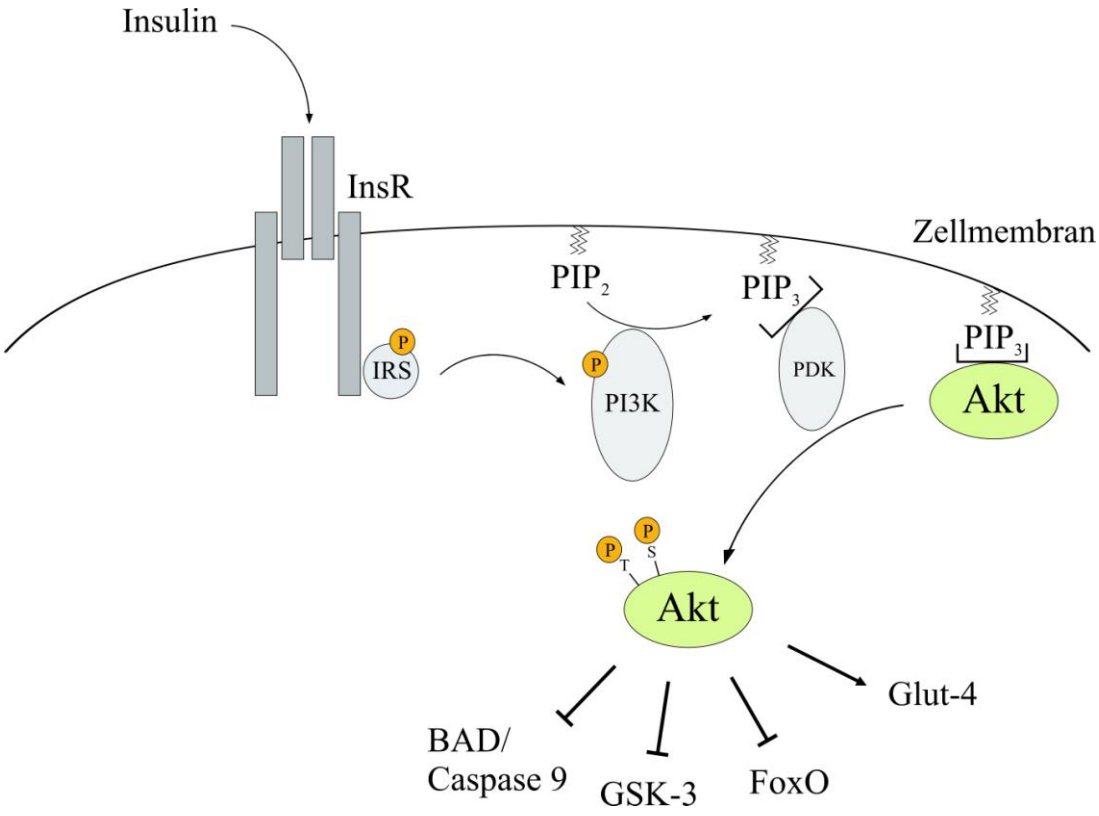

Abb.1.1: Mechanismus der Insulin-induzierten Aktivierung von Akt über die PI3K
Die Bindung von Insulin am Insulin Rezeptor (InsR) führt zur Autophosphorylierung und zur Aktivierung der PI3K. Die Phosphorylierung von PIP_2 (Phosphatidylinositol-4',5'-bisphosphat) zu PIP_3 (Phosphatidylinositol-3',4',5'-trisphosphat) durch die PI3K bewirkt die Ko-Lokalisation von PDK („phosphoinositide-dependent kinase") und Akt, wodurch die Aktivierung der Akt durch PDK-vermittelte Serin/Threoninphosphorylierung ermöglicht wird. Zudem sind einige Substrate der Akt dargestellt. IRS (Insulinrezeptorsubstrat); P (Phosphorylierung); GSK-3 (Glykogensynthasekinase-3); Glut-4 (Glukosetransporter-4); BAD ($BcL\text{-}X_L$/BcL-2-associated death promoter). Abbildung modifiziert nach Barthel und Klotz (2005).

Die PI3K/Akt-Signalkaskade wird auf verschiedenen Stufen durch die Aktivität von Phosphatasen antagonisiert. So werden aktivierte RTK und möglicherweise auch IRS durch PTPasen wie PTP1B dephosphoryliert und die Signalübertragung unterbunden (Klaman et al.,

2000). Die Lipid- und Proteinphosphatase PTEN („phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) ist ebenfalls ein Vertreter der PTPasen und blockiert die Signalkaskade, indem es die Dephosphorylierung von PIP_3 zu PIP_2 katalysiert (Hopkin, 1998). Auch phosphorylierte Akt selbst kann durch Serin/Threoninphosphatasen inaktiviert werden. Die hier beschriebenen Phosphatasen sind negative Regulatoren des PI3K/Akt Signalwegs, und ihr Funktionsverlust würde den aktivierten Zustand der Kaskade begünstigen. Der aktivierende Effekt von ROS auf die PI3K/Akt-Kaskade kann daher neben direkten Interaktionen mit involvierten Signalproteinen auch durch ROS-induzierte Oxidation und Inaktivierung von beteiligten Phosphatasen erklärt werden (Barthel und Klotz, 2005).

1.3 Fox-Transkriptionsfaktoren und die Unterklasse „O“

Das homeotische Forkhead (*fkh*)-Gen spielt eine zentrale Rolle in der embryonalen Entwicklung bei Drosophila melanogaster und verursacht bei Mutation ektopische Kopfstrukturen in terminalen Regionen des Ektoderms inklusive Vorder- und Hinterdarm (Jürgens et al., 1988; Weigel et al., 1989). Sequenzvergleiche zwischen dem *fkh*-Gen und dem Transkriptionsfaktor HNF-3a der Ratte zeigten große Übereinstimmungen in der DNA-bindenden Domäne von HNF-3a (Weigel et al., 1990). Diese evolutionär konservierte 110 Aminosäuren lange Sequenz wird als Forkhead-Box (Fox) bezeichnet und ist das charakteristische DNA-bindende Motiv der Fox-Transkriptionsfaktorfamilie (Kaestner et al., 2000). Die N-terminale Fox-Domäne weist drei α-Helices, drei ß-Faltblätter sowie zwei große Schleifenstrukturen auf, weshalb oft die Bezeichnung „winged helix“-Domäne verwendet wird. Zusätzlich besitzen die Fox-Proteine eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (Clark et al., 1993; Glauser et a., 2007; Tsai et al., 2007).
In der letzten Dekade wurden mehr als 100 Proteine der Fox-Transkriptionsfaktorfamilie identifiziert und ihre Beteiligung an Prozessen wie Embryonalentwicklung, Metabolismus und Regulation des Zellzyklus beschrieben (Burgering, 2008; Carlsson et al., 2002; Coffer et al., 2004). Zur Übersicht über die stetig wachsende Anzahl der Vertreter der Fox-Familie werden sie in Unterklassen von FoxA bis FoxQ zusammengefasst (Kaestner et al., 2000 ; Obsil und Obsilova, 2010).

Die Unterklasse der FoxO-Transkriptionsfaktoren wurde zum erstenmal in chromosomalen Translokationen menschlicher Tumore beschrieben. So können FoxO-Gene in

Rhabdomyosarkomen als Translokationspartner für PAX („paired box“) 3- und PAX7-Gene auftreten und zur Bildung von chimären Transkriptionsfaktoren beitragen (Davis et al., 1994; Galili et al., 1993).

FoxO-Proteine sind konserviert vom Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*; FoxO-Ortholog DAF-16) bis zu den Säugetieren, bei denen vier Isoformen unterschieden werden: FoxO1 (FKHR, *Forkhead in rhabdomyosarcoma*), FoxO3 (FKHRL1, *Forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1*), FoxO4 (AFX, *ALL1-fused-gene from chromosome-X*) und FoxO6 (Calnan et al., 2008; Ogg et al., 1997; Woods et al., 2002). FoxO1, FoxO3 und FoxO4 werden ubiquitär exprimiert, wobei das Ausmaß der Expression der jeweiligen FoxO-Proteine je nach Zelltyp und Organ stark variieren kann. So wird FoxO1 in hohem Maße im Fettgewebe, FoxO3 im Herz und FoxO4 in Muskelzellen exprimiert (Furuyama et al., 2000). Die Expression von FoxO6 wurde im sich entwickelnden und adulten Zentralnervensystem der Maus beschrieben und mit einem funktionsfähigen neuronalen Netzwerk in Verbindung gebracht (Jacobs et al., 2003).

1.4 Regulation der Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren

1.4.1 Regulation der Expression des FoxO-Gens

Die Regulation der Expression der FoxO-Gene ist bisher nur in Ansätzen untersucht worden. Dennoch erweitert sich stetig die Anzahl identifizierter Transkriptionsfaktoren und äußerer Stimuli, die einen regulatorischen Effekt auf die Genexpression der FoxO-Faktoren ausüben.

So konnten FoxO1 und FoxO3 als Zielgene des Transkriptionsfaktors E2F-1 („E2 promotor binding factor“) identifiziert werden, welcher in der Regulation von Apoptose und Zellwachstum involviert ist (Nowak et al., 2007). Offensichtlich wird die Genexpression der FoxO-Proteine auch von Vertretern der Fox-Transkriptionsfaktorfamilie selbst kontrolliert. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfakor FoxA2 am FoxO1-Promotor der Ratte bindet und die Genexpression von FoxO1 induziert (Chen et al., 2011). Ebenso wurde eine FoxC1-abhängige Regulation der FoxO1-Genxpression *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Berry et al., 2008). In einer weiteren Studie konnte die Repression der FoxO1- und FoxO3-Expression auf mRNA-Ebene durch die Wachstumsfaktoren PDGF („platelet-derived growth factor“) und IGF-1 („insulin-like growth factor 1“) in humanen Fibroblasten nachgewiesen werden. Zudem wurde eine gesteigerte FoxO1- und FoxO4-

Expression durch Aktivierung von FoxO3 gezeigt. Es wird angenommen, dass PDGF und IGF-1 durch Inaktivierung von FoxO3 einen positiven Rückkopplungsmechanismus inhibieren, bei dem FoxO3 und möglicherweise auch weitere FoxO-Faktoren als Induktor der FoxO-Genexpression agieren (Essaghir et al., 2009). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung erhöhter FoxO1-mRNA-Spiegel bei bestehender Insulinresistenz von Patienten mit NAFLD („non alcoholic fatty liver disease“) (Valenti et al., 2008).

1.4.2 Posttranslationale Modifikation

Die Aktivität der FoxO-Transkriptionsfaktoren wird durch eine Vielzahl von Stimuli kontrolliert. Dazu gehören Insulin, der Energiestatus der Zelle, Spurenelemente und oxidativer Stress. Diese äußeren Faktoren induzieren posttranslationale Modifikationen (PTM) der FoxO-Proteine, wodurch ihre subzelluläre Lokalisation und transkripitionelle Aktivität reguliert wird. Zu den PTM gehören Phosphorylierungen, Acetylierungen, Mono- und Polyubiquitinierungen und möglicherweise weitere noch nicht bekannte Modifikationen (Calnan and Brunet; 2008).

FoxO-Proteine befinden sich im aktivierten Zustand im Zellkern und üben ihre transkriptionelle Aktivität im Promotorbereich von Zielgenen aus. Die über PI3K aktivierte Akt transloziert in den Zellkern und phosphoryliert FoxO1, FoxO3 und FoxO4 an jeweils drei spezifischen Phosphorylierungsstellen. Diese Stellen sind jeweils im N-terminalen Bereich, in der Forkhead-Domäne und im C-terminalen Abschnitt lokalisiert (van der Heide et al., 2005). Die Phosphorylierungen führen zur Bindung des Chaperonproteins 14-3-3 und zur Inaktivierung und Translokation der FoxO-Faktoren vom Zellkern ins Zytoplasma (Rinner et al., 2007; Zhao et al., 2003). Offensichtlich ist bereits die Besetzung von zwei der drei Phosphorylierungsstellen bei FoxO3 (Thr-32; Ser-253) entscheidend für den Export aus dem Zellkern (Brunet et al., 1999). Die Bindung von 14-3-3 an phosphorylierte FoxO-Faktoren führt zur Freilegung einer Kernexportsequenz (NES; „nuclear export sequence“). Parallel dazu wird ein Kernlokalisationssignal (NLS; „nuclear localization signal“) maskiert, wodurch der Re-Import unterbunden wird (Brunet et al., 2002; Zhao et al., 2003). Eine Ausnahme bildet FoxO6, welches nur zwei Akt-Phosphorylierungsstellen besitzt und zumeist nuklear lokalisiert ist (Jacobs et al, 2003). Trotz Fehlens der C-terminalen Akt-Phosphorylierungsstelle kann die transkriptionelle Aktivität von FoxO6 über

Phosphorylierung unabhängig von der Translokation ins Zytosol reguliert werden (van der Heide et al., 2005).

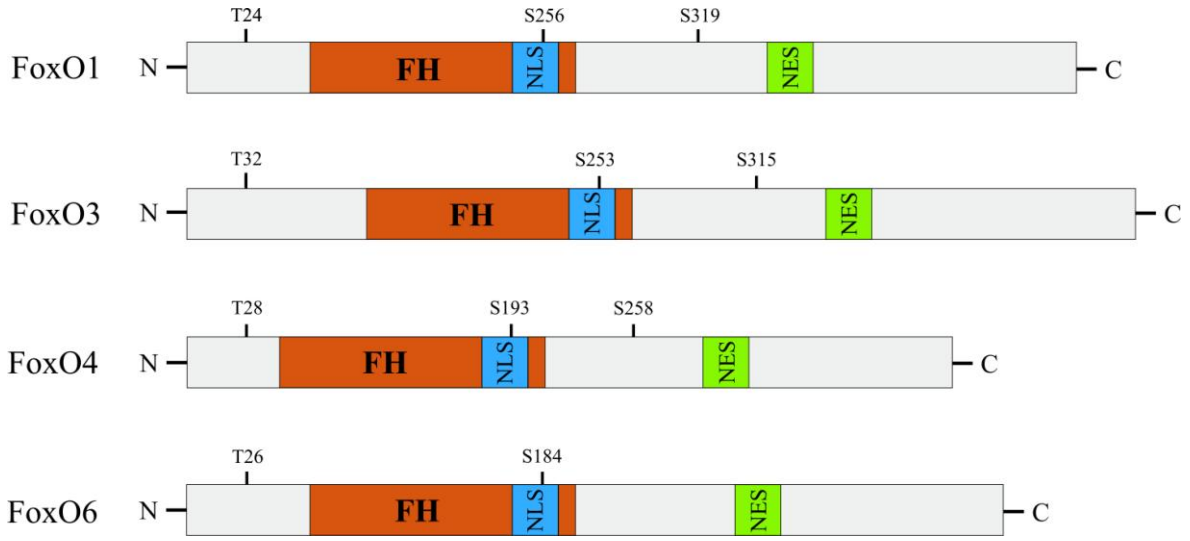

Abb. 1.2: Aufbau und Akt-Phosphorylierungsstellen von FoxO-Proteinen
FoxO-Transkriptionsfaktoren weisen die charakteristische Forkhead-Domäne (FH) zur Bindung an Promotorsequenzen von Zielgenen auf. Zudem besitzen sie eine Kernlokalisations- und eine Kernexportsequenz (NLS, „nuclear localization signal"; NES, „nuclear export sequence"), die an der Regulation der subzellulären Translokation beteiligt sind. Die Buchstaben und Zahlen über den einzelnen FoxO-Faktoren repräsentieren die Aminosäuren und Positionen der Akt-Phosphorylierungsstellen. N (N-terminal); C (C-terminal). Abbildung modifiziert nach Greer und Brunet (2005).

Eine irreversible Form der Regulation findet über den Abbau der FoxO-Transkriptionsfaktoren statt. Die durch Insulin und durch andere Wachstumsfaktoren induzierte Aktivierung der Akt und der daraus resultierende Export der inaktivierten FoxO-Proteine aus dem Zellkern führt zu deren proteasomaler Degradation (Plas und Thompson, 2003). So wird FoxO1, katalysiert durch eine E3-Ubiquitinligase, im Zytoplasma polyubiquitiniert und in Folge dessen am 26S-Proteasom abgebaut (Aoki et al., 2004; Matsuzaki et al., 2003). Dabei konnte eine Schlüsselrolle für Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2), einer Untereinheit des E3-Ubiquitinligasekomplexes SCF („Skp1/Cul1/F-box"), gezeigt werden. Skp2 fördert die ubiquitinabhängige proteasomale Degradation von FoxO1, wobei die Skp2-Aktivität eine Akt-spezifische Phosphorylierung von FoxO 1 an Ser-256 voraussetzt (Huang et al., 2005).

Neben Wachstumsfaktoren wie Insulin führt auch die bereits beschriebene Aktivierung der PI3K/Akt-Kaskade durch Cu(II) oder Zn(II) zur Phosphorylierung von FoxO1 und FoxO4.

Zudem konnte eine durch Cu(II)- und Zn(II)-induzierte Translokation von FoxO1 aus dem Zellkern ins Zytoplasma beobachtet werden (Walter et al., 2006).

Zusätzlich sind neben der Akt weitere Kinasen in der Lage, FoxO-Proteine direkt zu phosphorylieren. Die durch AMP aktivierte Proteinkinase AMPK kontrolliert metabolische Vorgänge in Abhängigkeit des Energiestatus der Zelle und wird durch ein gesteigertes AMP/ATP-Verhältnis stimuliert. AMPK phosphoryliert FoxO3 an sechs Stellen, wobei die Phosphorylierung zur Aktivierung der transkriptionellen Aktivität führt und keinen Einfluss auf die Translokation zeigt (Greer et al., 2007).

FoxO-Proteine spielen eine zentrale Rolle bei der Abwehr von ROS-induzierten Zellschädigungen. Oxidativer Stress ist ein Hauptregulator der FoxO-Proteine und induziert über eine Vielzahl verschiedener Signalwege unterschiedliche PTM. So bewirkt oxidativer Stress in Säugerzellen die Translokation inaktivierter FoxO3-Proteine aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo sie Proteinkomplexe mit der Deacetylase SIRT1 bilden. Die Deacetylierung von FoxO3 führt zur Aktivierung und zu gesteigerter Expression von DNA-Reparatur- und Zellarrestgenen unter gleichzeitiger Repression FoxO3-abhängiger Apoptose (Brunet et al., 2004). JNK („C-Jun N-terminal kinase“) ist eine stressinduzierte Proteinkinase, deren Aktivität durch ROS stimuliert wird (Chen et al., 2001). Bereits bei niedrigen Konzentrationen von H_2O_2 wird JNK in Säugerzellen aktiviert und phosphoryliert FoxO4 an Thr-447 und Thr-451. Dies hat die Translokation von FoxO4 aus dem Zytoplasma in den Zellkern zur Folge, wodurch eine erhöhte Expression antioxidativer Zielgene erfolgt. Im Gegensatz dazu bewirken höhere Konzentrationen H_2O_2 und Wachstumsfaktoren wie Insulin eine starke Stimulation der Akt, welche die JNK-Aktivität überlagern kann und wie bereits beschrieben den Export der FoxO-Faktoren ins Zytosol vermittelt (Essers et al., 2004). Weiterhin wurde beschrieben, dass FoxO3 und FoxO4 unter oxidativem Stress an die Deubiquitinase USP7/HAUSP („herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease“) binden, welche in der Folge deren Mono-Ubiquitinierung katalysiert. Dies führt wiederum zur Re-Lokalisation der FoxO-Proteine in den Zellkern und zur Aktivierung FoxO-abhängiger Genexpression (van der Horst et al., 2006).

Die Lokalisation und die damit verbundene transkriptionelle Aktivität der FoxO-Transkriptionsfaktoren wird je nach Stimulus sowohl negativ als auch positiv über PTM reguliert. Welcher Signalweg einen anderen überlagert und seine Wirkung auf die FoxO-Proteine entfaltet, hängt dabei offensichtlich von der Art und Intensität des Stimulus ab (Essers et al., 2004).

1.5 Zielgene und zelluläre Funktionen der FoxO Proteine

FoxO-Proteine sind Tumorsuppressoren und sind an der Regulation von Zellwachstum, Apoptose und Energiemetabolismus beteiligt (Barthel et al., 2005; Brunet et al., 1999). Zudem werden ihnen Schlüsselfunktionen in der Abwehr gegen oxidativen Stress und in der Reparatur durch ROS geschädigter DNA zugeschrieben (Kops et al., 2002; Nemoto und Finkel, 2002; Tran et al., 2002; Walter et al., 2008). Die Vielfalt der zellulären Funktionen der FoxO-Transkriptionsfaktorden basiert auf der Vielzahl ihrer Zielgene. Die Genexpression dieser Zielgene wird durch die Bindung der FoxO-Proteine an DBE („DAF-16 binding element"; (5'-GTAAACA-3')) und IRE („insulin-responsive element"; [5'-CAAAA(T/C)A-3'])-Motive in den Promoterregionen induziert, wobei in vitro eine stärkere Affinität zu DBE-Sequenzen nachgewiesen werden konnte (Furuyama et al., 2000). Da sich DBE- und IRE-Motive nur in zwei Basen voneinander unterscheiden (Furuyama et al., 2000), ergibt sich die Konsensus-Sequenz [5'-(C/G)(A/T)AAA(C/A)A-3'] als DNA-Bindestelle für FoxO-Faktoren (Barthel et al., 2005).

Die tumorsuppressiven Funktionen der FoxO-Proteine werden über deren regulatorischen Einfluss auf die Genexpression im Zellzyklus involvierter Proteine vermittelt. FoxO-Faktoren induzieren einen Arrest in der postmitotischen G1-Phase des Zyklus von proliferierenden Zellen. Dies geschieht durch Stimulation der Genexpression von Zellzyklus-Inhibitoren sowie Repression von Zyklus-Aktivatoren. Zielgene der FoxO-Proteine sind dabei unter anderem der Cdk („ Cyclin-dependent kinase") Inhibitor $p27^{kip1}$ (Kinaseinhibitorprotein p27) und die Zellzyklus-Aktivatoren Cyclin D1 und D2 (Medema et al., 2000; Schmidt et al., 2002).
Ein weiterer Funktionsbereich der FoxO-Proteine ist die Induktion des programmierten Zelltods. So konnte das proapoptotische Protein BIM („Bcl-2 interacting mediator of cell death") als Zielgen von FoxO1 identifiziert werden, welches durch Bindung an „Zellüberlebensfaktoren" der Bcl-2 („B-cell lymphoma 2")-Familie deren Funktion inhibiert und die Apoptose einleitet (Dijkers et al., 2000). Zudem stimuliert FoxO1 die Genxpression des Zytokins FasL (Fas-Ligand), welches ebenfalls Apoptose induziert (Brunet et al., 1999).
Insulin kontrolliert die hepatische Glukoseproduktion über PI3K/Akt- und FoxO-abhängige Genexpression von Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) und Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK). Sowohl G6Pase, die die Dephosphorylierung von Glukose-6-Phosphat zu Glukose katalysiert, und PEPCK sind Enzyme der Glukoneogenese und wurden als Zielgene von FoxO-Faktoren beschrieben (Nakae et al., 2001; Schmoll et al., 2000). Somit

bewirkt die Insulin-induzierte Inaktivierung der FoxO-Proteine die Repression der hepatischen Glukoseproduktion über Hemmung der G6Pase- und PEPCK-Expression.
FoxO-Transkriptionsfaktoren sind auch bei der Abwehr von ROS von zentraler Bedeutung und induzieren die Genexpression antioxidativ wirkender Enzyme wie Mangan (Mn)-SOD und Katalase (CAT) (Kops et al., 2002; Nemoto und Finkel, 2002). Zudem konnte die Kontrolle der Expression von GADD45 („growth arrest and DNA damage 45“) durch FoxO Proteine nachgewiesen werden, welches in der Reparatur durch ROS geschädigter DNA involviert ist (Tran et al., 2002). Desweiteren wurde das antioxidative Plasmaprotein Selenoprotein P (SeP) als Zielgen von FoxO1 identifiziert (Walter et al., 2008). SeP wird hauptsächlich von der Leber synthetisiert und dient als Transporter des Spurenelements Selen von der Leber zu extrahepatischen Geweben. Seinen schützenden Effekt gegen ROS vermittelt SeP, indem es die Genexpression und die enzymatische Aktivität von antioxidativen Selenoproteinen wie Glutathionperoxidase (GPx) induziert (Steinbrenner et al., 2006). Demnach bewirkt Insulin die negative Regulation der Genexpression von Antioxidantien durch PI3K/Akt-vermittelte Inaktivierung der FoxO-Faktoren. Im Umkehrschluss sollte eingeschränkte Kalorienzufuhr zu gesteigerter Resistenz gegen oxidativen Stress durch Stimulation der FoxO-abhängigen Synthese antioxidativ wirkender Proteine führen und wird mit einer verlängerten Lebenszeit assoziiert (Honda und Honda, 2002; Kenyon, 2005).

Innerhalb ihres breiten Aktionsfeldes zeigen die verschiedenen FoxO-Proteine sowohl unterschiedliche als auch sich überschneidende Funktionen *in vivo* (Greer und Brunet, 2005). So weisen FoxO1-defiziente Mäuse eine gestörte Angiogenese auf und sterben am elften Tag der Embryonalentwicklung (Furuyama et al., 2004; Hosaka et al., 2004). FoxO3- und FoxO4-„Knockout“-Mäuse sind hingegen lebensfähig, wobei weibliche FoxO3-defiziente Mäuse neben anderen Defekten einen infertilen Phänotyp aufweisen (Castrillon et al., 2003). Dies zeigt, dass sich FoxO-Faktoren in Säugetieren funktionell unterscheiden können und unterschiedliche physiologische Rollen wahrnehmen (Arden, 2008).
Einen Hinweis für funktionelle Überschneidungen zwischen den FoxO-Proteinen lieferte ein konditionales FoxO1$^{-/-}$-, FoxO3$^{-/-}$- und FoxO4$^{-/-}$-„Knockout“-Mausmodell, welches diverse Tumorbildungen aufwies (Paik et al., 2007). Das Ausschalten von zweien der drei FoxO-Gene in allen möglichen Kombinationen führte stets zu einem gemilderten Phänotyp, was auf die kompensatorische Wirkung der FoxO-Faktoren zurück zuführen war (Paik et al., 2007). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der FoxO1$^{-/-}$/FoxO3$^{-/-}$/FoxO4$^{-/-}$-„Triple-Knockout“ den

hepatischen Glukosemetabolismus der Maus stärker beeinflußt als der FoxO1$^{-/-}$-„Single-Knockout“. Offensichtlich ist das funktionelle Zusammenspiel der verschiedenen FoxO-Faktoren Grundlage für die kontrollierte Regulation des Glukosemetabolismus (Haeusler et al., 2010).

Spezifische FoxO-Funktionen werden möglicherweise über ihre Interaktion mit diversen Ko-Faktoren reguliert (Burgering, 2008). Unter oxidativem Stress bindet das Protein ß-Catenin an FoxO4, wodurch die Genexpression des FoxO-Zielgens p27^{kip1} gesteigert wird. Dies führt zu vermehrtem G1-Zellzyklusarrest und antagonisiert die ß-Catenin/TCF („T-cell factor“) Interaktion, welche das Zellwachstum stimuliert und mit Tumorentwicklung assoziiert wird (Essers et al., 2005; van der Vos und Coffer, 2008).
Ein weiterer Ko-Faktor der FoxO-Proteine ist PGC1α („peroxisome proliferator acivated receptor-γ co-activator 1“). PGC1α bindet und ko-aktiviert FoxO1, wodurch die Genexpression von G6Pase und damit die hepatische Glukoseproduktion induziert wird (Puigserver et al., 2003). Zudem konnte eine Interaktion zwischen PGC1α und FoxO1 bei der transkriptionellen Regulation des hepatischen Plasmaproteins SeP nachgewiesen werden (Speckmann et al., 2008).
FoxO Proteine üben nicht nur positive Effekte auf Genexpression aus, sondern können auch inhibierend wirken. So konnte gezeigt werden, dass FoxO1 mit der DNA-bindenden Domäne des Transkriptionsfaktors HNF-4 („heptocyte nuclear factor-4“) physikalisch interagiert und so dessen transkriptionelle Aktivität reprimiert (Hirota et al., 2003).

1.6 Fettleibigkeit und Insulinresistenz

Patienten mit Typ 2-Diabetes mellitus (T2DM) sind durch eine erhöhte hepatische Glukoseproduktion und eine auch daraus resultierende Hyperglykämie charakterisiert. Dieser Zustand wird über eine Insulinresistenz vermittelt, welche eine gestörte Repression der hepatischen Glukoseproduktion und zugleich eine verminderte Aufnahme von Glukose aus dem Blut in Fett- und Muskelzellen zur Folge hat (Fery, 1994). Ein weiteres Merkmal für T2DM ist eine gesteigerte G6Pase-Aktivität und eine erhöhte Konzentration freier Fettsäuren durch vermehrte Lipolyse (Clore et al., 2000; Paquot et al., 2001).

Insulinresistenz beschreibt die Desensitivierung von Zielgeweben wie Adipozyten, Hepatozyten und Muskelzellen in Bezug auf die Insulin-induzierte Signalübertragung. Fettleibigkeit ist ein bekannter Risikofaktor für die Entstehung solch einer Resistenz und ein dysregulierter PI3K/Akt-Signalweg ist dabei von zentraler Bedeutung (Kahn und Flier, 2000; Lizcano und Alessi, 2002). Ein Aspekt ist offenbar die bei Fettleibigkeit gesteigerte Expression und Aktivität verschiedener PTPasen wie PTP1B (s. Kap. 1.2), welche die Insulin-induzierte Signalübertragung durch Dephosphorylierungen inhibieren (Goldstein et al., 1998; Kahn und Flier, 2000; Klaman et al., 2000). Zudem wurde eine deutliche Verminderung der Insulin-induzierten Aktivierung der RTK und der PI3K in Muskelzellen von fettleibigen Menschen beschrieben. Begleitet wurden diese Defekte von einer stark eingeschränkten Aufnahme von Glukose aus dem Blut (Goodyear et al., 1995).

Fettleibigkeit führt im Rahmen einer breiten inflammatorischen Antwort zu vermehrter Produktion und Sekretion von Hormonen, Zytokinen und freien Fettsäuren in Adipozyten (Kahn und Flier, 2000; Wellen und Hotamisligil, 2005). Die in großen Mengen sekretierten Signalmoleküle beeinflussen die Sensitivität der Zellen gegenüber Insulin negativ. So konnte gezeigt werden, dass das Zytokin TNF-α („Tumor necrosis factor-α“) Insulinresistenz induziert, indem es IRS-1 durch Serinphosphorylierung inhibiert. IRS-1 wirkt daraufhin als Inhibitor der RTK-Aktivität (Hotamisligil et al., 1996). Auch Substrate der Adipozyten wie freie Fettsäuren tragen zur Entwicklung einer Insulinresistenz bei. Erhöhte ß-Oxidation gesättigter Fettsäuren in den Mitochondrien führte in Rattenleberzellen zu gesteigerter Bildung von ROS *in vitro*. Die Blockade des Insulinsignals erfolgte offenbar über ROS-induzierte Aktivierung der JNK, welche die Insulin-stimulierte Tyrosinphosphorylierung von IRS-2 und Serinphosphorylierung der Akt inhibierte (Nakamura et al., 2009).

Einer durch Insulinresistenz hervorgerufenen Hyperglykämie kann therapeutisch durch die Verabreichung von Metformin entgegen gewirkt werden. Metformin ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Biguanid-Derivate und ist in der Lage, den Blutzuckerspiegel durch Repression der hepatischen Glukoseproduktion zu senken. Dabei reduziert es die Genexpression von G6Pase unabhängig von Insulin-induzierten Signalwegen (Morioka et al., 2005). AICAR (Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleosid) ist ein Aktivator der AMPK und übt „insulinmimetische“ Effekte auf die Expression der G6Pase aus (Lochhead et al., 2000). Auch Metformin konnte als Stimulator der AMPK identifiziert werden. Daher wird angenommen, dass diese Kinase die von Metformin-induzierter Hemmung der hepatischen Glukoseproduktion vermittelt (Zhou et al., 2001).

1.7 Coeruloplasmin

Ceoruloplasmin (Cp) gehört zur Familie der Multikupferoxidasen und ist ein Plasmaprotein von 132 kDa. Es wird hauptsächlich von Hepatozyten synthetisiert und trägt mehr als 95% des Kupfers im Blut (Nittis und Gitlin, 2002). Zudem konnte im Zentralnervensystem von Säugetieren eine Isoform von Cp identifiziert werden, welche von Astrozyten exprimiert wird und über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker auf der Zelloberfläche dieser Zellen fixiert ist (Patel und David, 1997). Das Metalloenzym Cp besitzt drei distinkte einfachbesetzte Typ-1 (T1) Kupferstellen und einen „Kupfercluster“, bestehend aus einer einfachbesetzten Typ-2 (T2) und einer doppeltbesetzten Typ-3 (T3) Kupferstelle. Zudem wurde in einigen Studien ein siebtes Kupferion auf der Proteinoberfläche nachgewiesen (Shukla et al., 2006). Diese Struktur ermöglicht die Katalyse der Vier-Elektronen-Reduktion von O_2 zu H_2O am „T2/T3-Cluster“ durch einfache Oxidation von Substraten an einer T1-Kupferstelle. Die enzymatische Aktiviät von Cp basiert auf intramolekularem Elektronentransfer und erfolgt ohne gleichzeitige Bildung von ROS (Bielli und Calabrese, 2002). Die Inkorporation der 6-7 Kupferionen erfolgt während der Cp-Synthese im sekretorischen Weg und ist die Vorraussetzung für ein stabiles Protein mit enzymatischer Aktivität (Gitlin et al., 1992; Hellman et al., 2002). Infektions- oder Entzündungsreaktionen führen zu gesteigerten Cp-Spiegeln im Serum, da inflammatorische Zytokine die hepatische Genexpression des Akutephaseproteins Cp induzieren (Gitlin, 1988).

Hinsichtlich der physiologischen Funktion von Cp wurden sowohl antioxidative als auch prooxidative Eigenschaften beschrieben (Shukla et al., 2006). Einerseits ist Cp durch seine Aktivität als Ferroxidase von zentraler Bedeutung für die Eisenhomöostase, indem es die Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) katalysiert. Im Gegensatz zu Fe(II) besitzt Fe(III) eine hohe Affinität zum Eisentransporter Transferrin und kann so aus zellulären Speichern über die Blutbahn zu Geweben und Organen befördert werden. Gleichzeitig wird die Beteiligung von Fe(II) an Fenton-Typ-Reaktionen verhindert, bei denen reaktive $^{\cdot}OH$ und $^{\cdot}OR$ entstehen (Atanasiu et al., 1998; Hellman und Gitlin, 2002). Mutationen im Cp-Gen, die eine fehlerhafte Expression und folglich eine Defizienz von Cp im Serum bedeuten, führen zu Acoeruloplasminämie. Diese Krankheit ist charakterisiert durch einen gestörten Eisenstoffwechsel und die daraus resultierende pathologische Ansammlung von Eisen im Gehirn und viszeralen Organen (Harris et al., 1995; Hellman und Gitlin, 2002).

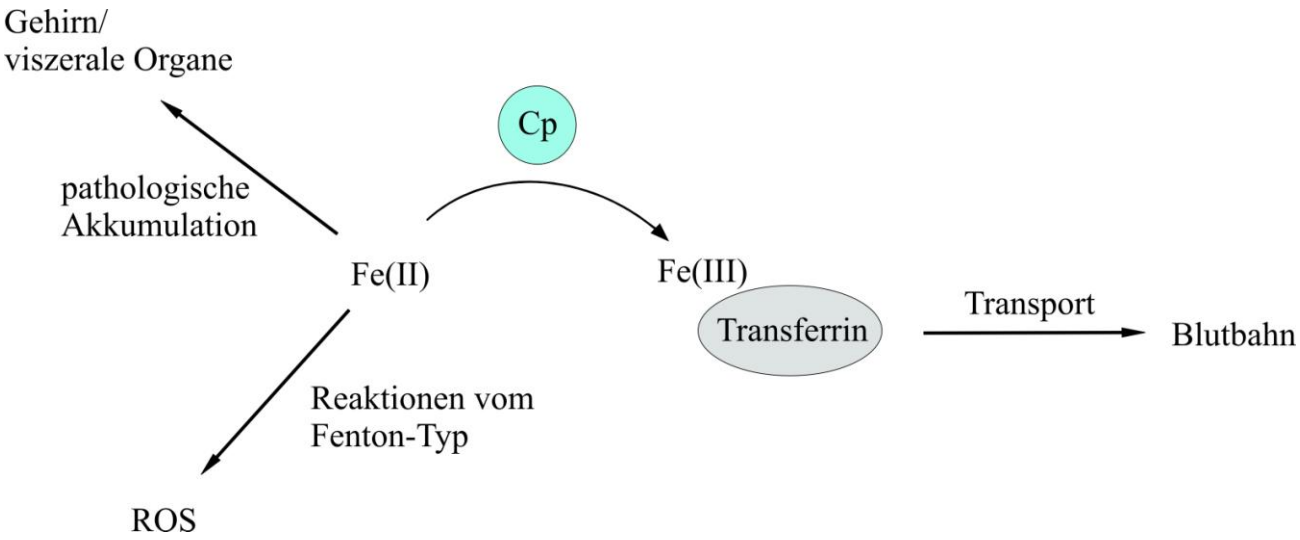

Abb.1.3: Schematische Darstellung der Ferroxidase-Aktivität von Cp
Cp katalysiert die Oxidation von Fe(II) zu Fe(III), welches an Transferrin bindet und über die Blutbahn abtransportiert wird. Nicht-oxidiertes Fe(II) lagert sich im Gehirn und viszeralen Organen an und bildet ROS über die Beteiligung an Reaktionen vom Fenton-Typ.

Auf der anderen Seite vermittelt Cp als Prooxidans auch pathologische Effekte. So konnte gezeigt werden, dass Cp *in vitro* über ein auf der Proteinoberfläche gebundenes und redoxaktives Kupferion die Oxidation von LDL („low density protein“) induziert (Ehrenwald et al., 1994; Mukhopadhyay et al., 1997). Oxidiertes LDL (OxLDL) ist als Aktivator vaskulärer Zellkomponenten an der Entstehung arteriosklerotischer Prozesse beteiligt (Kita et al., 2006). Interessanterweise wird der OxLDL-vermittelte proarteriosklerotische Effekt durch hohe Glukosekonzentrationen im Blut verstärkt, was auf eine Verbindung zwischen prooxidativen Effekten von Cp und Arteriosklerose bei Diabetes mellitus schließen läßt (Leoni et al., 2001). Weiterhin wurde beschrieben, dass H_2O_2 die Fragmentierung von Cp und in Folge dessen die Abgabe von gebundenen Kupferionen induziert. Diese freien Kupferionen generieren $^{\cdot}OH$ in Fenton-Typ-Reaktionen, wodurch die prooxidativen Prozesse weiter potenziert werden (Choi et al., 2000).

1.8 Fragestellungen

Cp und SeP zeigen einige Gemeinsamkeiten in Bezug auf Herkunft und Funktion. Beide sind Spurenelemente enthaltende Plasmaproteine, die von der Leber synthetisiert und sekretiert werden. Zudem weisen beide antioxidative Aktivität auf und sind an der Abwehr von oxidativem Stress beteiligt. Die Expression des SeP wird wie die des Glukoneogenese-Enzyms G6Pase über den Insulin-induzierten PI3K/Akt/FoxO-Signalweg reguliert.

Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden,

i) ob die hepatische Expression von Cp durch Insulin kontrolliert wird und ob die PI3K/Akt/FoxO-Signalkaskade bei dieser Regulation involviert ist.

ii) welche Auswirkungen eine durch Hochfett-Ernährung induzierte hepatische Insulinresistenz auf Cp-Genexpression, Cp-Spiegel im Serum und oxidativen Stress im Mausmodell hat.

iii) ob das Antidiabetikum Metformin die hepatische Cp-Bildung beeinflusst.

Von den Ergebnissen dieser Untersuchungen erwarten wir einen tieferen Einblick in die Insulin-induzierte Regulation der hepatischen Bildung antioxidativer Plasmaproteine. Möglicherweise ist Cp neben SeP ein weiteres von der Leber sekretiertes Protein, dessen Synthese über die PI3K/Akt/FoxO-Kaskade kontrolliert wird. Dies wäre ein weiterer Hinweis auf einen systemischen Einfluss von Insulin auf die Abwehr gegen oxidativen Stress. Zudem ergeben sich durch die Identifizierung weiterer Insulin-regulierter Plasmaproteine neue Möglichkeiten zur Charakterisierung von Biomarkern hinsichtlich Insulinresistenz und daraus resultierender Krankheiten wie T2DM.

2. Material und Methoden

Die verwendeten Materialen und Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Verwendete Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer MilliQ-Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt und gegebenenfalls autoklaviert oder mit einem Membranfilter sterilfiltriert (Millipore, Eschborn). Die Verbrauchsmaterialien der Zellkultur waren Produkte der Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen).

2.1 Zellkultur

2.1.1 Stammhaltung und Anzucht eukaryontischer Zellen

H4II3-C3-Rattenhepatomzellen sowie humane HepG2- und Huh7-Hepatomzellen wurden in DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s Medium; PAA, Pasching, Österreich) mit 4,5 g/L Glukose, 10% (v/v) FCS (fötales Kälberserum; PAA), 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (PAA) und 1% Pen/Strep (PAA; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; PAA) (Komplettmedium) kultiviert. FKHR-ER-CC-Zellen wurden in Komplettmedium mit 2 µg/ml Blasticidin S (Invivo Gen, San Diego, USA) zur Selektion gehalten. In Abwesenheit von FCS wurde dieses Komplettmedium im weiteren Verlauf der Arbeit als serumfreies Medium bezeichnet. Primäre Rattenhepatozyten wurden in Williams' Medium E (Invitrogen) mit 2 mM Glutamax, 1% Penicillin/Streptomycin, 5% (v/v) FCS, 100 nM Insulin und 100 nM Dexamethason (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) kultiviert. Alle verwendeten Zelllinien wurden bei einer wasserdampfgesättigten, 37°C warmen Atmosphäre mit 5% (v/v) Kohlendioxid herangezogen und sind zur Übersicht in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Zur Passage und zum Ausbringen in Zellkulturschalen wurden die Zellen bei einer 80-90%igen Konfluenz nach Entfernung des Mediums mit PBS (2,6 mM KCl; 1,4 mM KH_2PO_4; 137 mM NaCl; 6,4 mM Na_2HPO_4; pH 7,4; PAA) gewaschen und in Trypsin-EDTA-Lösung in PBS (0,5 g/L Trypsin; PAA) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach etwa 5 min durch Zugabe von Komplettmedium gestoppt, die

Zellen resuspendiert und anschließend in entsprechender Verdünnung in Zellkulturflaschen oder -schalen überführt.

Tabelle 2.1: Herkunft und Beschreibung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft/Referenz
H4IIE-C3	H4IIE-C3 Rattenhepatomzellen aus einem H35-Reuber-Hepatom	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC No.: 85061112) Freundlicherweise von PD Dr. A. Barthel (BG Kliniken Bergmannsheil, Bochum) zur Verfügung gestellt
FKHR-ER-CC	H4IIE-C3 Rattenhepatomzellen, stabil transfiziert mit einem FoxO1-Östrogenrezeptor-Konstrukt	Freundlicherweise von PD Dr. A. Barthel (Bochum) zur Verfügung gestellt (Barthel et al., 2002)
Primäre Rattenhepatozyten	Isolierte Leberzellen aus männlichen Wistar-Ratten	Freundlicherweise von Herrn PD Dr. Roland Reinehr (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie) zur Verfügung gestellt
HepG2	Humane Hepatomzellen aus einem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom eines 15 jährigen kaukasischen Jungen	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC No.: 85011430) Freundlicherweise von Prof. Dr. J. Bode (Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt
Huh7	Humane Heptomzellen	Freundlicherweise von Dr. Verena Keitel (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie) zur Verfügung gestellt

2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellsuspension einer zu 80-90% konfluenten 175 cm^2-Kulturflasche wurde nach dem Abstoppen der Trypsinierung (s.o.) zentrifugiert und das Zellpellet in 3 ml Einfriermedium (Komplettmedium mit 20% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Darauf folgte die Überführung von je 1 ml Zellsuspension in ein Kryoröhrchen (Greiner) und das schnelle Einfrieren bei -80ºC. Zum Auftauen von Zellen wurden 30 ml Komplettmedium in eine 175 cm^2 Kulturflasche vorgelegt, die Zellen in der Hand kurz angewärmt und schnell in die vorbereitete Zellkulturflasche überführt. Bei Bedarf erfolgte ein Mediumswechsel nach 4 h, um Zellschäden durch DMSO zu verhindern.

2.1.3 Mykoplasmentest

Zur Überprüfung der verwendeten Zellen auf eventuelle Kontamination mit Mykoplasmen, welche die Eigenschaften der Zellen negativ beeinflussen, wurde in regelmäßigen Zeitabständen 1 ml Zellkulturüberstand abgenommen und mittels des VenorGeM Mykoplasmen-Nachweis-Kits (Minerva Biolabs, Berlin) nach Angaben des Herstellers analysiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen waren zu jeder Zeit gemäß Test mykoplasmenfrei.

2.2 Behandlung eukaryontischer Zellen

H4IIE-Rattenhepatomzellen sowie humane HepG2- und Huh7-Hepatomzellen wurden in 60 mm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80-90% in Komplettmedium herangezogen, mit PBS gewaschen und für 18 h bis 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Primäre Rattenhepatozyten wurden in Zellkulturschalen gleicher Größe bis zur beinahe Konfluenz in Williams' Medium E kultiviert, mit PBS gewaschen und je nach Experiment für 5 h oder 16 h in Williams' Medium E ohne jegliche Zusätze gehalten. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Behandlung der Zellen mit Insulin (Roche Biochemicals, Mannheim), $CuSO_4$, Metformin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), AICAR (Calbiochem, San Diego, USA) oder der entsprechenden Lösemittelkontrolle in unterschiedlichen Konzentrationen und Zeitspannen in serumfreiem Medium beziehungsweise Williams' Medium E ohne Zusätze

(primäre Rattenhepatozyten). FKHR-ER-CC-Rattenhepatomzellen wurden bis zur 80-90%igen Konfluenz in Komplettmedium supplementiert mit 2 µg/ml Blasticidin S in 60 mm Kulturschalen herangezogen, mit PBS gewaschen und für 18 h in serumfreiem 2 µg/ml Blasticidin S-haltigem Medium gehalten. Es folgte die Behandlung mit 1 µM 4-Hydrotamoxifen (Tx, Sigma)) für verschiedene Zeitspannen alleine oder in Anwesenheit von 100 nM Insulin in serumfreiem Medium ohne Blasticidin. Als Lösemittelkontrolle wurde Ethanol (EtOH) verwendet.

Zur Untersuchung involvierter Signalkaskaden wurden H4IIE-Rattenhepatomzellen mit den PI3K-Inhibitoren Wortmannin oder LY-294002 (beide Calbiochem) behandelt. Dazu wurden die 80-90% konfluenten Zellen für 30 min mit dem jeweiligen frisch angesetzten Inhibitor in entsprechender Konzentration oder der Lösemittelkontrolle DMSO in serumfreiem Medium präinkubiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte die eigentliche Behandlung der Zellen in An- oder Abwesenheit des jeweiligen Inhibitors.

Nach Behandlung der verschiedenen Zelllinien wurden die Überstande entfernt und bei Bedarf zur Analyse bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 100 µl-300 µl 2x Laemmlipuffer (0,125 M Tris/HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerol; 100 mM Dithiothreitol; 0,2% (w/v) Bromphenolblau) oder 0,5% SDS Lysispuffer (0,5% SDS) lysiert. Die Lysate wurden anschließend bei -20 °C weggefroren. Die Herstellung von RNA-Lysaten erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die 500 µl umfassenden RNA-Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.1 Neutralrot-Test zur Viabilitätsbestimmung

Über Neutralrot-Inkorporation wird die Viabilität behandelter Zellen kontrolliert, um mögliche zellschädigende Effekte einer applizierten Substanz zu untersuchen. Der fettlösliche Farbstoff Neutralrot wird in den Liposomen lebender Zellen eingelagert und ist somit ein Indikator für eine nicht-toxische Behandlung. Die in 6-Vertiefungs-Platten kultivierten H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden nach Behandlung mit unterschiedlichen $CuSO_4$-Konzentrationen (0,1-100 µM) mit PBS gewaschen und für 1 h mit 500 µl Neutralrot-Lösung (1:200 in serumfreiem Medium verdünnt; Sigma Aldrich, USA) pro Vertiefung bedeckt. Nach

Entfernung der Neutralrot-Lösung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter leichtem Schütteln bei RT für mindestens 4 h mit 1 ml Fixierlösung (50 ml Ethanol p.a.; 1 ml Essigsäure 100%; 49 ml dH_2O) pro well inkubiert. Die Extinktion (λ = 550 nm; Referenz: λ = 400 nm) wurde mit Hilfe des „Power Wave 340“ (BioTEK, Highland Park, USA) unter Verwendung der Software „Gen 5“ gemessen und in Relation zu den unbehandelten Zellen gesetzt. Die Fixierlösung diente dabei als Nullwert.

2.3 Transiente Transfektion von Zellen

2.3.1 Behandlung mit siRNA

H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden in ein einer Anzahl von 60.000 Zellen pro Schale mit Durchmesser von 60 mm ausgebracht und über Nacht in Komplettmedium kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und daraufhin mit 50 nM „small interference RNA“ (siRNA) für FoxO1 und FoxO3 oder in verschiedenen Kombinationen mit jeweils 30 nM siRNA für FoxO1, FoxO3 und FoxO4 in Opti-MEM (Invitrogen) transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurden 10 µl Oligofektamin (Invitrogen) pro Ansatz nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Zur Kontrolle wurden weitere Zellen äquimolar und in gleichen Zeitspannen mit „non-sense“-siRNA behandelt. Nach 18 h Transfektion wurden 1,5 ml Komplettmedium pro Kulturschale zugegeben. Die Zellen wurden nach weiteren 6 h zu Protein- oder RNA-Lysaten (s Kap. 2.2) verarbeitet oder für weitere 24 h mit 3 ml Komplettmedium inkubiert. Anschließend wurden auch hier Protein- oder RNA-Lysate hergestellt. Alle in dieser Arbeit verwendeten „On-Target plus“-siRNAs (Thermo Scientific Dharmacon, Colorado, USA) sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Zielsequenzen der verwendeten siRNAs

Gen	Zielsequenz 5’-3’	Genbank-Eintrag
FoxO1	CAGCAAGUUUAUUCGAGUA	NM_001191846.1
FoxO3	GCAGAACUCUAUAACGUAU	NM_001106395.1
FoxO4	GGAAUGUGGAUCAGGUUUA	NM_001106943.1

2.3.2 Überexpression der FoxO-Proteine

Zur transienten Transfektion von humanen HepG2-Hepatomzellen wurden diese in 60 mm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von etwa 50% in Komplettmedium kultiviert. Es folgte die Transfektion der Zellen mit 6 µg DNA des jeweiligen FoxO-Plasmids (Tab. 2.3) pro Schale unter Verwendung von 19,2 µl des Transfektionsreagenzes Nanofektin (PAA) in serumfreiem Medium nach Angaben des Herstellers. Zur Kontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor pcDNA 6.2/nLumio-DEST (Invitrogen) transfiziert. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 3,6 ml serumfreies Medium pro Kulturschale zugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen für 8 h mit 100 nM Insulin in serumfreiem Medium behandelt und anschließend Protein- oder RNA-Lysate (vgl. Kap. 2.2) angelegt.

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten FoxO-Plasmide

Gen	Plasmid	Referenz
FoxO1	FKHR cDNA in pcDNA6.2/nLumio-DEST; Resistenz: Amp	Die Klonierung der Fragmente in den Vektor pcDNA 6.2/nLumio-DEST wurde freundlicherweise von Elisabeth Sauerbier aus der AG Klotz durchgeführt
FoxO3	FoxO3 cDNA in pcDNA6.2/nLumio-DEST; Resistenz: Amp	
FoxO4	AFX cDNA in pcDNA6.2/nLumio-DEST; Resistenz: Amp	

2.4 Bakterienkultur

2.4.1 Anzucht der Bakterien

Das LB-Flüssigmedium wurde bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 200 kPa autoklaviert. Das hitzelabile Antibiotikum Ampicillin wurde vor Verwendung mit einem Membranfilter (Millipore, Eschborn) sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur unterhalb von 60 °C nachträglich zugesetzt.

LB-Flüssigmedium

10 g NaCl
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
ad 1000 ml dH_2O

Slant 50:50

5 g Trypton
2,5 g Hefeextrakt
ad 250 ml dH_2O
250 ml 96%-Glycerin

Die Anzucht der *E. coli*-One-shot-Top-10-Zellen, welche eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz aufwiesen, erfolgte unter Selektionsdruck bei 37°C. Dabei wurde mit einer Pipettenspitze ein Stück einer zuvor mit einem FoxO-Plasmid (vgl. Tab. 2.3) transformierten Gefrierkultur (vgl. Kap. 2.4.2) in ein Reagenzglas mit 5 ml Ampicillin-haltigem (100 µg/ml) LB-Medium überführt und auf einem Rundschüttler bei 250 UpM über Nacht inkubiert (Vorkultur). In einem Erlenmeyerkolben wurden 250 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium mit der Vorkultur angeimpft und wiederum auf einem Rundschüttler bei 250 UpM für 6-8 h bebrütet. Die Kulturen wurden zentrifugiert (4000 UpM, 15 min, 4°C), die Überstände vollständig entfernt und die Pellets bei -80°C gelagert.

2.4.2 Herstellung von *E. coli*-Gefrierkulturen

Zur Herstellung von Gefrierkulturen wurde die Vorkultur für 15 min bei 4000 UpM bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Slant 50:50 (vgl. Kap. 2.4.1) resuspendiert und in einem Kryogefäß bei -80 °C gelagert.

2.5 Gewebe

Die im Folgenden erläuterten Arbeitsschritte waren freundlicherweise von Herrn PD. Dr. Schubert und Frau Dr. Freude (Klinik II und Poliklinik für innere Medizin, Universität Köln) durchgeführt worden.

C57BL/6-Mäuse waren für 3 oder 6 Monate einer Standarddiät (5% Fettgehalt), Niedrigfett-Diät (15% Fettgehalt) oder Hochfett-Diät (30% Fettgehalt) unterzogen worden. Anschließend waren die Mäuse getötet und die Lebern sowie Blutproben entnommen worden. Die Blutzuckerspiegel waren unter Verwendung eines GlucoMen Elite (A. Menarini diagnostics, Neuss, Germany) gemessen worden und waren bei den für 6 Monate unter Hochfett-Diät gehaltenen Mäusen um etwa 40% relativ zu den Standard-Diät-Mäusen erhöht. Die Bestimmung der Insulinmengen war mit einem spezifischen Mausinsulin-ELISA (DRG Diagnostics, Marburg, Germany) durchgeführt worden und zeigte 10-fach erhöhte Insulinspiegel im Blut der Hochfett-Diät-Mäuse. Weiterhin waren eine Körpergewichtszunahme von etwa 40% und eine gesenkte Insulintoleranz bei den für 6 Monate mit hohen Fettkonzentrationen ernährten Mäusen relativ zu den Standard-Diät-Mäusen festgestellt worden. Zur Messung der Insulintoleranz war über Nacht ausgehungerten Mäusen 0,75 U/kg Körpergewicht menschliches Insulin (NovoNordisk) in den Peritonealraum injiziert worden und der Blutzuckerspiegel in kurzen Zeitabständen vor und nach der Injektion bestimmt worden. Die Lebern und Serumproben dieser Mäuse sind uns dankenswerterweise für weitere Analysen zur Verfügung gestellt worden.

2.6 Analyse von Proteinen

2.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die kolorimetrische Methode nach Bradford zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des Coomassie-Farbstoffs „Roti-Quant“ (Roth, Karlsruhe) durchgeführt. 1 µl Proteinlösung wurde mit 799 µl dH_2O in einer Einmalküvette (Sarstedt, Nümbrecht) versetzt und anschließend 200 µl des Farbstoffs zu pipettiert. Die Lösung wurde gut durchmischt und für eine kurze Dauer von 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin konnte die

Absorption bei 595 nm in einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen und anhand einer BSA-Eichgeraden die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.6.2 Protein-Quantifizierung mittels BCA-Reaktion

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Reaktion („bicinchoninic acid assay“) wurde mit dem „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wird Cu(II) in Anwesenheit von Proteinen zu Cu(I) reduziert und verursacht in Verbindung mit Bicinchoninsäure einen Farbumschlag der Lösung von grün nach violett. 200 µl des Reaktionsmixes wurden in 96-well-Platten vorgelegt und mit 3-10 µl Proteinprobe versetzt (Doppelbestimmung). Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei 37ºC im Wasserbad und die anschließende photometrische Auswertung mit Hilfe des „Power Wave 340“ (BioTEK, Highland Park, USA) bei 562 nm unter Verwendung der Software „Gen 5“. Die Berechnung der Proteinkonzentration mit der Software „Excel 2003“ basierte auf einer mitgeführten Albumin-Eichgeraden (25-2000 µg/ml; Doppelbestimmung), die jedesmal parallel zu den Proben neu erstellt wurde.

2.6.3 Albumin-Depletion

Das in den Mausseren (vgl. Kap. 2.5) in enorm großen Mengen vorhandene Albumin wurde zur Optimierung der Analysebedingungen mit Hilfe spezifisch Albumin depletierender Säulen unter Verwendung des „Qproteome Murine Albumin Depletion Kits“ (Qiagen) quantitativ reduziert. Die Anwendung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei 25 µl Serum pro Maus eingesetzt wurden.

2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld (Laemmli, 1970). Ein engporiges Trenngel, welches je nach Vernetzungsgrad wie ein Molekularsieb wirkt, wird von einem weitporigen Sammelgel zur Konzentration der Proteinproben

überschichtet. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz und überlagert durch SDS-Proteinkomplexbildung die Eigenladung der Proteine, so dass sie negativ geladen im elektrischen Feld ihrem Molekulargewicht entsprechend durch die Polyacrylamid-Matrix wandern.

Die in 2x-Laemmli-Probenpuffer oder 0,5% SDS-Lysispuffer lysierten Proben (vgl. Kap. 2.2) wurden zur Verringerung der durch genomische DNA bedingten Viskosität sonifiziert oder mit einer feinen Kanüle (27 GA3/4; BD Microlance 3, Drogheda, Ireland) geschert. Die bei -20°C gelagerten Zellüberstände und in 0,5% SDS-Lysispuffer aufgenommenen Proteinlysate sowie die bei -80ºC eingefrorenen Mausseren wurden zur Analyse auf 2x Laemmlipuffer eingestellt. Nach der Denaturierung der Proteine für 1-5 min bei 95°C wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Der Vernetzungsgrad des Sammelgels betrug in allen durchgeführten Experimenten 5% und der des Trenngels 10%. Als Größenstandard für die Proteine wurde der Marker „Color Prestained Protein Ladder, Broad Range“ (#P7711S, New England Biolabs) verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelapparatur („Novex Mini Cell“, Invitrogen) in Elekrtophorese-Laufpuffer durchgeführt, wobei die maximal verwendete Stromstärke bei 40 mA/Gel lag.

Elektrophorese-Laufpuffer

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

PAA (Polyacrylamid) -Stammlösung

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

Trenngelpuffer

1,5 M Tris (pH 8,8)

Sammelgelpuffer

1 M Tris (pH 6,8)

SDS-Lösung

10% (w/v) Natriumdodecylsulfat

APS

10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

Trenngel, 10% (w/v) Acrylamid

4 ml dH_2O
2,5 ml Trenngelpuffer
3,3 ml PAA Stammlösung
100 µl SDS-Lösung
100 µl APS
5 µl TEMED

Sammelgel, 5% (w/v) Acrylamid

3,3 ml dH_2O
0,65 ml Sammelgelpuffer
0,96 ml PAA Stammlösung
50 µl SDS-Lösung
50 µl APS
5 µl TEMED

2.6.5 Elektrotransfer auf Membranen (Western-Blot)

Mit Hilfe des „Novex-Mini-Cell-Tank-Blot-Moduls“ (Invitrogen, Karlsruhe) wurden die Proteine unter Einfluss eines elektrischen Feldes aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (VWR, Langenfeld) transferiert und somit immobilisiert. Vor dem Aufschichten der Apparatur wurden Blottingpapiere und Schwämme für mindestens 30 min in 1x Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 30 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend für mindestens 10 min in 20% Methanol-haltigem Transferpuffer geschwenkt. Daraufhin wurden 2 mit Transferpuffer vollgesogene Schwämme auf die Kathode gelegt und in der Reihenfolge Blottingpapier, Gel, PVDF-Membran und wieder Blottingpapier beschichtet. Abschließend wurde die Transferapparatur mit den

verbleibenden Schwämmen aufgefüllt. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Aufschichtung speziell zwischen Gel und Membran luftblasenfrei erfolgte. Nach Überschichtung der aufgebauten Apparatur mit 20% Methanol-haltigem Transferpuffer wurde der Elektrotransfer bei 25 mV pro Gel für 2 h durchgeführt.

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde bei Bedarf die Membran für 1 min in Ponceau S-Lösung geschwenkt. Ponceau S bindet reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine und bildet einen rötlich gefärbten Komplex. Nach kurzem Waschen mit dH_2O wurden die transferierten Proteine in Form von roten Banden sichtbar.

Transferpuffer (10x)

250 mM Tris
1,92 M Glycin
pH 8,5

Ponceau S-Lösung

5% (v/v) Essigsäure
0,1% (w/v) Ponceau S

2.6.6 Detektion oxidierter Proteine

Nach Albumin-Depletion (vgl. Kap. 2.6.3) wurden 25 µl Serum pro Maus mit 25 µl SDS-Lösung (24%) und 50 µl DNPH-Lösung versetzt, kurz zentrifugiert und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zur Neutralisierung der Proben erfolgte tropfenweise die Zugabe von Tris-Lösung (etwa 100 µl) bis ein Farbumschlag nach orange zu beobachten war. Die DNPH-derivatisierten Proben wurden nun in einem Volumen von 80 µl auf ein SDS-Gel geladen und eine SDS-PAGE (vgl. Kap. 2.6.4) mit anschließender Western-Blot-Analyse (vgl. Kap. 2.6.5) unter Verwendung eines Antikörpers gegen DNP-konjugierte Proteine (vgl. Tab. 2.4) durchgeführt.

SDS-Lösung

24 g SDS

ad 100 ml dH_2O

DNPH-Lösung

39,6 mg DNPH

1 ml Trifluoressigsäure

ad 9 ml dH_2O

Tris-Lösung

2,42 g Tris

3 ml Glycerol

1,9 ml ß-Mercaptoethanol

ad 5,1 ml dH_2O

2.6.7 Immunodetektion

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

Nach dem Elektrotransfer der Proteine wurde die Membran 2x 10 min in TBS/T gewaschen und danach für 60 min bei RT unter leichtem Schütteln mit TBS/T + 5% (w/v) Milchpulver geblockt. Die anschließende Inkubation mit den primären Antikörpern (vgl. Tab. 2.4) erfolgte über Nacht bei 4ºC. Am Folgtetag wurde die Membran zunächst 3x 10 min mit TBST/T gewaschen und dann für 60 min mit den entsprechenden HRP (Meerettich-Peroxidase)-konjugierten sekundären Antikörpern (vgl. Tab.2.4) inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit TBST/T von 3x 10-20 min, woraufhin die transferierten Zielproteine durch Chemilumineszenz detektiert werden konnten. Dabei wurde das HRP-Substrat „SuperSignal West Pico Chemiluminescent“ (Pierce, Rockford, USA) nach 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

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	**Hersteller/Bezugsquelle**	**Verdünnung**
Anti-Coeruloplasmin (8)	Santa Cruz Biotechnology; # sc-135866	1:100-500 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-phospho-Akt (S 473)	Cell Signaling Technology; # 9271S	1:1000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-total-FoxO1 (C29H4)	Cell Signaling Technology; # 2880S	1:500 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST; 1:50 für Immunfluoreszenz
Anti-total-FoxO3 (75D8)	Cell Signaling Technology; # 2497S	1:500 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-αDNP	Sigma; #D9656	1:1000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-V5	Invitrogen; #R960-25	1:5000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-GAPDH	Millipore; #MAB374	1:5000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-Albumin (M-140)	Santa Cruz Biotechnology; # sc-50536	1:1000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST
Sekundärantikörper	**Hersteller/Bezugsquelle**	**Verdünnung**
Anti-Maus	GE Healthcare; #NA931V	1:5000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-Kaninchen	Dianova; #111-035-144	1:3000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-Kaninchen (für Carbonyl-Blot)	GE Healthcare; #NA934V	1:5000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST

2.6.8 Entfernung eines Antikörpers von der Membran

Zur Entfernung eines Antikörpers von einer Membran wurde die Methode des „Strippens“ angewandt. Nach der Immunodetektion wurde die Membran für mindestens 20 min in TBS/T gewaschen und anschließend für 15-20 min in „Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer“ (Pierce, Rockford, USA) inkubiert. Der Puffer wurde entfernt und die Membran für weitere 60 min in TBS/T gewaschen. Im Anschluss konnte die Membran erneut geblockt und mit primären Antikörpern behandelt werden.

2.6.9 ELISA („Enzyme-linked immunosorbent assay“)

Zum quantitativen Nachweis von Coeruloplasmin (Cp) in den Zellüberständen der primären Rattenhepatozyten (vgl. Kap. 2.2) wurde das Ratten-Cp-spezifische „Rat ceruloplasmin ELISA Test kit“ (Life Diagnostics, West Chester, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit dH_2O verdünnt und 100 µl zur Analyse eingesetzt (Doppelbestimmung). Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm unter Verwendung des „Power Wave 340“ (BioTEK, Highland Park, USA) mit Hilfe der Software „Gen 5“ gemessen. Die Berechnung der Cp-Konzentration mit der Software „Excel 2003“ basierte auf der ebenfalls in Doppelbestimmung erstellten Cp-Eichgeraden (4,7-300 ng/ml), welche parallel zu den Proben mitgeführt wurde.

2.6.10 Immunfluoreszenzmikroskopie

H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden in 6-well-Platten auf runden Deckgläsern ausgebracht und bei einer 80-90%igen Konfluenz mit den entsprechenden Komponenten behandelt (vgl. Kap. 2.2).

Nach der Behandlung wurden die Zellen kurz und vorsichtig mit PBS gewaschen und zur Fixierung für 15 min bei RT unter langsamem Schwenken mit 4% Formaldehyd in PBS bedeckt. Es folgte das Waschen der Zellen mit PBS für 3x 20 min und die Inkubation in 1 ml Blocklösung pro well unter leichtem Schwenken bei RT für weitere 60 min. Parallel wurde ein spezifischer Antikörper gegen FoxO1 (vgl. Tab. 2.4) im Verhältnis 1:50 in

Primärantikörperlösung verdünnt und bis zur Verwendung bei 4ºC gelagert. Nach dem Blocken wurden die Deckgläser vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette aus den Platten genommen und 100 µl der vorbereiteten Primärantikörperlösung in jedes well pipettiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit der Zellseite nach unten blasenfrei auf dem Tropfen Primärantikörperlösung platziert und über Nacht bei 4ºC inkubiert. Zur Kontrolle der Spezifität des später verwendeten Sekundärantikörpers wurde ein well pro Platte mit PBS ohne Primärantikörper behandelt. Am Folgetag wurden die Objektgläschen mit der Zellseite nach oben in den Platten für 3x 20 min mit PBS gewaschen und für 1 h unter Lichtausschluss und langsamem Schwenken bei 37ºC in 1 ml Sekundärantikörperlösung (Alexa Fluor 594 Anti-Kaninchen-Antikörper (Invitrogen); 1:800 in PBS verdünnt) inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut für 3x 20 min mit PBS gewaschen und die Deckgläser unter Verwendung von „Pro Long Gold anti fade reagent with DAPI“ (Invitrogen) auf Objektträgern fixiert. Anschließend wurden die Zellen an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M, Zeiss, Göttingen) hinsichtlich der subzellulären FoxO1-Translokation analysiert und dokumentiert.

Blocklösung

3% Ziegennormalserum
0,3% Triton X-100
in PBS

Primärantikörperlösung

1% Ziegennormalserum
in PBS

2.7 Analyse von Nukleinsäuren

2.7.1 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die bei -80ºC eingelagerten Bakterienpellets (vgl. Kap. 2.4.1) wurden mit Hilfe des „Endotoxin-free Plasmid DNA Purification Maxi-Kits" (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet und Plasmid-DNA isoliert. Die

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

2.7.2 RNA-Isolierung und Quantifizierung

Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aus den entsprechenden RNA-Lysaten (vgl. Kap. 2.2) isoliert, wobei die Elution der Nukleinsäuren mit 2x 50 µl RNAse-freiem dH_2O erfolgte. Zur RNA-Isolierung aus den Mauslebern (vgl. Kap. 2.5) wurden 500 µl RLT-Lysispuffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) in Eppendorfgefäßen vorgelegt und ein Stück von 20-30 mg der jeweiligen Leber überführt. Dieser Arbeitsschritt wurde in höchst möglicher Geschwindigkeit durchgeführt, um ein Auftauen der Lebern zu verhindern. Anschließend wurden die Leberstücke mit Hilfe einer Kanüle (20 G x 1 1/2; Terumo Corporation, Leuven, Belgien) lysiert und für 3 min bei RT und 12.000 UpM zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig in neue Eppendorfgefäße überführt und direkt auf Eis gestellt. Alle weiteren Arbeitsschritte verliefen analog zu den RNA-Isolationen aus den *in vitro* Zellkulturen unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Qualität der RNA wurde stets direkt nach der Isolation auf einem 0,8% Agarosegel (vgl. Kap. 2.7.5) kontrolliert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die RNA im Verhältnis 1:50 in RNAse-freiem dH_2O verdünnt und in einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) photometrisch bei 260 nm gegen dH_2O als Referenz gemessen. Eine Extinktion von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 50 µg/ml.

2.7.3 Reverse Transkription

Unter Verwendung des „Omniskript RT-Kits“ (Qiagen) wurde mittels reverser Transkription die zuvor islolierte RNA (vgl. Kap. 2.7.2) nach Anleitung des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden je nach Ausbeute 0,4 µg-1 µg total RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 1 h bei 37ºC im Thermocycler T-Personal (Biometra. Göttingen) inkubiert. Der Reaktionsansatz enthielt eine Mischung aus einzelsträngigen

Hexanukleotiden zufälliger Sequenz („random primer“; Invitrogen) als Oligonukleotide. Anschließend wurde die cDNA bis zu ihrer Verwendung bei -20ºC gelagert.

2.7.4 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-RT-PCR)

Realtime-RT-PCR-Analysen wurden mit dem LightCycler 1.5 (Roche, Mannheim) unter Verwendung des „LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1-Kits“ (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 16 µl Reaktionsmix wurden pro Glaskapillare vorgelegt und mit 4 µl der bei Bedarf vorverdünnten cDNA (20-200 ng) versetzt. Die verwendeten Oligonukleotide (Invitrogen) wurden in einer Endkonzentration von 0,5 µM eingesetzt und sind in Tabelle 2.5 zusammen gefasst.

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Oligonukleotide für die Realtime-RT-PCR

Gen (Mensch)	**Primersequenz 5’-3’ (F, *forward*; R, *reverse*)**	**Größe des Amplikons (bp)**	**Genbank-Eintrag**
Coeruloplasmin	F: ATTACAACCCCCAGAGCAGA R: TTTGGGGACAGTCCATTCAT	89	NM_000096.3
Glukose-6-Phosphatase	F: AGTTGTTGCTGGAGTCCTGTC R: GGCTGGCATTATAGATGCTGT	77	NM_008061.3
HPRT-1	F: GACCAGTCAACAGGGGACAT R: GTGTCAATTATATCTTCCACCATCAAC	95	NM_000194.2
Gen (Ratte)	**Primersequenz 5’-3’ (F, *forward*; R, *reverse*)**	**Größe des Amplikons (bp)**	**Genbank-Eintrag**
Coeruloplasmin	F: GAGAAGAGCTGAAGAGGAGCA R:GTCTCCAACATCTGCATGAAT C	64	NM_012532.1
Selenoprotein P	F: GACAGTGGTTGCTCTTCAAGC R: TTATTCGCAGGTCTTCCAATCT	74	NM_019192.2

Glukose-6-Phosphatase	F: CTCACTTTCCCCATCAGGTG R: GAAAGTTTCAGCCACAGCAA	62	NM_013098.2
FoxO1	F: TCAGGCTAGGAGTTAGTGAGCA R: GGGGTGAAGGGCATCTTT	95	NM_001191846.1
FoxO3	F: TTCAAGGATAAGGGCGACAG R: GGCTGTGCAGTGACAGGTT	76	NM_001106395.1
FoxO4	F: AAGGGTGACAGCAACAGCTC R: TTGCTGTGCAAAGACAGGTT	68	NM_001106943.1
HPRT-1	F: GACCGGTTCTGTCATGTCG R: ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC	61	NM_012583.2
Gen (Maus)	**Primersequenz 5'-3'** **(F, *forward*; R, *reverse*)**	**Größe des Amplikons (bp)**	**Genbank-Eintrag**
Coeruloplasmin	F: TGAAGAGACGAGCCGAAGAC R: TGTCTCCAACATTTGCATGAAT	69	NM_001042611.1
Selenoprotein P	F: AAGCTAGTCCGAAGGGGTTG R: TGGCTCTCTGCTCCTCCA	99	NM_009155.3
Glukose-6-Phosphatase	F: GAGGAAAGAAAAAGCCAACGTA R: GGGACAGACAGACGTTCAGC	93	NM_008061.3
Foxo1	F: TGTCAGGCTAAGAGTTAGTGAGCA R: GGGTGAAGGGCATCTTTG	96	NM_019739.3
Foxo3	F: GCTAAGCAGGCCTCATCTCA R: TTCCGTCAGTTTGAGGGTCT	92	NM_019740.2
Foxo4	F: GGACTTCAACTTTGAGCCAGA R: GCTCAAGGAGGAAAAGTGGA	109	NM_018789.2

HPRT-1	F: TCCTCCTCAGACCGCTTTT R: CCTGGTTCATCATCGCTAATC	90	NM_013556.2

Die Realtime-RT-PCR wurden mit folgendem Programm durchgeführt (vgl. Tab. 2.6):

Tabelle 2.6: Programm der Realtime-RT-PCR

PCR-Segment		**Temperatur (ºC)**	**Dauer (s)**
Initiale Denaturierung		95	10 min
Amplifikation (40-50 Zyklen)	Denaturierung	95	5
	Primer-Anlagerung	59-60	5
	Elongation	72	5
Schmelzkurve		95 45 bis 99	2 12 2
Kühlung		32	30

Neben der durchgeführten Schmelzkurve (45-99ºC) wurden die Reaktionsansätze zur Dokumentierung der Spezifität der PCR-Produkte durch kurze Zentrifugation aus den Glaskapillaren in Eppendorfgefäße überführt und auf einem 0,8% Agarosegel (vgl. Kap. 2.7.5) analysiert.

Zur Bestimmung der relativen mRNA-Spiegel wurden die durch die Fluoreszenz angezeigten CP-Werte („crossing point“) der analysierten Gene auf den des Referenzgens HPRT1 normiert und in Relation zur jeweiligen Kontrolle gesetzt. Diese Berechnungen wurden unter Verwendung der Software „Excel 2003“ durchgeführt.

2.7.5 Agarose-Gelelektophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuren in Abhängigkeit ihrer Größe und Konformation. Aufgrund ihres negativ geladenen Phosphat-Rückgrats sind Nukleinsäuren Polyanionen und wandern unter Anlegung eines elektrischen Feldes durch die Agarose-Gelmatrix zur Anode. In dieser Arbeit fand sie Anwendung bei der Qualitätsbestimmung nach RNA-Iolation (vgl. Kap. 2.7.2) und bei der Analyse von Realtime-PCR-Produkten (vgl. Kap. 2.7.4).

Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) wurde in entsprechender Menge unter Erhitzen (Biozym, Hessisch Oldendorf) in 1x TAE- oder 1x TBE-Puffer gelöst und anschließend auf unter 60ºC abgekühlt. Darauhin wurde entweder der in die DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (5 µg/ml) oder 1x GelRed (Biotium, Hayward, USA) hinzugegeben und das Gel in die horizontale Gelkammer gegossen. Die RNA- oder DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Taschen des ausgehärteten Agarosegels pipettiert. Anschließend erfolgte die Elekrophorese bei einer Spannung von 65 V für etwa 1 h mit 1x TAE- oder 1x TBE-Puffer als Laufpuffer. Da Ethidiumbromid und GelRed unter UV-Bestrahlung Licht im sichtbaren Bereich emittieren (λ = 605 nm), konnten nach dem Lauf Nukleinsäurebanden mit Hilfe des Fluorchem 8900 (Cell Biosciences, Santa Clara, USA) detektiert werden.

TAE-Puffer (50x)

40 mM Tris-HCl, pH 8,3
20 mM Essigsäure,
50 mM EDTA

TBE-Puffer (10x)

0,9 M Tris-HCl, pH 8,0
0,9 M Borsäure,
20 mM EDTA

Probenpuffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

1 mM EDTA

30% (v/v) Glycerol

0,25% (w/v) Bromphenolblau

3. Ergebnisse

Der PI3K/Akt-Signalweg spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Expression verschiedener FoxO-Zielgene, welche für Proteine der antioxidativen Abwehr, des Glukosemetabolismus und der Regulation des Zellzyklus kodieren (Brunet et al., 1999; Barthel et al., 2005). So konnte in früheren Studien eine Insulin-vermittelte PI3K/Akt- und FoxO-abhängige Kontrolle der Biosynthese des von der Leber sekretierten antioxidativ wirkenden Selenoproteins P (SeP) und des Glukoneogenese-Enzyms Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) gezeigt werden (Barthel et al., 2001; Schmoll et al., 2000; Walter et al., 2008).

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der durch Insulin induzierten PI3K/Akt-abhängigen Kontrolle der Expression des von der Leber sekretierten Proteins Coeruloplasmin (Cp), welches wie SeP antioxidative Wirkung zeigen kann. Zudem wurde die Bedeutung der FoxO-Transkriptionsfaktoren für diese Regulation untersucht.

3.1. Insulin-induzierte Regulation der Cp-Synthese über den PI3K/Akt/FoxO-Signalweg

3.1.1 Insulin-vermittelte Kontrolle der Cp Expression

In einem ersten Experiment sollte ein möglicher Effekt von Insulin auf die Expression von Cp untersucht werden. Dazu wurden H4IIE-Rattenhepatomzellen über einen Zeitraum von 7 h mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (0,1-500 nM) behandelt, die eine dosisabhängige Abnahme der basalen Cp-mRNA-Spiegel bewirkten (Abb. 3.1; A). Sowohl Cp- als auch G6Pase-Expression, welche negativ durch Insulin reguliert wird und zur Kontrolle funktionaler Insulinwirkung diente, waren schon bei physiologischen Insulinkonzentrationen von 0,1-0,3 nM im Vergleich zur Kontrollsituation deutlich vermindert. Bei supraphysiologischen Konzentrationen ≥ 10 nM wurde bei beiden mRNA-Spiegeln ein Sättigungszustand erreicht. In einem Zeitverlaufs-Experiment konnte die Insulin-induzierte Reduktion der Cp Expression teilweise regeneriert werden. So stiegen die relativen Cp mRNA Spiegel von 10% zur Kontrolle nach 7 h auf etwa 45% zur Kontrolle nach 16 h an (Abb. 3.1; B). Auch hier war die G6Pase-Expression tendenziell ähnlich zur Cp-Expression und wies eine – wenn auch weniger ausgeprägte – zeitabhängige Regenerationsphase auf.

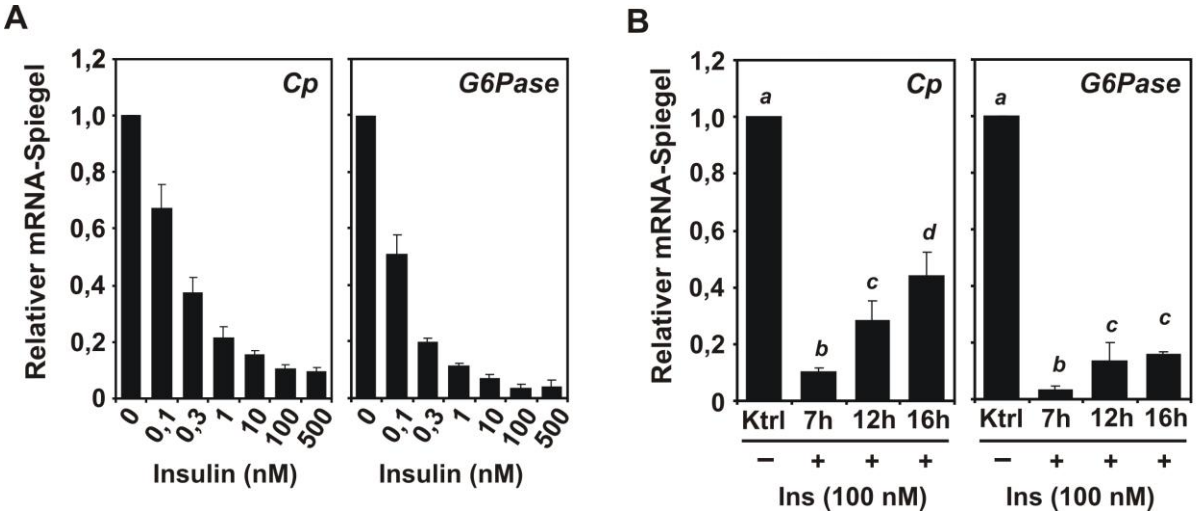

Abb 3.1: Insulin-vermittelte Abnahme der Cp-mRNA Spiegel in H4IIE-Ratten-Hepatomzellen
H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% herangezogen und über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen für 7 h mit verschiedenen Insulinkonzentrationen (0,1-500 nM) behandelt **(A)** oder über verschiedene Zeiträume (7h, 12h und 16h) einer konstanten Insulinkonzentration von 100 nM ausgesetzt **(B)**. Gesamt-RNA wurde isoliert und die Cp- und G6Pase-mRNA Spiegel mittels quantitativer Realtime-RT-PCR analysiert. Die gemessenen Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel wurden auf das Referenzgen HPRT-1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1) normiert und die als Kontrolle dienenden normierten unbehandelten mRNA-Spiegel der Zellen gleich 1 gesetzt (Ktrl). Die Daten repräsentieren Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (SD) aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit Ausnahme der in **(A)** dargestellten Daten für die Konzentrationen 0,1-1 nM Insulin, welche in einem Triplikats-Versuch erhoben wurden. Die statistische Signifikanz in **(B)** wurde über eine einseitige ANOVA („analysis of variance“) mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test ermittelt ($P < 0,05$), wobei sich die Datensätze signifikant voneinander unterscheiden, wenn sie nicht mit dem gleichen Buchstaben (a,b,c,d) markiert sind.

Die Auswirkung der Insulin-abhängigen negativen Regulation der Cp-Expression auf mRNA-Ebene sollte nun auf Ebene der Proteine analysiert werden. Allerdings konnte kein sekretiertes Cp-Protein in den Überständen der H4IIE-Rattenhepatomzellen detektiert werden. Aus diesem Grund wurden primäre Rattenhepatozyten verwendet, um einerseits in den Zellüberständen sekretiertes Cp zu quantifizieren und andererseits die bisher gewonnenen Erkenntnisse bezüglich Insulin-regulierter Cp-mRNA-Spiegel in primären Rattenhepatozyten zu verifizieren.

Zunächst wurden die primären Rattenhepatozyten für 24 h mit Insulin (100 nM) behandelt und die Überstände zur Analyse der sekretierten Cp-Proteinmengen gesammelt. Im Gegensatz zu den H4IIE-Rattenhepatomzellen konnte in den Überständen der primären Rattenhepatozyten Cp-Protein nachgewiesen werden, dessen Menge durch die Insulinbehandlung um etwa 45% relativ zur Kontrolle gesenkt wurde (Abb. 3.2; A). Auf Ebene der Cp-mRNA konnte sowohl nach 8 h als auch nach 24 h Behandlung der Hepatozyten mit Insulin eine signifikante Abnahme im Vergleich zur Kontrolle beobachtet

werden (Abb. 3.2; B). Hierbei ist zu bemerken, dass die durch Insulin-induzierte Senkung der Cp-mRNA-Spiegel weniger drastisch verlief als in den H4IIE-Rattenhepatomzellen (Abb. 3.1; A). Als Kontrolle für funktionale Insulinwirkung dienten wiederum G6Pase-mRNA-Spiegel, welche eine sehr starke Insulin-induzierte Reduktion aufwiesen.

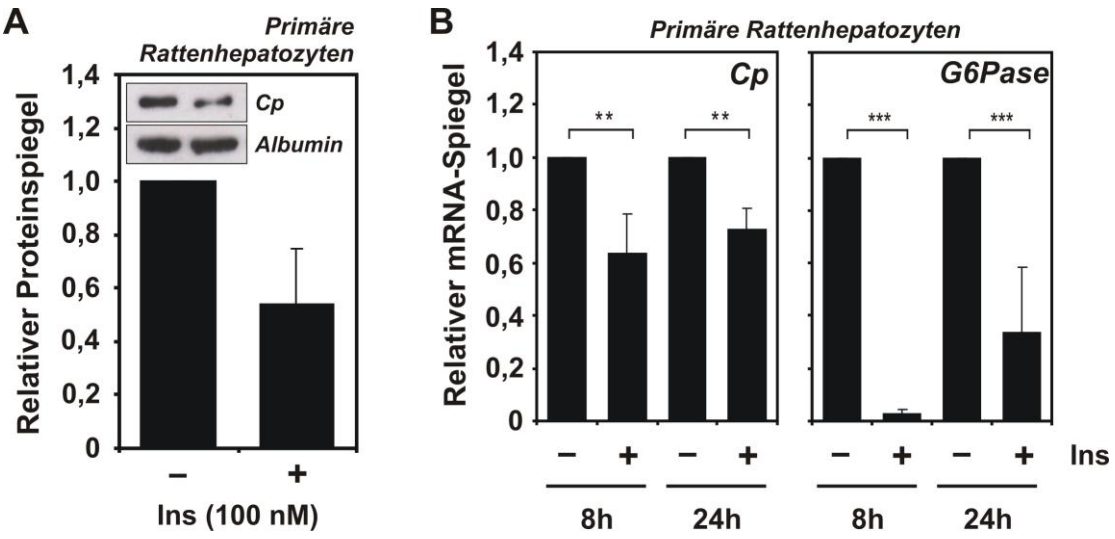

Abb 3.2: Insulin-bedingte Abnahme der Cp-Expression in primären Rattenhepatozyten
Kultivierte primäre Rattenhepatozyten wurden für 5 h oder für 16 h in serumfreiem Medium gehalten. Am Folgetag wurden die Zellen für 8 h (16 h serumfreies Medium) oder 24 h (5 h serumfreies Medium) mit Insulin (100 nM) behandelt. **(A)** Die Überstände der für 24 h mit Insulin behandelten und unbehandelten Zellen wurden gesammelt und Aliquots von 40 µg Protein über Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen Coeruloplasmin untersucht. Albumin diente dabei als Proteinladekontrolle. Die relativen Protein-Spiegel wurden densitometrisch bestimmt, wobei die Cp-Spiegel in den Überständen der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt wurden. Die abgebildeten Daten repräsentieren MW ± SEM aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. **(B)** Gesamt-RNA wurde isoliert und die Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel mittels Realtime-RT-PCR analysiert. Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel wurden auf HPRT-1-mRNA-Spiegel normiert und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt. Die Daten sind MW ± SD aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde über eine einseitige ANOVA und den darauf folgenden Student-Newman-Keuls-Test bestimmt (**$p < 0,01$, ***$p < 0,001$).

Alle bisherigen Experimente wurden in Zelllinien der Ratte durchgeführt. Es sollte nun untersucht werden, ob die Cp-Expression auf transkriptioneller Ebene auch im Menschen in Insulin-abhängiger Weise erfolgt.

Zunächst wurden humane HepG2-Hepatomzellen für 8 h und 24 h mit 100 nM Insulin behandelt, lysiert und anschließend Gesamt-mRNA isoliert. Die Behandlung zeigte jedoch keine Wirkung auf Cp-mRNA-Spiegel, wohingegen die G6Pase-Expression zu beiden Zeitpunkten auf unter 20% der Kontrolle gesenkt war (Abb. 3.3; A).

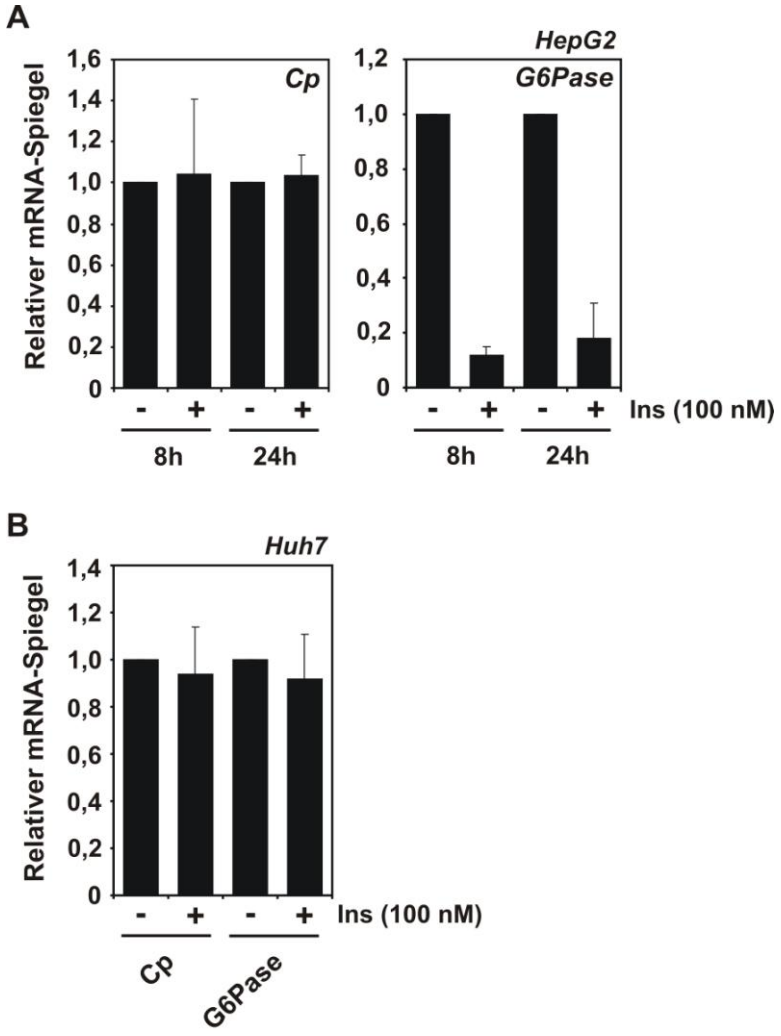

Abb 3.3: Einfluss von Insulin auf Cp-mRNA-Spiegel in humanen HepG2- und Huh7-Hepatomzellen
Humane HepG2- oder Huh7-Hepatomzellen wurden bis zu einer 80-90%igen Konfluenz herangezogen und über Nacht in serumfreiem Medium gehalten. **(A)** Am Folgetag wurden die HepG2-Zellen für 8 h und 24 h mit Insulin (100 nM) behandelt und anschließend Gesamt-RNA isoliert. Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel wurden über Realtime-RT-PCR bestimmt, auf das Referenzgen HPRT-1 normiert und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt. Die Daten repräsentieren MW ± SD aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. **(B)** Es folgte die Behandlung der Huh7-Zellen mit Insulin (100 nM) für 16 h und die anschließende Isolation von Gesamt-RNA. Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel wurden mittels Realtime-RT-PCR analysiert und auf HPRT-1-mRNA-Spiegel normiert. Die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der unbehandelten Zellen wurden gleich 1 gesetzt. Die Daten repräsentieren MW ± SD aus 4 voneinander unabhängigen Experimenten.

Da nur aufgrund der HepG2-Daten keine endgültige Aussage bezüglich Insulin-induzierter transkriptioneller Cp-Regulation im Menschen gemacht werden konnte, sollte dieser Zusammenhang unter Verwendung von Huh7-Hepatomzellen in einer weiteren humanen Zelllinie analysiert werden.

Die Zellen wurden für 16 h mit 100 nM Insulin behandelt und Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel gemessen. Jedoch erwiesen sich die Huh7-Zellen als nicht-sensitiv für Insulin, da neben der Cp-Expression auch die als Kontrolle dienenden G6Pase-mRNA-Spiegel durch die Behandlung weitestgehend unbeeinflusst waren (Abb. 3.3; B).

3.1.2 PI3K/Akt-abhängige Regulation der Cp-Expression

Die Parallelen im Expressionsmuster von G6Pase und Cp nach Insulinbehandlung in den Zelllinien der Ratte führten zu der Frage, ob möglicherweise die PI3K/Akt-Kaskade - wie für G6Pase bereits bekannt - eine zentrale Rolle bei der transkriptionellen Regulation von Cp spielt.

Dazu wurden H4IIE-Rattenhepatomzellen für 7 h mit Insulin in An- und Abwesenheit der spezifischen PI3K-Inhibitoren Wortmannin (200 nM) oder LY-294002 (20 µM) behandelt. Im Gegensatz zu LY-294002 blockierte Wortmannin – wenn auch nicht vollständig – die durch Insulin induzierte Phosphorylierung von Akt (Abb. 3.4; A). Die durch Insulin bedingte Abnahme der Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel war in Anwesenheit von Wortmannin oder LY-294002 hingegen nur tendenziell gehemmt (Abb. 3.4; B).

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurden in weiteren Experimenten die Medien mit den entsprechenden Komponenten in Abständen von 90 Minuten über einen Zeitraum von 7 h gewechselt. Nach Behandlung mit Wortmannin waren sowohl die durch Insulin bewirkte Phosphorylierung von Akt (Abb. 3.4; C) als auch die durch Insulin induzierte Abnahme der Cp-mRNA-Spiegel vollständig gehemmt (Abb. 3.4; D). Der das Insulinsignal blockierende Effekt von Wortmannin wirkte sich stärker auf die Cp-Expression aus als auf die ebenfalls signifikant unterdrückte Abnahme der G6Pase-Expression. Im Gegensatz dazu übte LY-294002 nach 7 h Behandlung unter gleichen Versuchsbedingungen nur eine tendenzielle Abschwächung auf die durch Insulin-bedingte Phosphorylierung von Akt (Abb. 3.4; E) als auch auf die Insulin-induzierte Senkung der G6Pase-mRNA-Spiegel aus (Abb. 3.4; F). Jedoch wirkte die Anwesenheit von LY-294002 der Insulin-bedingten Abnahme der Cp-Expression deutlich entgegen, wobei die Cp-mRNA-Spiegel im Vergleich zur Kontrollsituation dennoch signifikant reduziert waren.

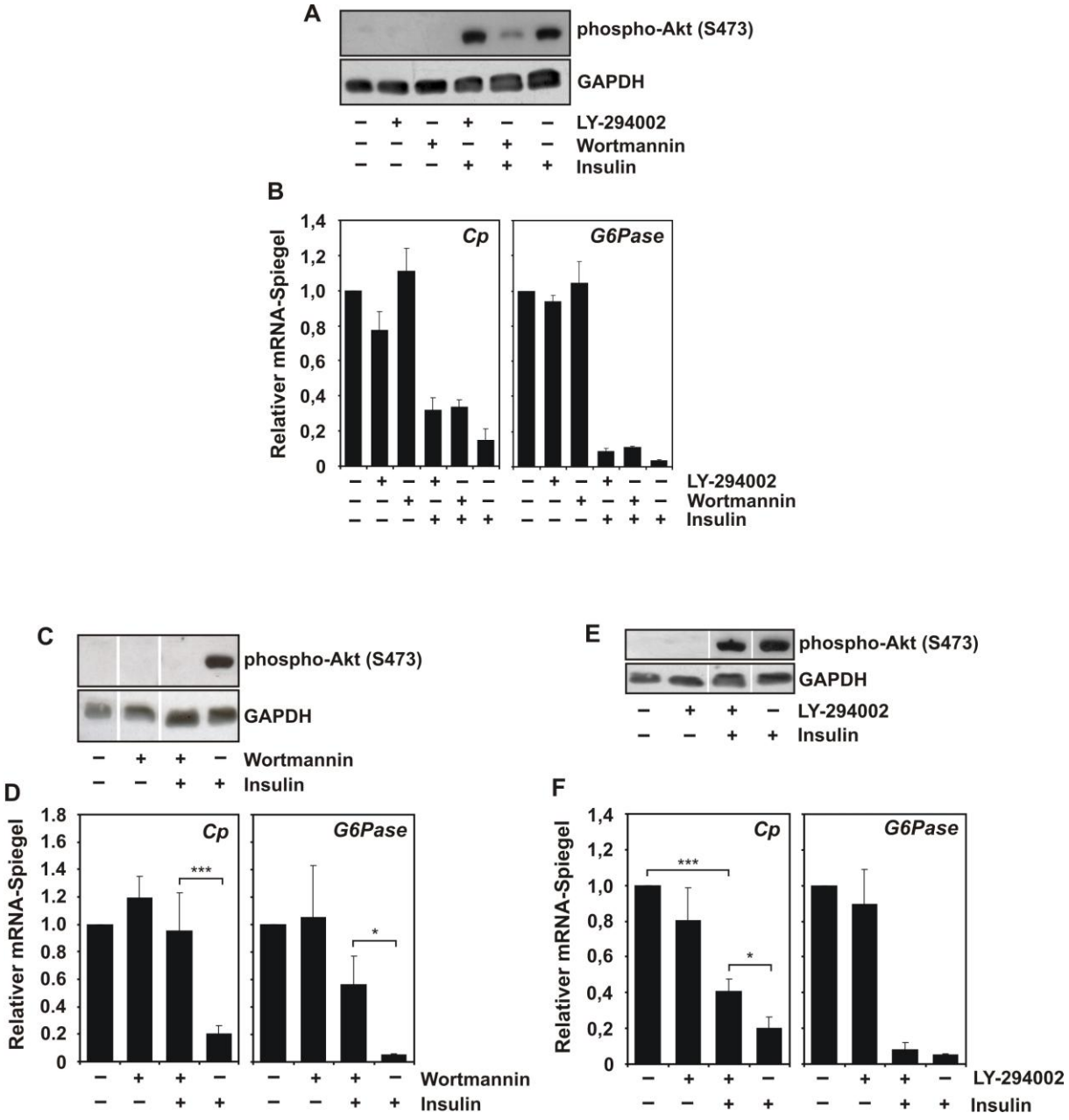

Abb 3.4: Insulin-induzierte Regulation der Cp-Expression verläuft in PI3K-abhängiger Weise
H4IIE Rattenhepatomzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% herangezogen und über Nacht in serumfreiem Medium gehalten. Vor der eigentlichen Behandlung wurden die Zellen für 30 min mit den spezifischen PI3K-Inhibitoren LY-294002 (20 µM) oder Wortmannin (200 nM) beziehungsweise der Lösemittelkontrolle DMSO präinkubiert. Es folgte die Behandlung mit Insulin (100 nM) in An- oder Abwesenheit von LY-294002 (20 µM) oder Wortmannin (200 nM) für 7 h. Im Gegensatz zur einmaligen initialen Behandlung der Zellen in **(A/B)** wurde das Zellkulturmedium in **(C/D)** und **(E/F)** samt aller zugefügten Komponenten (Insulin, LY-294002, Wortmannin oder DMSO) in Zeitabständen von 90 min während der Inkubation wiederholt ausgetauscht. **(A,C,E)** 50 µg Gesamtprotein wurden in einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen phosphorylierte Akt untersucht, wobei GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Proteinladekontrolle diente. **(B,D,F)** Gesamt-RNA wurde isoliert und die Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel mittels Realtime-RT-PCR analysiert. Die berechneten Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel wurden auf das Referenzgen HPRT-1 normiert und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt. Die abgebildeten Daten sind MW ± SD aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz zwischen den entsprechenden Gruppen wurde über eine einseitige ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test bestimmt (*$p < 0,05$, ***$p < 0,001$).

3.1.3 Untersuchung von Cp als Zielgen von FoxO-Proteinen

Insulin induzierte eine starke PI3K-abhängige Abnahme der Cp-Expression in H4IIE-Rattenhepatomzellen, was auf eine Beteiligung der PI3K/Akt-Kaskade in der Kontrolle der Cp-Expression hindeutete. Da FoxO-Proteine über den PI3K/Akt-Signalweg reguliert werden, ergab sich die Fragestellung, ob Cp ein mögliches Zielgen dieser Transkriptionsfaktoren ist.

FoxO Faktoren regulieren Expression durch Bindung an DBE- sowie IRE-Sequenzen im Promotorbereich ihrer Zielgene. Aus diesem Grund sollte zunächst der proximale Cp-Promotorbereich der Ratte auf DBE- und IRE-Motive untersucht werden. Da sich diese beiden Motive nur in 2 Basen unterscheiden, wurde zur Identifizierung möglicher FoxO Bindungsstellen die Konsensus-Sequenz [5'-(C/G)(A/T)AAA(C/A)A-3'] verwendet, welche sowohl das DBE-Motiv (5'-GTAAACA-3') als auch das IRE-Motiv [5'-CAAAA(T/C)A-3'] umfasste (Barthel et al. 2005). Tatsächlich konnten einige putative FoxO-Bindungsstellen im Cp-Promotorbereich der Ratte identifiziert werden (Abb. 3.5).

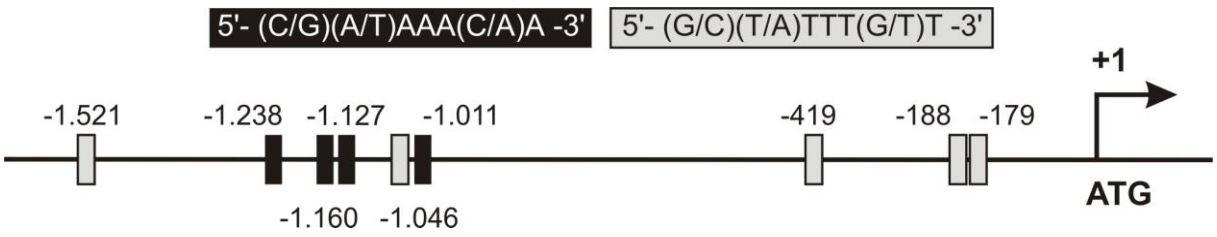

Abb 3.5: Der proximale Promotorbereich des Ratten-Cp-Gens enthält putative FoxO-Bindungsstellen
Die *in silico*-Analyse des proximalen Promotorbereichs des Ratten-Cp-Gens (GenBank-Eintrag M80529,1) ergab 9 putative Bindungsstellen für FoxO-Transkriptionsfaktoren. Die verwendete Konsensus-Sequenz [5'-(C/G)(A/T)AAA(C/A)A-3'] beinhaltete das DBE- und IRE-Motiv. Die angegebenen Ziffern repräsentieren die Position des ersten 5'-Nukleotids der möglichen FoxO Bindungsstelle relativ zum Translationsstartpunkt (+1). Schwarz: Konsensus-Sequenz; grau: Komplementärsequenz.

Eine mögliche Beteiligung der FoxO-Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Cp-Expression sollte zunächst mittels durch „small-interference" RNA (siRNA) induzierte Senkung der jeweiligen FoxO-Proteinspiegel in H4IIE-Rattenhepatomzellen untersucht werden. Auch hier diente die Expression des FoxO-Zielgens G6Pase zur Kontrolle der Effizienz des siRNA-Ansatzes.

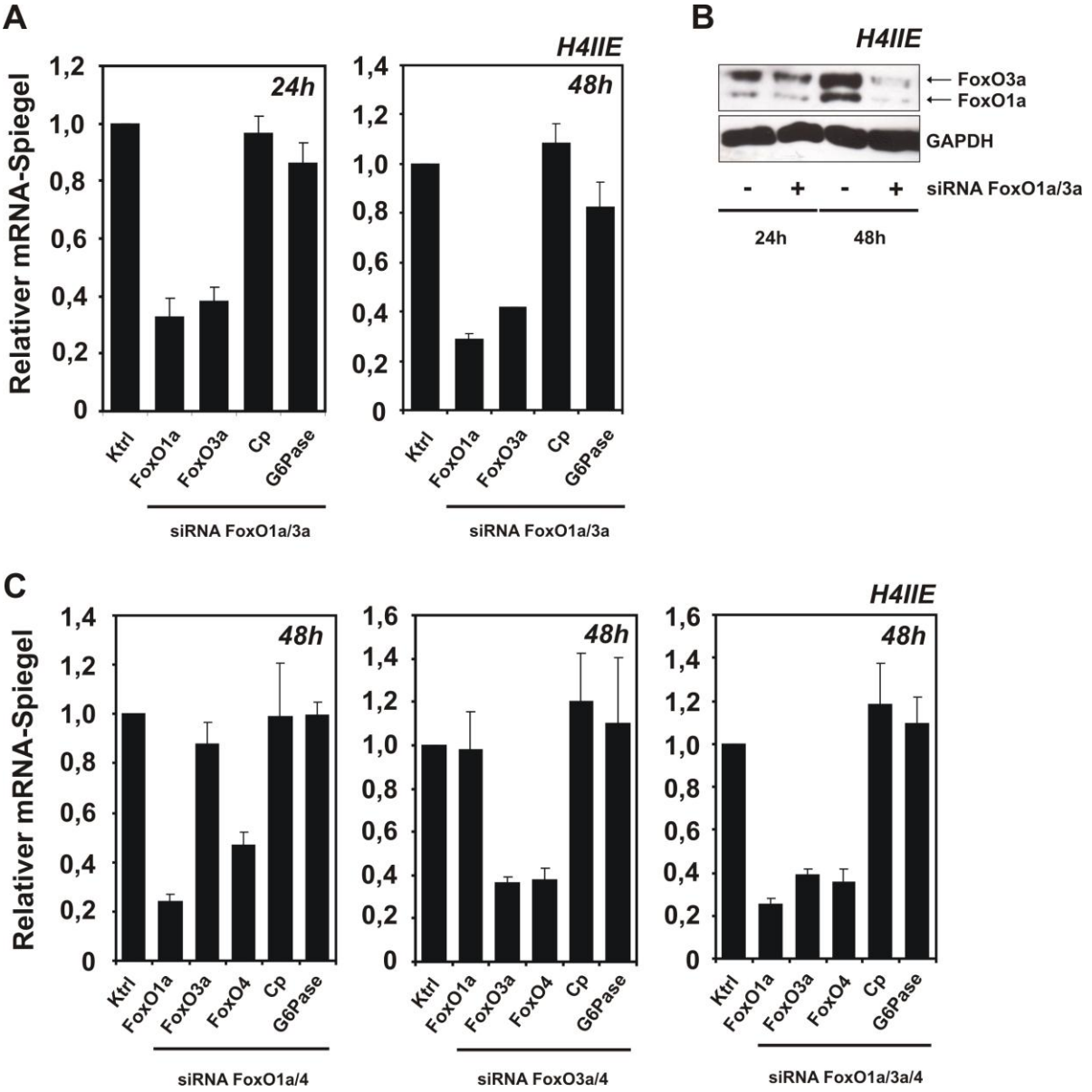

Abb 3.6: Auswirkung mittels siRNA gesenkter FoxO-Expression auf Cp-mRNA-Spiegel in H4IIE-Rattenhepatomzellen
H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden in einer Anzahl von 60.000 Zellen pro Zellkulturschale ausgebracht und kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen mit siRNA (50 nM) für FoxO1 und FoxO3 für Zeiträume von 24 h und 48 h transfiziert **(A,B)** oder in verschiedenen Kombinationen mit FoxO1-, FoxO3- und FoxO4-siRNA (je 30 nM) für 48 h behandelt **(C)**. Parallel dazu wurden Zellen in gleichen Zeitspannen äquimolar mit „non-sense siRNA transfiziert. **(B)** 50 µl des Proteinlysates wurden mittels Western-Blot unter Verwendung von Antikörpern gegen FoxO1 und FoxO3 analysiert. GAPDH diente dabei als Proteinladekontrolle. **(B,C)** Gesamt-RNA wurde isoliert und die FoxO1-, FoxO3-, FoxO4-, Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel über Realtime-RT-PCR bestimmt. Die mRNA-Spiegel dieser Gene wurden auf HPRT-1-mRNA normiert und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der mit „non-sense"-siRNA transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt (Ktrl). Die Daten repräsentieren MW ± Abweichung vom MW aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten.

Aufgrund möglicher kompensatorischer Wirkungen der FoxO Transkriptionsfaktoren, bei der ein FoxO-Faktor die Funktion eines anderen ersetzen kann (Greer et al., 2005), wurden in einem ersten Versuchsansatz FoxO1- und FoxO3-mRNA-Spiegel gleichzeitig mit Hilfe

spezifischer siRNAs reduziert. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h siRNA-Transfektion konnte eine Senkung von FoxO1- und FoxO3-mRNA-Spiegeln auf 30-40% relativ zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 3.6; A). Auf Ebene der Proteine war bereits nach 24 h siRNA-Behandlung eine leichte quantitative Abnahme von FoxO1 und FoxO3 zu erkennen, welche sich nach 48 h vollständig ausgeprägt zeigte (Abb. 3.6; B). Cp- und G6Pase-Expression blieben jedoch trotz erfolgreich gesenkter FoxO1- und FoxO3-Proteinspiegel nach 48 h siRNA-Behandlung weitestgehend unbeeinflusst.

In weiteren Experimenten wurde FoxO4 als möglicher Kompensator für Funktionen von FoxO1 und FoxO3 in Betracht gezogen. Sowohl die siRNA-regulierte Senkung der mRNA-Spiegel in der Kombination FoxO1/FoxO4 und FoxO3/FoxO4 als auch die gleichzeitige Abnahme aller drei FoxO-mRNAs auf 30-40% relativ zur Kontrolle hatte nach 48 h keinen Effekt auf die Expression von Cp und G6Pase in H4IIE-Rattenhepatomzellen (Abb. 3.6; C).

Die als Kontrolle dienenden G6Pase-mRNA-Spiegel waren durch die siRNA-Behandlung nicht gesenkt. Offensichtlich reichten FoxO-mRNA-Spiegel von etwa 30% relativ zur Kontrollsituation aus, um die Genexpression von G6Pase aufrecht zu erhalten. Somit erwies sich diese Herangehensweise zur Untersuchung von Cp als FoxO-Zielgen als ungeeignet. Aus diesem Grund sollte die Cp-Expression auf transkriptioneller Ebene mit Hilfe einer kontrollierten Aktivierung der FoxO-Proteine stimuliert werden. Dazu wurden H4IIE-Rattenhepatomzellen verwendet, welche stabil ein konditionell aktives 4-Hydroxytamoxifen (Tx)-responsives Fusionsprotein, bestehend aus FoxO1 und der Östrogenrezeptor-Hormonbindedomäne (ER-HBD), exprimierten (FKHR-ER-CC-Zellen). Dieses Fusionsprotein befindet sich in diesen Zellen, maskiert durch das Hitzeschockprotein HSP90, in einem inaktiven Zustand im Zytoplasma (Abb. 3.7; A). Die Bindung des Östrogenrezeptor-Antagonisten Tx an die ER-HBD führt zur Dissoziation des HSP90/Fusionsprotein-Komplexes und somit zur Aktivierung von FoxO1. Das aktivierte FoxO1 Protein ist nunmehr in der Lage in den Zellkern zu wandern und über die Bindung an ein DBE- oder IRE-Motiv im Promotorbereich eines Zielgens seine transkriptionelle Aktivität auszuüben.

FKHR-ER-CC Zellen wurden für 4 h mit Tx (1 µM) alleine oder in Kombination mit Insulin (100 nM) behandelt. Die Stimulation der FoxO1-Aktivität durch Tx führte zu einer rund 1,4-fachen signifikanten Steigerung der Cp-Expression auf transkriptioneller Ebene, welche bei gleichzeitiger Anwesenheit von Insulin verhindert wurde (Abb. 3.7; B). Zusätzlich wurden

neben G6Pase auch die-mRNA Spiegel des von der Leber sekretierten FoxO-regulierten Plasmaproteins SeP untersucht. Die Tx-Behandlung der Zellen resultierte in einer im Vergleich zu Cp noch stärkeren Erhöhung der mRNA-Spiegel von SeP und G6Pase, welche ebenfalls durch Insulin komplett blockiert wurde.

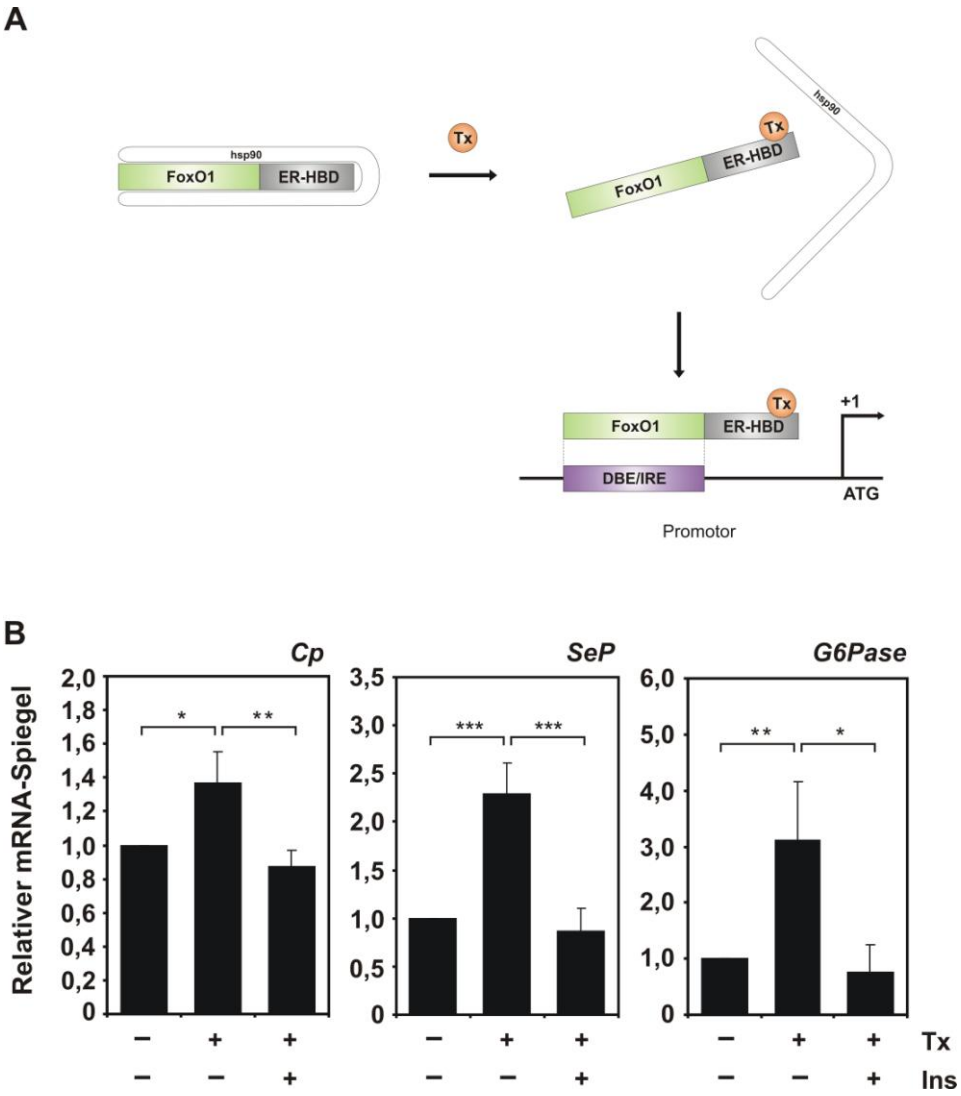

Abb 3.7: FoxO1-induzierte Cp-Expression in H4IIE-Rattenhepatomzellen
(A) Aktivierungsmechanismus des konditionell aktiven FoxO1-Östrogenrezeptor Konstrukts: Maskiert durch das Hitzeschockprotein HSP90 befindet sich das Fusionsprotein aus FoxO1 und der Östrogenrezeptor-Hormonbindedomäne (ER-HBD) in einem inaktiven Zustand im Zytoplasma. 4-Hydroxytamoxifen (Tx) bindet an die ER-HBD, was die Dissoziation des HSP90/Fusionsprotein-Komplexes und die transkriptionelle Aktivität von FoxO1 im Promotorbereich von Zielgenen zur Folge hat. **(B)** H4IIE-Rattenhepatomzellen, welche stabil ein Tx-regulierbares FoxO1-Konstrukt exprimieren (FKHR-ER-CC Zellen), wurden bis zu einer 80-90%igen Konfluenz herangezogen und über Nacht in 2 µg/ml Blasticidin S-haltigem serumfreien Medium gehalten. Daraufhin wurden die Zellen für 4 h mit Tx (1 µM) alleine oder in Kombination mit Insulin (100 nM) behandelt. Ethanol (EtOH) diente dabei als Lösemittelkontrolle. Es folgte die Isolation von Gesamt-RNA und die Analyse von Cp-, SeP- und G6Pase-mRNA-Spiegeln mittels Realtime-RT-PCR. Die berechneten Cp-, SeP- und G6Pase-mRNA-Spiegel wurden auf das Referenzgen HPRT-1 normiert und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt. Die Daten sind MW ± SD aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten, deren statistische Signifikanz über eine einseitige ANOVA mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test ermittelt wurde (*$p < 0,05$, **$p < 0,01$, ***$p < 0,001$).

Im Gegensatz zu den verwendeten Rattenzelllinien zeigten die vorherigen Daten keine Insulin-induzierte Abnahme der Cp-mRNA-Spiegel in den humanen HepG2- (Abb. 3.3; A) und Huh7-Hepatomzellen (Abb. 3.3; B). In weiteren Experimenten sollte eine mögliche FoxO-induzierte Zunahme der Cp-Expression - wie in H4IIE-Rattenhepatomzellen beobachtet (Abb. 3.7) - in HepG2-Hepatomzellen untersucht werden. Dazu wurde die Zellen transient mit FoxO1-, FoxO3- und FoxO4- Expressionsvektoren transfiziert.

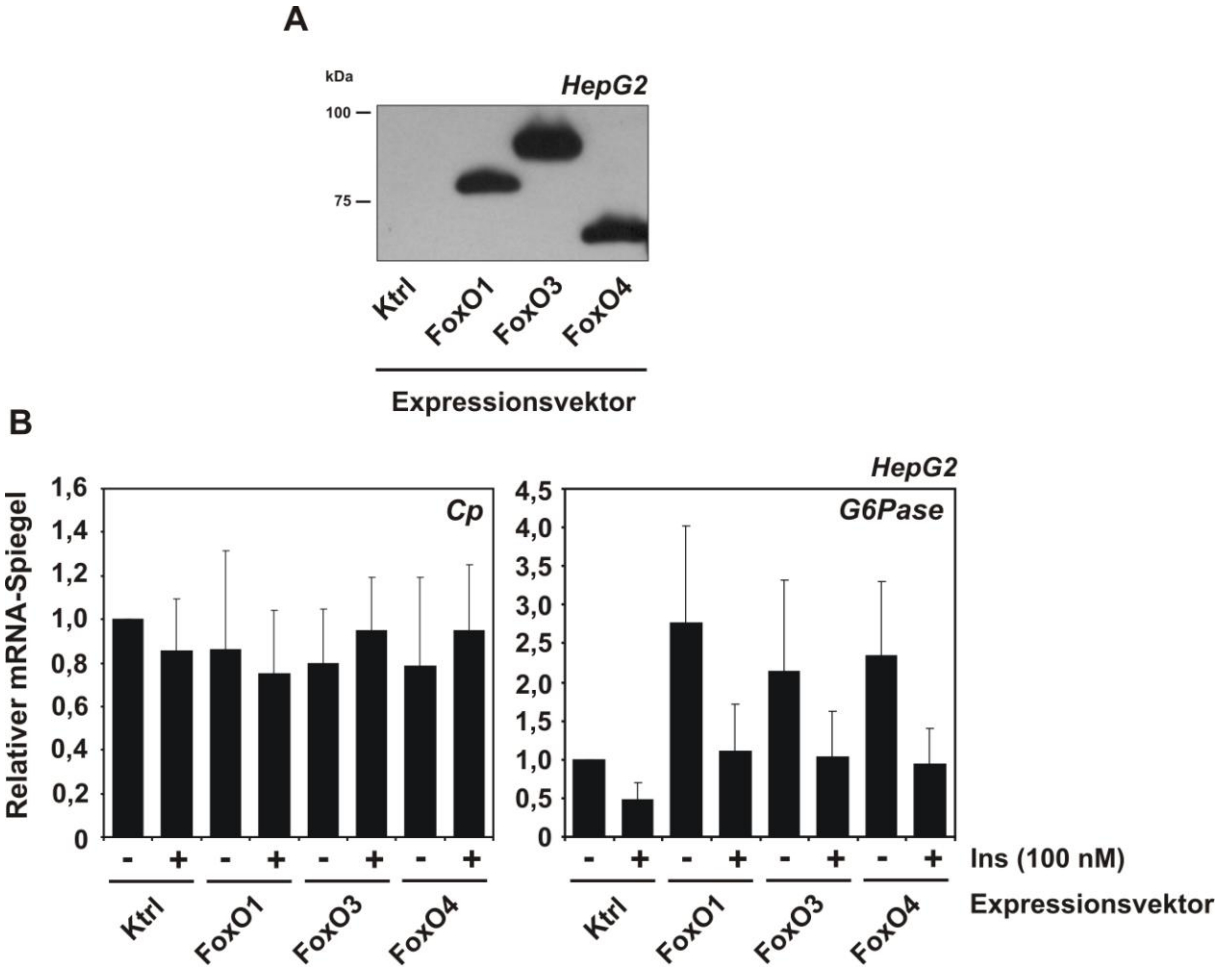

Abb 3.8: Einfluss der FoxO-Überexpression auf Cp-Expression in humanen HepG2-Hepatomzellen
Humane HepG2-Hepatomzellen wurden bis zu einer etwa 50%igen Konfluenz herangezogen und mit dem FoxO1, FoxO3 oder FoxO4 Expressionsvektor oder dem entsprechenden Leervektor (Ktrl) für 48 h transient transfiziert. Darauf folgte die Behandlung der transfizierten Zellen mit Insulin (100 nM) für weitere 8 h. **(A)** 30 µl des Proteinlysates wurden mittels Western-Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen das V5-Epitop analysiert. **(B)** Gesamt-RNA wurde isoliert und die Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel mittels Realtime-RT-PCR analysiert. Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel wurden auf die von HPRT-1 normiert und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der mit dem Leervektor transfizierten und nicht mit Insulin behandelten Zellen gleich 1 gesetzt. Die abgebildeten Daten zeigen MW ± SD aus 4 (für Cp) und 3 (für G6Pase) voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Zellen wurden für 48 h mit dem jeweiligen FoxO-Expressionsvektor transfiziert und anschließend für weitere 8 h mit Insulin (100 nM) behandelt. Für die folgenden Analysen und Experimente wurden entweder Protein- oder RNA-Lysate hergestellt. Da die exprimierten FoxO-Faktoren zusätzlich ein vom Vektor codiertes N-terminales V5-Epitop aufwiesen, bestand die Möglichkeit, sie in den Protein-Lysaten durch Western-Blot-Analyse mit Hilfe eines spezifischen V5-Antikörpers zu detektieren. Sowohl FoxO1, FoxO3 als auch FoxO4 wurden über das V5-Epitop in den Protein-Lysaten identifiziert, was auf eine erfolgreiche Transfektion der humanen HepG2-Hepatomzellen zurück zuführen war (Abb. 3.8; A). Trotz effizienter Überexpression von FoxO1, FoxO3 oder FoxO4 konnten keine eindeutigen Auswirkungen auf die Cp-mRNA-Spiegel beobachtet werden. Wie schon in Abbildung 3.3 gesehen, zeigte auch die anschließende Insulinbehandlung keinen Effekt auf die transkriptionelle Cp-Expression in humanen HepG2-Hepatomzellen (Abb. 3.8: B). Im Gegensatz dazu führte die Transfektion der Zellen mit den Expressionsvektoren FoxO1, FoxO3 oder FoxO4 zu einer relativ zur Kontrolle deutlichen 2,1-2,8-fachen Steigerung der G6Pase-mRNA-Spiegel, welche durch die Insulinbehandlung stark gehemmt wurde.

3.1.4 Modulation der Cp-Expression durch Kupferionen

In früheren Experimenten aus der Arbeitsgruppe Klotz wurde gezeigt, dass Kupferionen die PI3K/Akt-Signalkaskade und die damit verbundene Phosphorylierung und Inaktivierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren in Hepatomzellen stimulieren sowie eine von PI3K/Akt-unabhängige Senkung der G6Pase-Promotoraktivität induzieren (Walter et al., 2006). Vor diesem Hintergrund und weil mehr als 95% des Kupfers im Blut an Cp gebunden vorliegt (Sato et al., 1991), stellte sich die Frage, ob Kupferionen die transkriptionelle Regulation von Cp beeinflussen und ob die PI3K/Akt-Signalkaskade für diese Regulation von Bedeutung ist.

H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden für 16 h steigenden $CuSO_4$-Konzentrationen ausgesetzt (0,1-100 µM). Eine Abnahme der Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel war schon bei niedrigen $CuSO_4$-Konzentrationen von 0,1 und 1 µM zu beobachten, wobei der stärkste reduzierende Effekt bei 10 µM erreicht war (Abb. 3.9; A). Im Gegensatz zu den mit Insulin (100 nM) behandelten Zellen konnte jedoch bei keiner $CuSO_4$-Konzentration eine Steigerung der Akt-Phosphorylierung detektiert werden (Abb. 3.9; B). Zur Überprüfung der Zellviabilität nach $CuSO_4$-Behandlung wurde ein Zytotoxizitätstest mittels Neutralrot-Inkorporation

durchgeführt, bei dem keine toxischen Effekte der eingesetzten $CuSO_4$-Konzentrationen auf die H4IIE-Rattenhepatomzellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.9; C). Somit verläuft die durch Kupferionen induzierte Abnahme der Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel in H4IIE-Rattenhepatomzellen in PI3K/Akt-unabhängiger Weise.

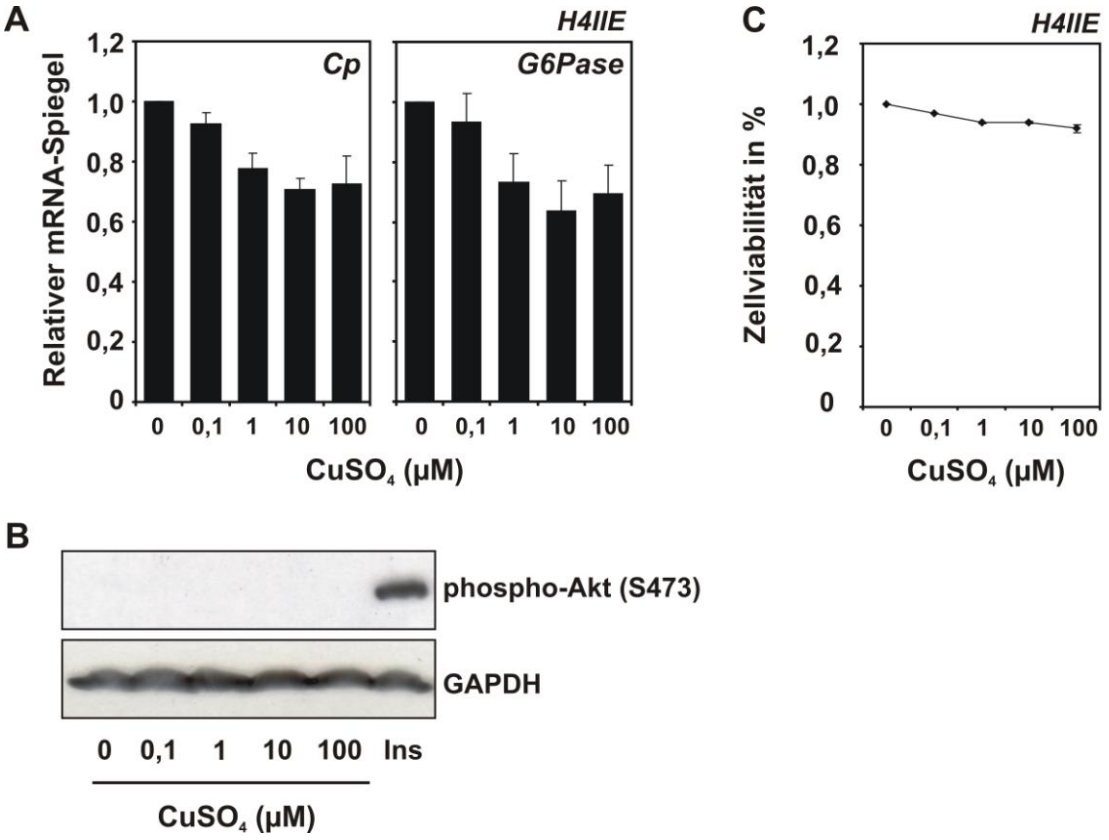

Abb 3.9: Durch Kupfer induzierte Senkung der Cp-Expression
H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden annähernd bis zur Konfluenz herangezogen und über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. Die Zellen wurden daraufhin für 16 h mit steigenden $CuSO_4$-Konzentrationen (0,1-100 µM) belastet. **(A)** Nach der Isolation von Gesamt-RNA wurden Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel mittels Realtime-RT-PCR gemessen, auf das Referenzgen HPRT-1 normiert und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt. Die gezeigten Daten sind MW ± SD aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. **(B)** 50 µl Proteinlysat wurden über Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen phosphorylierte Akt untersucht. Zusätzlich wurde ein Aliquot mit 100 nM Insulin behandelter Zellen als Positivkontrolle mitgeführt. Als Proteinladekontrolle diente abermals GAPDH. **(C)** Die mit den angegebenen $CuSO_4$-Konzentrationen belasteten Zellen wurden einem Zytotoxizitätstest mittels Neutralrot-Inkorporation unterzogen. Die Zellviabilität wurde in Relation zu den unbehandelten Zellen berechnet, welche gleich 1 gesetzt wurden. Die Daten repräsentieren MW ± Abweichung vom MW aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten.

3.2. Einfluss fettreicher Ernährung auf Cp-Bildung im *in vivo*-Maus-Modell

Übermäßige Zufuhr fettreicher Nahrung begünstigt die Entstehung einer hepatischen Insulin-Resistenz, welche eine erhöhte Glukoseproduktion und die Pathogenese von Typ 2-Diabetes mellitus (T2DM) zur Folge hat (Lam et al., 2003; van Epps-Fung et al., 1997). Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit konnten eine Insulin-abhängige Regulation der Cp-Expression auf mRNA- und Proteinebene zeigen. Vor diesem Hintergrund fokussierten die folgenden Experimente auf die Frage, inwieweit erhöhte Fettzufuhr die Insulin-vermittelte Regulation der hepatischen Cp-Synthese beeinflusst. Hierzu wurden uns dankenswerterweise von Herrn PD. Dr. Schubert und Frau Dr. Freude (Universität Köln) Leber- und Serumproben von entsprechend ernährten Mäusen zur Verfügung gestellt (vgl. Material und Methoden, Kap. 2.5), die wir im Folgenden analysiert haben.

3.2.1 Modulation der Cp-mRNA-Bildung durch fettreiche Ernährung

In einer ersten Versuchsreihe waren C57BL/6-Mäuse für 3 Monate einer Standard-Diät (5% Fettgehalt, S-Mäuse) oder einer Niedrig-Fett-Diät (15% Fettgehalt, L-Mäuse) unterzogen und nach der Tötung die Lebern entnommen worden (vgl. Material und Methoden; Kap. 2.5). Für die L-Mäuse konnte im Vergleich zu den S-Mäusen eine tendenzielle Erhöhung der hepatischen Cp-mRNA-Spiegel sowie eine signifikante, etwa 1,6-fache Steigerung der SeP-mRNA-Spiegel beobachtet werden (Abb. 3.10; A). Im Gegensatz dazu wurden hinsichtlich G6Pase Expression keine Unterschiede zwischen S- und L-Mäusen festgestellt. In einem zweiten Experiment wurden 6 Monate alte Mäuse unter 3 verschiedenen Ernährungsbedingungen gehalten: Standarddiät (5% Fettgehalt), Niedrigfett-Diät (15% Fettgehalt) und Hochfett-Diät (30% Fettgehalt, H-Mäuse). Die in diesem Experiment analysierten L-Mäuse wiesen ein ähnliches hepatisches Expressionsmuster von Cp, SeP und G6Pase auf wie die L-Mäuse der ersten Versuchsreihe (Abb. 3.10; B). SeP-mRNA-Spiegel waren bei 15% Niedrigfett-Diät deutlich um das 1,4-fache erhöht, wohingegen Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel eher schwach bis unbeeinflusst schienen. Die Analyse der Lebern der H-Mäuse ergab eine etwa 1,3-fache Zunahme der Cp und eine 1,35-fache Steigerung der SeP-Expression. Zudem konnte eine signifikante Abnahme der G6Pase-mRNA-Spiegel auf 60% im Vergleich zu den S-Mäusen beobachtet werden.

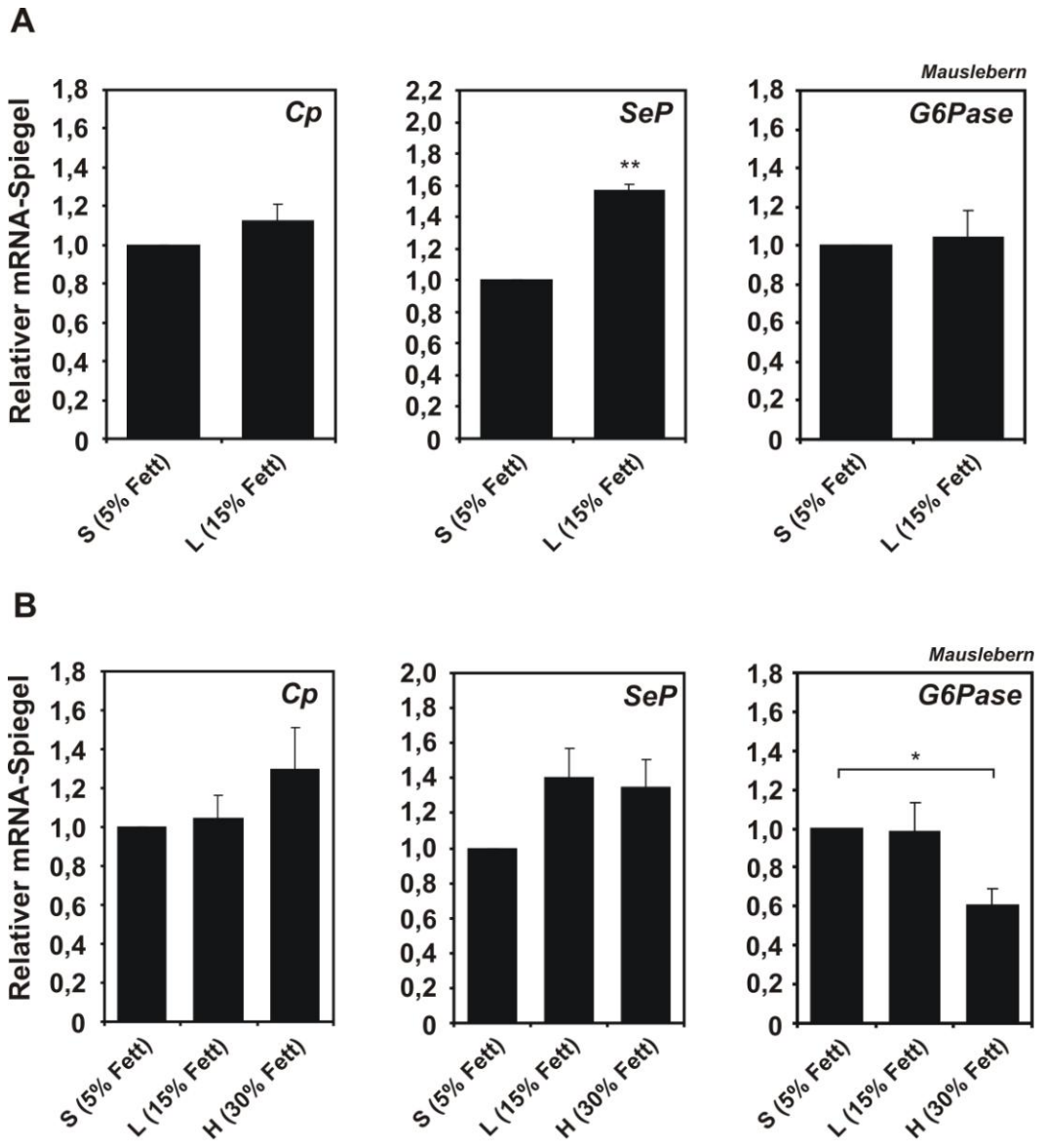

Abb 3.10: Fettzufuhr im Übermaß induziert Cp Expression
C57BL/6-Mäuse waren für **(A)** 3 Monate oder **(B)** 6 Monate einer Standarddiät (S; 5% Fett), einer Niedrigfett-Diät (L; 15% Fett) oder einer Hochfett-Diät (H; 30% Fett) unterzogen, getötet und die Lebern entnommen worden (vgl. Material und Methoden; Kap. 2.5). Nach der Isolation von Gesamt-RNA wurden Cp-, SeP- und G6Pase- mRNA-Spiegel mittels Realtime-RT-PCR gemessen, auf HPRT-1-mRNA normiert und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der S-Mäuse gleich 1 gesetzt. Die Daten, deren statistische Signifikanz über eine einseitige ANOVA und einen anschließenden Student-Newman-Keuls-Test ermittelt wurde (*$p < 0,05$, **$p < 0,01$), sind MW ± SEM von jeweils 5 S- und L-Mäusen **(A)** und 11 S-, L- und H-Mäusen **(B)**.

In diesem Zusammenhang wurde auch der mögliche Einfluss der 6-monatigen Hochfett-Ernährung auf die hepatischen mRNA-Spiegel der verschiedenen Foxo-Transkriptionsfaktoren untersucht. Weder für Foxo1 noch für Foxo3 konnte bei den H-Mäusen auf Ebene der mRNA ein relevanter Unterschied zu den S-Mäusen festgestellt

werden (Abb. 3.11). Foxo4-mRNA konnte in den Lebern nicht in ausreichender Menge detektiert werden, so dass keine Auswertung möglich war.

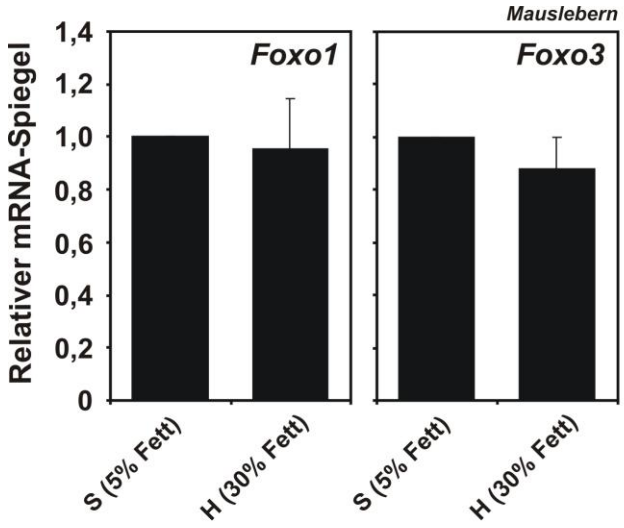

Abb 3.11: Effekt einer Hochfett-Diät auf hepatische Foxo-mRNA-Spiegel
C57BL/6-Mäuse waren für 6 Monate mit einem Fettgehalt von 5% (S) oder 30% (H) ernährt und nach der Tötung die Lebern präpariert worden (vgl. Material und Methoden; Kap. 2.5). Gesamt-RNA wurde isoliert und Foxo1- mRNA sowie Foxo3-mRNA-Spiegel über Realtime-RT-PCR ermittelt. Es folgte die Normierung auf das Referenzgen HPRT-1, und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der S-Mäuse wurden gleich 1 gesetzt. Die Daten repräsentieren MW ± SEM von jeweils 11 S- und H-Mäusen.

3.2.2 Auswirkung einer Hochfett-Diät auf Cp-Spiegel im Serum

Inwieweit sich die erhöhten hepatischen Cp-mRNA-Spiegel der für 6 Monate mit 30% Hochfett-Ernährung gehaltenen C57BL/6-Mäuse auf die Cp-Proteinebene auswirkten, sollte durch die Analyse der entsprechenden Mausseren gezeigt werden. Dazu wurden die Seren der S- und H-Mäuse in einem Verdünnungsverhältnis von 1:20 mittels Western-Blot und einem spezifischen Antikörper gegen Cp analysiert. Als Referenz diente das ebenfalls von der Leber sekretierte Protein Albumin, welches in einem separaten Ansatz 1:80 vorverdünnt und letztlich in einem Verhältnis von 1:1600 aufgetragen wurde. Die densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen ergab eine deutliche etwa 1,4-fache Steigerung der Cp-Spiegel im Serum der H-Mäusen im Vergleich zu den S-Mäusen (Abb. 3.12; A). Dabei wiesen 8 der untersuchten Seren der H-Mäuse einen erhöhten und 3 einen erniedrigten Cp Spiegel relativ zu den S-Mäusen auf (Abb. 3.12; B).

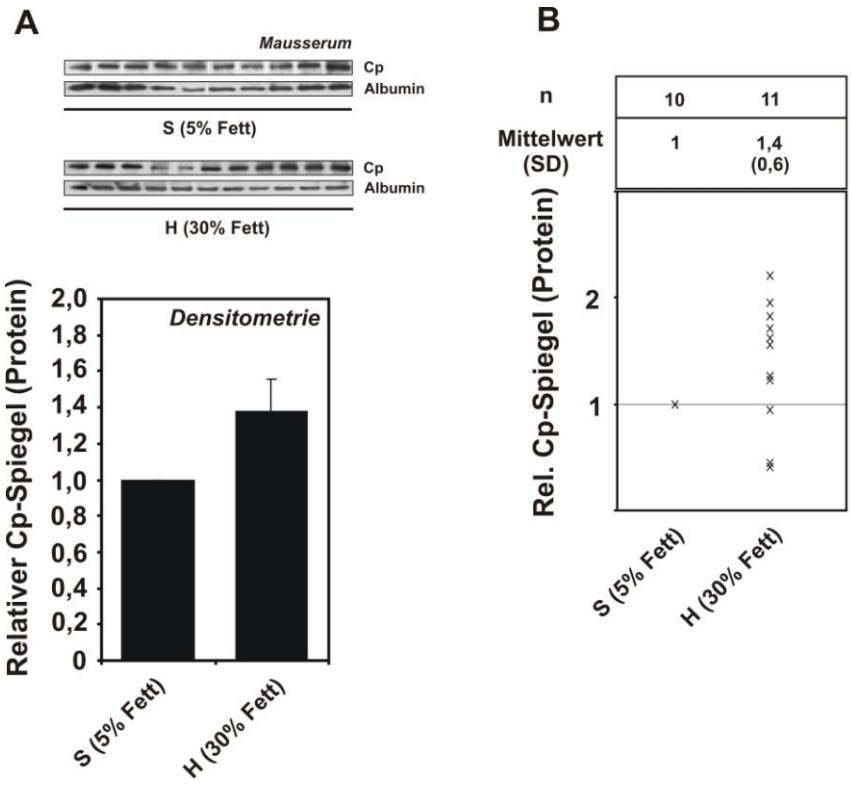

Abb 3.12: Gesteigerte Cp-Spiegel im Serum nach Hochfett-Ernährung
C57BL/6-Mäuse waren für 6 Monate einer Standarddiät (S; 5% Fett) oder einer Hochfett-Diät (H; 30% Fett) unterzogen, getötet und Blutproben entnommen worden (vgl. Material und Methoden; Kap. 2.5). **(A)** Die aus dem Blut der Mäuse gewonnenen Seren wurden im Verhältnis 1:20 verdünnt und unter Verwendung eines Antikörpers gegen Cp einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Parallel dazu wurden die Seren der einzelnen Mäuse 1:80 vorverdünnt und in einem separaten Western-Blot-Experiment im Verhältnis 1:1600 auf Albumin als Referenz analysiert. Die Serumproben der S- und H-Mäuse wurden getrennt voneinander auf verschiedene SDS-Gele geladen, wobei ein Aliquot der H-Mäuse zum densitometrischen Abgleich von Cp und Albumin zusammen mit den Seren der S-Mäuse aufgetragen wurde. Die densitometrisch ausgewerteten Daten sind MW ± SEM von 10 S-Mäusen und 11 H-Mäusen. **(B)** Dargestellt ist die Verteilung der in **(A)** densitometrisch berechneten Cp- Proteinspiegel in den Seren der einzelnen H-Mäuse relativ zu den S-Mäusen.

Hochfett-Ernährung induziert die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der Leber und im Fettgewebe (Matsuzawa-Nagata et al., 2008). ROS oxidieren Proteine, wodurch vermehrt Carbonylfunktionen an den Aminosäureseitenketten und im Proteinrückgrat entstehen. Der Nachweis der Bildung solcher Carbonylgruppen erfolgte nach ihrer Derivatisierung zu einem Epitop über Western-Blot-Analyse mit Hilfe eines das entstehende Epitop erkennenden Antikörpers (vgl. Material und Methoden; 2.6.3). Darauf basierend sollten die Seren der S- und H-Mäuse auf ihren Gehalt an oxidierten Proteinen untersucht werden, um eventuelle Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress und erhöhten Cp-Spiegeln im Serum herstellen zu können.

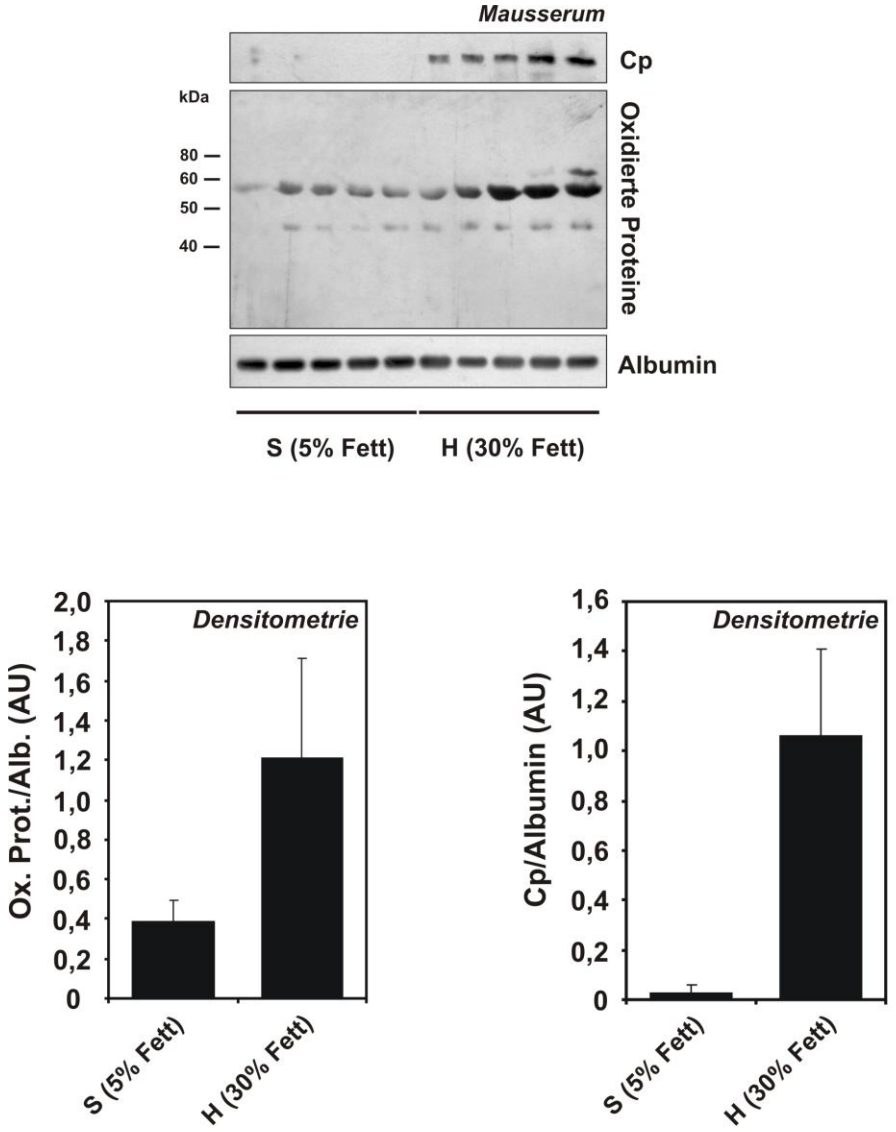

Abb 3.13: Korrelation erhöhter Spiegel von oxidierten Proteinen und Cp im Serum nach Hochfett-Diät
C57BL/6-Mäuse waren für 6 Monate mit einem Fettgehalt von 5% (S) oder 30% (H) ernährt, getötet und Blutproben entnommen worden (vgl. Material und Methoden; Kap. 2.5). Zunächst wurde die Albuminmenge mit Hilfe spezifisch Albumin depletierender Säulen aus jeweils 25 µl der gewonnen Seren reduziert und die Seren anschließend mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) für 30 min derivatisiert. 80 µl der derivatisierten Proben wurden für den nachfolgenden Western-Blot im Verhältnis 1:96 eingesetzt und unter Verwendung eines Antikörpers gegen αDNP-konjugierte Proteine auf oxidierte Proteine analysiert. Darauf folgte die Entfernung der zuvor verwendeten Antikörper (vgl. Material und Methoden; Kap. 2.6.8) und anschließend die Inkubation der PVDF-Membran mit einem Antikörper gegen Cp. Parallel wurden nicht-derivatisierte Aliquots der Seren der einzelnen Mäuse im Verhältnis 1:1200 einem Western-Blot unter der Verwendung eines Antikörpers gegen Albumin unterzogen, welches als Referenz für die densitometrischen Berechnungen diente. Die Daten repräsentieren MW ± SD von jeweils 5 S- und H-Mäusen.

Zuerst wurden in jeweils 5 Serenproben der S- und H-Mäuse die prozentual enorm großen Albuminmengen unter Verwendung spezifisch Albumin depletierender Säulen reduziert, um die Versuchsbedingungen zu optimieren und eine genauere densitometrische Analyse zu ermöglichen (vgl. Material und Methoden; Kap. 2.6.3). Daraufhin wurden die Seren mit 2,4-

Dinitrophenylhydrazin (DNPH) derivatisiert und anschließend in einem Verdünnungsverhältnis von 1:96 einem Western-Blot unterzogen. Die Immnunodetektion mit einem spezifischen Antikörper gegen αDNP-konjugierte Proteine zeigte eine etwa 3-fache Zunahme von oxidierten Proteinen bei den H-Mäusen im Vergleich zu den S-Mäusen (Abb. 3.13). Im Anschluss konnten auf der selben PVDF-Membran nach Entfernung der zuvor verwendeten Antikörper (vgl. Material und Methoden; Kap. 2.6.8) in den Serenproben der H-Mäuse nach erneuter Inkubation mit einem Cp spezifischen Antikörper stark erhöhte Cp Spiegel relativ zu den S-Mäusen beobachtet werden. Die in allen Proben gleichermaßen reduzierten Albuminspiegel dienten auch hier als Referenz zum densitometrischen Abgleich und wurden parallel in einem Verhältnis von 1:1200 in einer separaten Western-Blot-Analyse untersucht.

3.3. Wirkung von Metformin auf die Cp-Biosynthese

Der Arzneistoff Metformin wird in der Therapie gegen T2DM eingesetzt und reduziert unter anderem die hepatische Glukoseproduktion durch PI3K/Akt-unabhängige Senkung der G6Pase-Expression auf transkriptioneller Ebene (Morioka et al., 2005). Aufgrund der Parallelen in der von Insulin- und FoxO-abhängigen transkriptionellen Regulation der Genexpression zwischen Cp und G6Pase sollte die Wirkung von Metformin und AICAR (vgl. Einleitung; Kap. 1.6) auf Cp-mRNA-Spiegel untersucht werden.

H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden für 12 h mit Metformin (2 mM) oder AICAR (125 µM) behandelt. Sowohl Metformin als auch AICAR bewirkten eine signifikante Abnahme der Cp-mRNA-Spiegel um 25-30% gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.14). Auch die G6Pase-Expression war durch Metformin-Behandlung um 60% und durch AICAR um etwa 35% zur Kontrolle gesenkt. Obwohl eine Modulation von SeP-mRNA-Spiegeln durch Metformin in primären Ratten Hepatozyten bereits beschrieben worden war (Speckmann et al., 2009), zeigte Metformin in H4IIE-Rattenhepatomzellen keinen Effekt auf die SeP-Expression. Nach AICAR-Behandlung hingegen waren die SeP-mRNA-Spiegel deutlich jedoch nicht signifikant gesenkt.

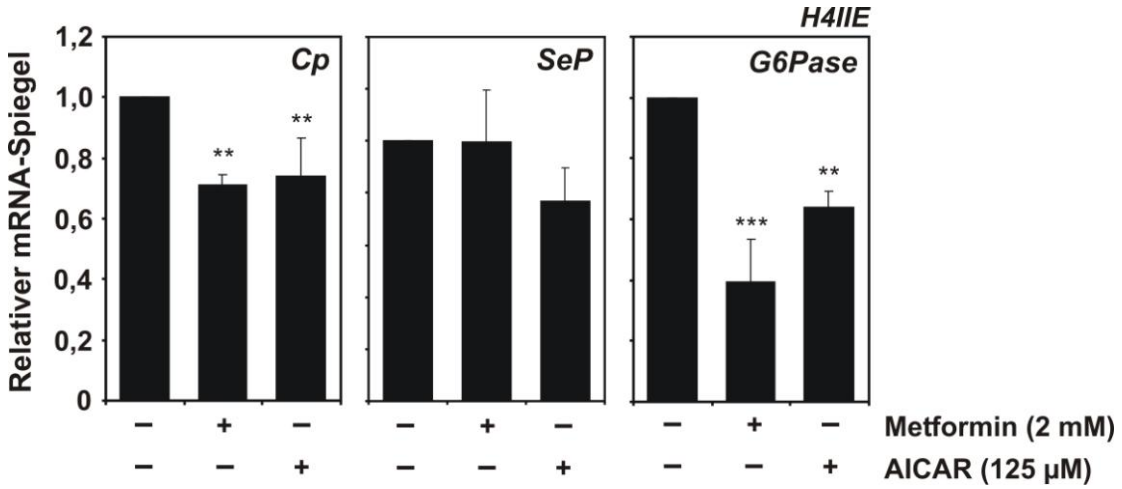

Abb 3.14: Durch Metformin oder AICAR induzierte Abnahme der Cp-Expression in H4IIE-Rattenhepatomzellen
H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% herangezogen und über Nacht in serumfreiem Medium gehalten. Daraufhin folgte die Behandlung der Zellen mit Metformin (2 mM) oder AICAR (125 µM) für 12 h. Nach der Isolation von Gesamt-RNA wurden Cp-, SeP- und G6Pase-mRNA-Spiegel mittels Realtime-RT-PCR gemessen, auf das Referenzgen HPRT-1 normiert und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt. Die Daten sind MW ± SD aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz zwischen den entsprechenden Gruppen wurde über eine einseitige ANOVA und anschließendem Student-Newman-Keuls-Test berechnet (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

Wie bereits erwähnt, reguliert Metformin die G6Pase-Expression in PI3K/Akt-unabhängiger Weise. H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden über einen Zeitraum von 4 h mit unterschiedlichen Metforminkonzentrationen (0,1-2 mM) behandelt und die Protein-Lysate mittels Western-Blot auf phosphorylierte Akt untersucht. Im Gegensatz zur Insulinbehandlung (100 nM) konnte bei keiner Konzentration eine Phosphorylierung der Akt festgestellt werden (Abb. 3.15). Dies bestätigt, dass auch unter den vorliegenden Versuchsbedingungen die PI3K/Akt-Kaskade nicht an den Effekten von Metformin beteiligt war.

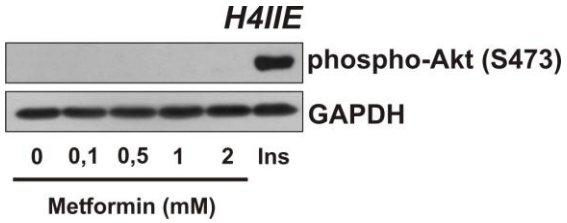

Abb 3.15: Wirkung von Metformin auf Akt in H4IIE-Rattenhepatomzellen
H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% herangezogen und über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen für 4 h mit unterschiedlichen Metforminkonzentrationen (0,1-2 mM) oder mit Insulin (100 nM) behandelt. Die Zellen wurden lysiert und jeweils 25 µl Proteinlysat mittels Western-Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen phosphorylierte Akt analysiert. GAPDH diente dabei als Proteinladekontrolle.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die beobachtete Metformin-verursachte Abnahme der Cp-mRNA-Spiegel in H4IIE-Rattenhepatomzellen in primären Rattenhepatozyten nachweisbar ist. Da Hyperglykämie in diabetischen Ratten die hepatische G6Pase-Expression stimuliert (Massillon et al., 1996), stellte sich zudem die Frage, ob die Cp-Expression durch erhöhte Glukosekonzentration beeinflusst wird. Weiterhin sollten die Zellüberstände auf ihren Gehalt an Cp-Protein nach Metformin-Behandlung bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen analysiert werden.

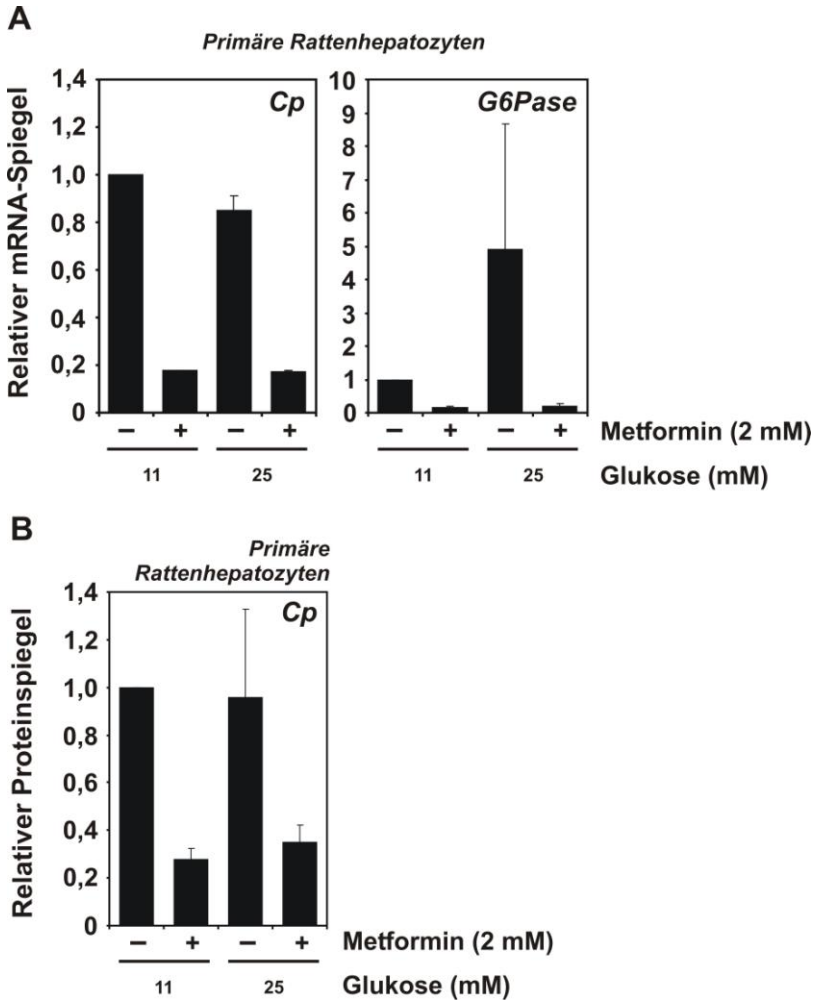

Abb 3.16: Durch Metformin-vermittelte Abnahme der Cp-Expression in primären Rattenhepatozyten
Kultivierte primäre Rattenhepatozyten wurden über Nacht in serumfreiem Medium bei Glukosekonzentrationen von 11 mM oder 25 mM gehalten und anschließend für 24 h unter der gleichen Glukosekonzentration wie zuvor über Nacht mit Metformin (2 mM) behandelt. **(A)** Gesamt-RNA wurde isoliert, Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel mittels Realtime-RT-PCR analysiert und auf HPRT-1-mRNA-Spiegel normiert. Die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der unbehandelten Zellen bei 11 mM Glukose wurden gleich 1 gesetzt. Die Daten sind MW ± SD aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. **(B)** Die Überstände der mit Metformin behandelten und unbehandelten Zellen bei 11 mM und 25 mM Glukose wurden gesammelt, in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt und einem Ratten-Cp-spezifischen ELISA unterzogen. Auch hier wurden die Cp-Proteinspiegel in den Überständen der unbehandelten Zellen bei 11 mM Glukose gleich 1 gesetzt. Die abgebildeten Daten repräsentieren MW ± SD aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Primäre Rattenhepatozyten wurden bei 11 mM oder 25 mM Glukose im Zellkulturmedium für 24 h mit Metformin (2 mM) behandelt. Bei beiden Glukosekonzentrationen konnte nach Metformin-Behandlung eine drastische Abnahme der Cp-mRNA-Spiegel um mehr als 80% gegenüber der Kontrolle beobachtet werden (Abb. 3.16; A). Auch in Abwesenheit von Metformin wurde eine - wenn auch schwache - Senkung der Cp-Expression durch Erhöhung der Glukosekonzentration auf 25 mM im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Hinsichtlich G6Pase-mRNA-Spiegel bewirkte die Anwesenheit von Metformin bei 11 mM sowie 25 mM Glukose eine ähnlich starke Senkung von über 80% zur Kontrolle. In Abwesenheit von Metformin induzierten die enorm hyperglykämischen Bedingungen von 25 mM hingegen eine sehr deutliche 5-fache Steigerung der G6Pase-mRNA-Spiegel. In den folgenden Experimenten sollten die Auswirkungen der Metformin-induzierten Abnahme der Cp-mRNA-Spiegel bei 11 mM und 25 mM Glukose im Medium auf Cp-Proteinebene analysiert werden. Dazu wurden die entsprechenden Zellüberstände im Verhältnis 1:5 vorverdünnt, und einem Ratten-Cp-spezifischen ELISA („Enzyme-linked immunosorbent assay“) unterzogen. Tatsächlich führte die Metformin-Behandlung zu einer Senkung der Cp-Proteinspiegel in den Überständen von etwa 70% bei 11 mM Glukose und 65% bei 25 mM Glukose relativ zur Kontrolle (Abb. 3.16; B). Die stark hyperglykämischen Bedingungen von 25 mM zeigten in Abwesenheit von Metformin keinen Effekt auf die Cp-Proteinmengen im Vergleich zu 11 mM Glukose.

3.4. Regulation der FoxO-Expression

Die bisherigen Ergebnisse zeigten eine Insulin- und Metformin-induzierte Regulation der Cp-Expression auf mRNA- und Proteinebene in H4IIE-Rattenhepatomzellen sowie primären Rattenhepatozyten. Aufgrund der beobachteten Beteiligung von FoxO1 an dieser Regulation (Abb. 3.8; B) sollte der Fokus der nächsten Experimente auf mögliche regulatorische Effekte von Insulin und Metformin auf FoxO-Transkriptionsfaktoren gerichtet werden.

Dazu wurden in einer ersten Versuchsreihe H4IIE-Rattenhepatomzellen für 7 h mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (10-500 nM) behandelt, was zu einer Abnahme der FoxO1- und FoxO3- mRNA-Spiegel um rund 40% relativ zur Kontrolle führte (Abb. 3.17; A). FoxO4 Expression zeigte sich mit einer Senkung von 50-60% gegenüber der

Kontrollsituation bei den verwendeten Insulinkonzentrationen sogar noch deutlicher moduliert.

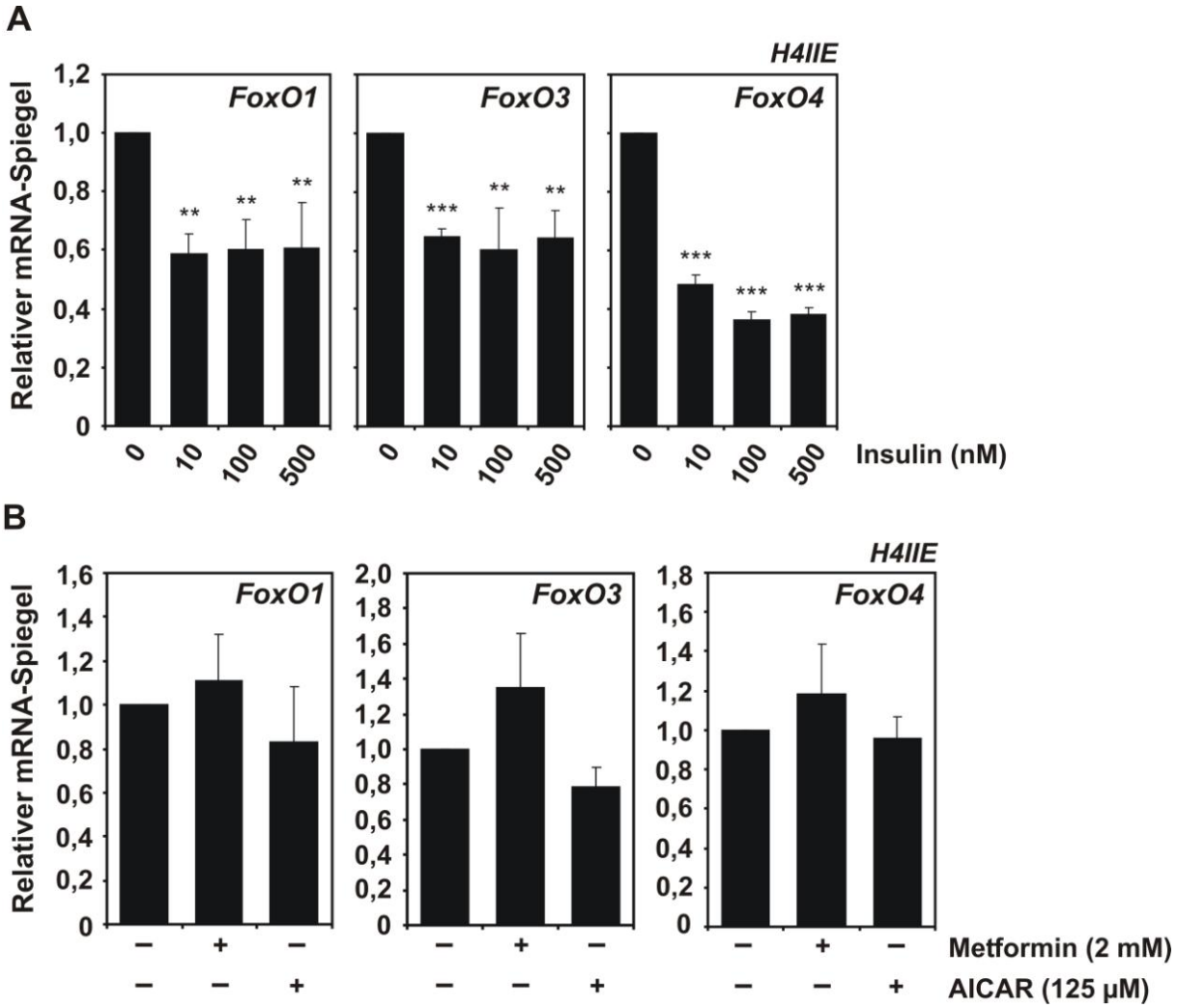

Abb 3.17: Modulation der FoxO-mRNA-Spiegel durch Insulin, Metformin und AICAR in H4IIE-Rattenhepatomzellen
H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% herangezogen und über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. **(A)** Die Zellen wurden für 7 h unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (10-500 nM) ausgesetzt, lysiert und in der Folge Gesamt-RNA isoliert. FoxO1-, FoxO3- und FoxO4-mRNA-Spiegel wurden über Realtime-RT-PCR ermittelt, auf das Referenzgen HPRT-1 normiert und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt. Die Daten zeigen MW ± SD aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten, deren statistische Signifikanz über eine einseitige ANOVA und einem darauf folgenden Student-Newman-Keuls-Test ermittelt wurde (**$p < 0,01$, ***$p < 0,001$). **(B)** Es folgte die Behandlung der Zellen mit Metformin (2 mM) oder AICAR (125 µM) für 12 h. Gesamt-RNA wurde isoliert und FoxO1-, FoxO3-und FoxO4-mRNA-Spiegel mittels Realtime-RT-PCR gemessen. Daraufhin wurden die FoxO-mRNA-Spiegel auf HPRT-1-mRNA-Spiegel normiert und die als Kontrolle dienenden normierten mRNA-Spiegel der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt. Die Daten sind MW ± SD aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde über eine einseitige ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test ermittelt (*$p < 0,05$).

Zur Untersuchung einer Wirkung von Metformin und AICAR auf FoxO1-, FoxO3- und FoxO4-mRNA-Spiegel wurden H4IIE-Rattenhepatomzellen für 12 h mit Metformin (2 mM) oder AICAR (125 µM) behandelt. Die Metformin-Behandlung resultierte in einer schwachen aber deutlichen Erhöhung aller 3 FoxO-mRNA-Spiegel, wobei FoxO3-Expression sogar signifikant um das 1,35-fache relativ zur Kontrolle gesteigert war (Abb. 3.17; B). Eine schwache Abnahme der Expression konnte für FoxO1 und FoxO3 nach AICAR-Behandlung beobachtet werden, wobei FoxO4-mRNA-Spiegel weitestgehend unbeeinflusst blieben.

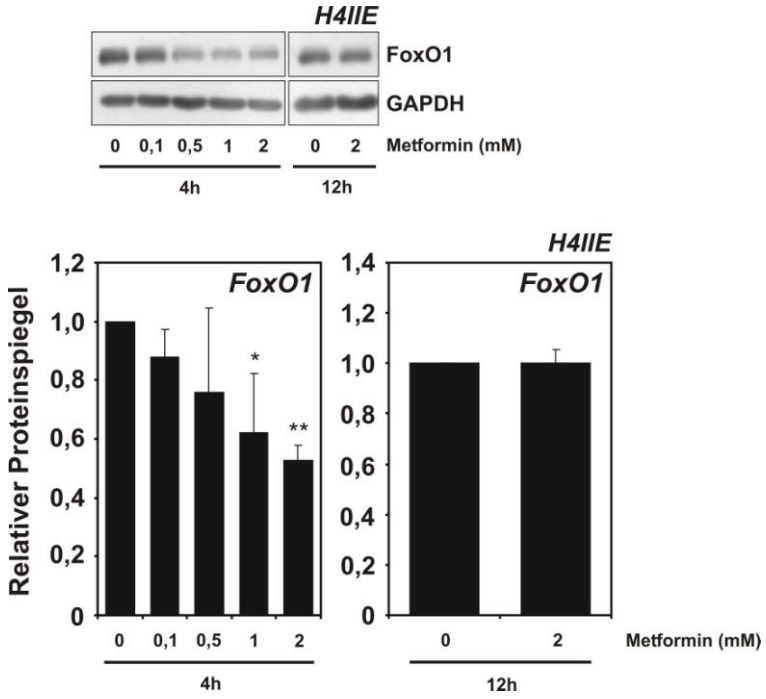

Abb 3.18: Durch Metformin induzierte Senkung der FoxO1-Proteinspiegel in H4IIE-Rattenhepatomzellen
H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% herangezogen und über Nacht in serumfreiem Medium gehalten. Am Folgetag wurden die Zellen für 4 h mit verschiedenen Metformin-Konzentrationen (0,1-2 mM) behandelt und anschließend lysiert. Zusätzlich wurden H4IIE-Rattenhepatomzellen für 12 h einer Konzentration von 2 mM Metformin ausgesetzt und ebenfalls lysiert. Jeweils 25 µl Proteinlysat wurden mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen FoxO1 untersucht. GAPDH diente als Proteinladekontrolle. Die relativen Proteinspiegel wurden densitometrisch ermittelt, wobei die FoxO1-Spiegel in den Lysaten der unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt wurden. Die abgebildeten Daten repräsentieren MW ± SD aus 4 (4 h Behandlung) und 3 (12 h Behandlung) voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde über eine einseitige ANOVA und nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test bestimmt (*$p < 0,05$**$p < 0,01$).

Die durch Metformin-Behandlung leicht gesteigerten FoxO-mRNA-Spiegel (Abb. 3.17; B) führten zu der Frage, ob Metformin in diesem Zusammenhang auch einen Effekt auf die FoxO-Proteinebene hat.

Dazu wurden H4IIE-Rattenhepatomzellen zunächst für 4 h mit unterschiedlichen Metforminkonzentrationen (0,1-2 mM) behandelt. Dabei konnte eine dosisabhängige Abnahme der FoxO1-Proteinspiegel mittels Western-Blot-Analyse beobachtet werden, welche schon bei niedrigen Konzentrationen von 0,1 mM und 0,5 mM Metformin deutlich einsetzte (Abb. 3.18). Ab einer Konzentration von 1 mM Metformin zeigte sich bereits eine signifikante Senkung der FoxO1-Proteinspiegel, welche bei 2 mM etwa 50% relativ zur Kontrolle betrug. Nach Behandlung der Zellen mit 2 mM Metformin über einen längeren Zeitraum von 12 h konnten keine Unterschiede mehr zwischen den FoxO1-Proteinspiegeln von Behandlung und Kontrolle festgestellt werden. Die Senkung der FoxO-Spiegel ist also transient.

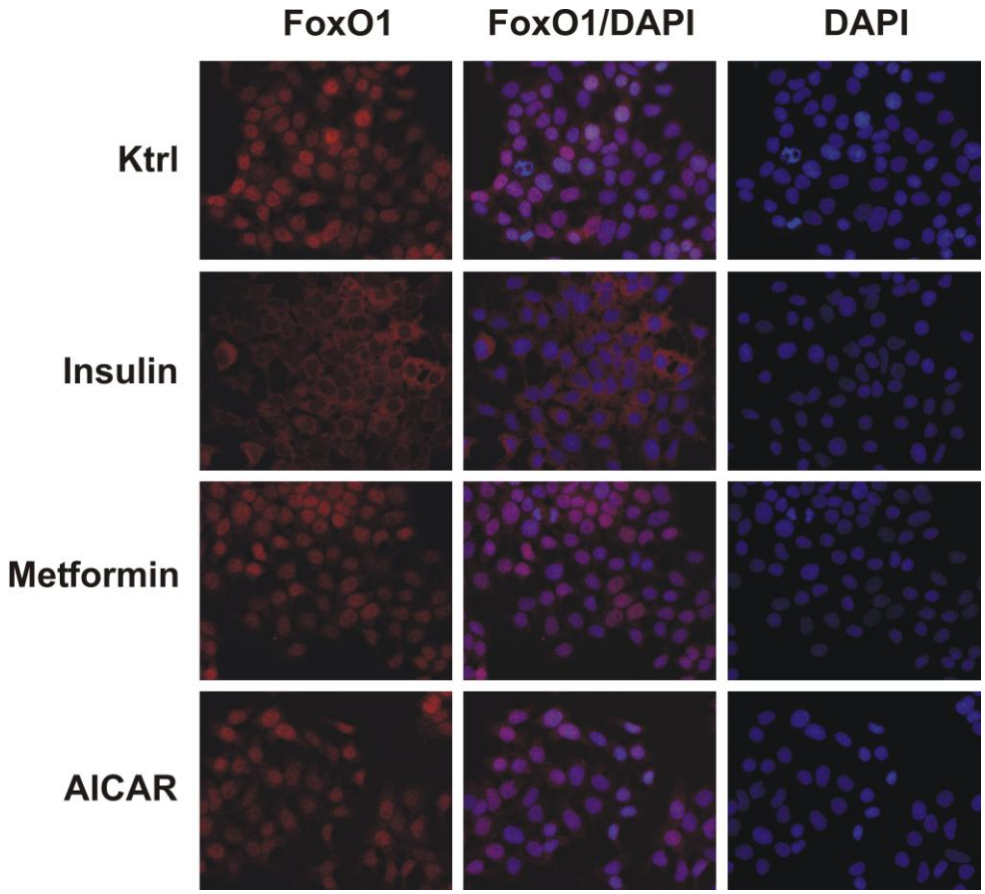

Abb 3.19: Einfluss von Insulin, Metformin und AICAR auf die subzelluläre Verteilung von FoxO1 in H4IIE-Rattenhepatomzellen
H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% herangezogen, über Nacht in serumfreiem Medium gehalten und für 4 h mit Insulin (100 nM), Metformin (2 mM) oder AICAR (125 µM) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd fixiert und unter Verwendung eines Antikörpers gegen FoxO1 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Fluoreszenzbilder repräsentieren 3 voneinander unabhängige Experimente.

Insulin induziert die Phosphorylierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren und deren anschließenden Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Brunet et al., 1999). Aufgrund der beobachteten Modulationen von FoxO1-mRNA und Proteinspiegeln durch Metformin stellte sich die Frage, ob Metformin oder AICAR auch eine Wirkung auf diese Translokation von FoxO-Faktoren ausübt.

H4IIE-Rattenhepatomzellen wurden für 4 h mit Insulin (100 nM), Metformin (2 mM) oder AICAR (125 µM) behandelt und die Lokalisation von FoxO1 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Insulinbehandlung führte zu einer Exklusion von FoxO1 aus dem Zellkern ins Zytosol, wohingegen weder Metformin noch AICAR eine Wirkung auf die Lokalisation von FoxO1 zeigten (Abb. 3.19).

4. Diskussion

4.1 Regulation der hepatischen Bildung von Cp durch Insulin

Die Expression des hepatischen Plasmaproteins SeP wird über die Insulin-induzierte PI3K/Akt/FoxO-Signalkaskade reguliert (Walter et al., 2008). Aufgrund einiger Gemeinsamkeiten zwischen SeP und dem ebenfalls von der Leber sekretierten Cp hinsichtlich Herkunft und Funktion, sollte untersucht werden, ob die Expression von Cp auch einer Insulin-induzierten Kontrolle unterliegt. Zudem sollte die mögliche Beteiligung der PI3K/Akt/FoxO-Kaskade bei dieser Regulation analysiert werden.

In den ersten Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte die Insulin-induzierte Regulation der hepatischen Cp-Bildung in H4IIE-Rattenheptomzellen und primären Rattenhepatozyten gezeigt werden. So wurde in beiden genannten Zelllinien eine Abnahme der Cp-mRNA-Spiegel nach Insulinbehandlung festgestellt (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.1; Abb. 3.2). In Folge dessen zeigten sich auch die Cp-Spiegel in den Überständen der primären Rattenhepatozyten gesenkt (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.2).
Der spezifische und irreversible PI3K-Inhibitor Wortmannin blockierte die Insulin-induzierte Abnahme der Cp-Expression in H4IIE-Rattenheptomzellen komplett (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.4). Dies deutete auf eine Beteiligung der PI3K/Akt-Kaskade bei dieser Regulation hin. Eine vollständige Blockade des Insulineffekts war jedoch nur unter regelmäßigem Austausch des Inhibitors zu beobachten. Möglicherweise war dies auf die kurze Halbwertszeit von Wortmannin zurück zuführen, die in diversen Standard-Zellkulturmedien bei 8-13 min liegt (Holleran et al., 2003). Mit LY-294002 wurde ein reversibler PI3K-Inhibitor verwendet, der jedoch unter gleichen Versuchsbedingungen eine deutlich schwächere Hemmung der Akt-Phosphorylierung und der daraus resultierenden Senkung der Cp- und G6Pase-Expression bewirkte (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.4). Ob der Unterschied in der Effizienz der beiden PI3K-Inhibitoren mit ihren Wirkmechanismen zusammenhängt, ist nicht bekannt. Generell wirkte sich der Insulinsignal-blockierende Effekt beider Inhibitoren stärker auf die Cp- als auf die G6Pase-Expression aus. Offenbar sind neben der PI3K/Akt-Kaskade weitere insulinresponsive Signalwege an der Regulation der G6Pase-Expression beteiligt, so dass eine breite Steuerung der Glukoneogenese ermöglicht wird. In diesem Zusammenhang wurde die durch Insulin aktivierbare MAPK/ERK-Kaskade als Alternativweg zur PI3K/Akt-Kaskade für die Kontrolle der G6Pase-Expression beschrieben (Nguyen et al., 2007; Schmoll et al., 2001).

Zur Untersuchung von Cp als FoxO-Zielgen erwiesen sich die zuerst durchgeführten siRNA-Experimente als ungeeignet. Obgleich die siRNA-induzierte Senkung der jeweiligen FoxO-mRNA-Spiegel auf etwa 30-40% zur Kontrolle im vom siRNA-Hersteller ausgegebenen Optimalbereich lag, und obwohl die Abnahme der FoxO-mRNA-Spiegel eine drastische Senkung der FoxO-Proteinspiegel zur Folge hatte, reichten die verbleibenden FoxO-Proteinmengen offenbar jedoch aus, um die als Kontrolle dienende G6Pase-Expression aufrecht zu erhalten (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.6). Somit konnte die Expression von FoxO-Zielgenen unter Durchführung der siRNA-Experimente nicht moduliert werden. In einer anderen Herangehensweise konnte Cp tatsächlich als FoxO-Zielgen identifiziert werden. Dabei wurden Rattenhepatomzellen verwendet, die stabil mit einem FoxO1-Östrogenrezeptorkonstrukt transfiziert waren. So führte die durch Tx induzierte Aktivierung von FoxO1 zu dessen Translokation in den Zellkern und zur Bindung im Cp-Promotorbereich. Dies bewirkte eine Steigerung der Cp-Expression, welche in Anwesenheit von FoxO-inaktivierendem Insulin unterbunden wurde (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.7).

Somit ist im Rahmen dieser Arbeit die Insulin-induzierte Kontrolle eines weiteren hepatischen Plasmaproteins nachgewiesen worden. In Analogie zu SeP erfolgt die Vermittlung des Insulinsignals auf die Cp-Expression über den PI3K/Akt/FoxO-Signalweg.

Etwa zeitgleich zur Publikation der hier beschriebenen Experimente (Leyendecker et al., 2011) identifizierte die Gruppe um A.D. Hollenbach (Department of Genetics, Louisiana State University Health Scienes Center, New Orleans, USA) Cp als FoxO-Zielgen in humanen HepG2-Hepatomzellen. Interessanterweise konnte dabei gezeigt werden, dass FoxO1 die Cp-Expression in diesen Zellen nur in Kombination mit dem Zytokin Interleukin-6 (IL-6) induzierte (Sidhu et al., 2011). Die Position der von Sidhu et al. identifizierten FoxO1-Bindungsstelle im humanen proximalen Cp-Promotorbereich, welche sich im Abschnitt -184 bis -166 relativ zum Translationsstartpunkt befindet, überschneidet sich mit den von uns bestimmten möglichen FoxO-Bindungsstellen um die Positionen -188 und -179 im Ratten-Cp-Promotor (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.5). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass FoxO1 in diesem Bereich des Ratten-Cp-Promotors bindet und seine transkriptionelle Aktivität ausübt.
Die Parallelen zwischen den von Sidhu et al. und den von uns erhobenen Daten hinsichtlich Regulation der Cp-Expression gaben Anlass dazu, die in dieser Arbeit bisher nur für die Ratte gezeigte Insulin-induzierte PI3K/Akt/FoxO-abhängige Kontrolle der Cp-Expression auch in humanen HepG2-Heptomzellen zu untersuchen. Erstaunlicherweise zeigte Insulin im

Gegensatz zur erwarteten Senkung der G6Pase-mRNA-Spiegel keinen Einfluss auf die Cp-Expression in dieser menschlichen Zelllinie (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.3, A). Auch die Überexpression der FoxO-Proteine bewirkte nur eine Steigerung der G6Pase-Expression und hatte in Übereinstimmung mit den Daten von Sidhu et al. keinen Effekt auf die Cp-mRNA-Spiegel (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.8). Aufgrund der durch Insulin und FoxO-Überexpression modulierten G6Pase-mRNA-Spiegel, konnte eine dysregulierte PI3K/Akt-Kaskade, wie sie häufig in Krebszelllinien vorkommt (Grant, 2008), als Grund für die unbeeinflusste Cp-Expression ausgeschlossen werden. Möglicherweise spielten dysregulierte Ko-Faktoren der FoxO-Proteine in diesem Zusammenhang eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass ß-Catenin in humanen HepG2-Hepatomzellen, bedingt durch eine Genmutation, im Zellkern akkumuliert und in Folge dessen Überaktivität zeigt (Coste et al., 1998).

Die Insulin-bewirkte Senkung der Cp-Expression sollte in einer weiteren humanen Zelllinie untersucht werden. Im Gegensatz zu den HepG2-Zellen waren unter gleichen Versuchsbedingungen in humanen Huh7-Hepatomzellen weder Cp- noch G6Pase-Expression moduliert. Dies deutet auf eine gestörte Insulin-induzierte Signalübertragung in dieser Zelllinie hin, da die G6Pase-mRNA-Spiegel durch Insulin hätten gesenkt sein müssen. Tatsächlich gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass die Akt in Huh7-Hepatomzellen konstitutiv aktiv ist (Erdal et al., 2005). Somit wäre die Stimulierung der Akt durch Insulin in ihrer Effektivität erheblich eingeschränkt.

In früheren Experimenten aus der Arbeitsgruppe Klotz wurde gezeigt, dass Kupferionen den PI3K/Akt-Signalweg in humanen HepG2-Hepatomzellen aktivieren und in Folge dessen die Inaktivierung der FoxO-Proteine bewirken. Weiterhin wurde beschrieben, dass Kupferionen in diesen Zellen die Senkung der G6Pase-Promotoraktivität unabhängig von der PI3K/Akt-Kaskade induzieren (Walter et al., 2006).
Die Behandlung der humanen HepG2-Zellen mit nicht-toxischen Kupferkonzentrationen in DMEM führte nicht zu einer Aktivierung der Akt. Eine Erklärung dafür liegt in der schnellen Komplexbildung von Kupferionen durch Bestandteile des Zellkulturmediums, wodurch ihre Akt-stimulierenden Aktivitäten unterbunden werden (Walter et al., 2006). Trotz der inaktiven Akt resultierte die Kupferbehandlung der Zellen in einer Abnahme der Cp- und G6Pase-mRNA-Spiegel (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.9). Über die dem zu Grunde liegenden Mechanismen kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Ein möglicherweise beteiligter Signalweg müsste demnach beide Gene – sowohl das des Cp als auch jenes der G6Pase – regulatorisch

beeinflussen können. Neben dem für die Regulation der G6Pase-Expression bereits erwähnten zur PI3K/Akt-Kaskade alternativen MAPK/ERK-Signalweg konnte auch für den Transkriptionsfaktor NF-κB („nuclear factor κB“) eine regulatorische Wirkung auf die G6Pase-Expression nachgewiesen werden (Grempler et al., 2004). IL-6 induziert die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 und dessen Ko-Lokalisation mit FoxO1, wodurch eine Beteiligung von STAT3 an der IL-6- und FoxO1-induzierten Steigerung der Cp-Expression in humanen HepG2-Hepatomzellen vermutet werden kann (Kortylewski et al., 2003; Sidhu et al., 2011).
Es bleibt zu untersuchen, welche alternativen Signalkaskaden sowohl CP- als auch G6Pase-Expression modulieren und ob Kupferionen über diese Wege ihre Effekte auf Genexpression vermitteln.

4.2 Cp als Biomarker?

T2DM-Patienten weisen erhöhte Cp-Spiegel im Serum auf (Mabayoje et al., 2010). Die dadurch vermehrt auftretenden prooxidativen Effekte von Cp werden mit arteriosklerotischen Folgeerkrankungen bei T2DM in Verbindung gebracht (Shukla et al., 2006). So konnte gezeigt werden, dass in den Seren von Patienten mit T2DM hohe Cp-Konzentrationen mit niedrigen Stickstoffmonoxid (NO)-Spiegeln korrelieren, wodurch die Elastizität der Arterien negativ beeinflusst wird (Daimon et al., 2000).

Die in dieser Arbeit untersuchten Seren der mit hohen Fettkonzentrationen ernährten Mäuse zeigten stark gesteigerte Cp-Spiegel (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.12; Abb. 3.13). Hierbei ist zu bemerken, dass eine stärkere Vorverdünnung der Seren zum Nachweis eines weitaus drastischeren Anstiegs der Cp-Spiegel führte. Vermutlich bewirkte die schwächere Vorverdünnung aufgrund der enormen Cp- und Albuminmengen ein übersättigtes Antikörpersignal, wodurch die densitometrische Auswertung verzerrt wurde. Interessanterweise waren die hepatischen Cp-mRNA-Spiegel der entsprechenden Mäuse relativ zur Proteinebene nur leicht erhöht (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.10). Möglicherweise war nicht die Steigerung, sondern das durch die bestehende Insulinresistenz bedingte Ausbleiben der Repression verantwortlich für die drastische Zunahme der Cp-Spiegel in den Seren der unter hoher Fettzufuhr gehaltenen Mäuse. Neben der durch Fettleibigkeit bedingten Insulinresistenz könnte auch der gesteigerte oxidative Stress bei den mit hohen

Fettkonzentrationen ernährten Mäusen zur Erhöhung der hepatischen Cp-Synthese beigetragen haben. Dies basiert auf der bereits beschriebenen Identifizierung von Cp als FoxO1-Zielgen im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit. Oxidativer Stress beeinflusst die subzelluläre Translokation der FoxO-Proteine, indem niedrige ROS-Konzentrationen die nukleare Akkumulation und Stimulation der FoxO-Faktoren bewirken und im Gegensatz dazu hohe ROS-Konzentrationen deren Inaktivierung und Export aus dem Zellkern zur Folge haben (Bartholome et al. 2010; Essers et al., 2004). Anhand der Daten hinsichtlich der gesteigerten Menge oxidierter Proteine in den Seren der unter hoher Fettzufuhr gehaltenen Mäuse kann jedoch nicht beurteilt werden, ob der vorhandene oxidative Stress die Aktivierung oder Inaktivierung der FoxO-Proteine begünstigte. Eine Aktivierung der FoxO-Faktoren durch oxidativen Stress würde allerdings auch die bei erhöhter Fettzufuhr gesteigerten hepatischen mRNA-Spiegel des FoxO1-Zielgens SeP erklären. Ein Einfluss der Hochfett-Diät auf die Expression der FoxO1- und FoxO3-Gene konnte nicht festgestellt werden (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.11). FoxO4 wird im Vergleich zu FoxO1 und FoxO3 in der Leber am geringsten exprimiert (Furuyama et al., 2000) und konnte vermutlich daher auch nicht in einer für eine Auswertung ausreichenden Menge detektiert werden.

Inwieweit die bei den mit hohen Fettkonzentrationen ernährten Mäusen durch Hyperinsulinämie und Hyperglykämie nachgewiesene Insulinresistenz und eine möglicherweise daraus resultierende Pathogenese von T2DM fortgeschritten war, ist unklar. Da T2DM durch eine gesteigerte G6Pase-Aktivität charakterisiert ist (Clore et al., 2000), deuten die signifikant gesenkten hepatischen G6Pase-mRNA-Spiegel der unter hoher Fettzufuhr gehaltenen Mäuse (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.10) auf prädiabetische Zustände mit einer noch nicht vollständig entwickelten Insulinresistenz hin. Von dieser Annahme ausgehend, können die in der Literatur bei T2DM beschriebenen (Mabayoje et al., 2010) und in dieser Arbeit (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.12; Abb. 3.13) bei den mit hohen Fettkonzentrationen ernährten Mäusen beobachteten erhöhten Cp-Spiegel im Serum nicht ausschließlich als Konsequenz einer vollständig ausgeprägten T2DM erklärt werden. Vielmehr gibt es Hinweise darauf, dass gesteigerte Cp-Serumkonzentrationen auch als Ursache für die Entstehung einer Insulinresistenz und deren späteren Folgen in Frage kommen könnten. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bereits bei Fettleibigkeit – einem Risikofaktor für Insulinresistenz und T2DM – gesteigerte Cp-Spiegel im Serum vorliegen (Cignarelli et al., 1996; Kim et al., 2011). Auf dieser unteren Stufe der Pathogenese ist vermutlich die bei Fettleibigkeit hervorgerufene breite Entzündungsreaktion und die

dadurch große Menge freigesetzter Zytokine Hauptursache für eine Zunahme des Akutephaseproteins Cp im Serum. Als Konsequenz tragen neben den durch Fettleibigkeit bedingten Effekten auf die Desensitivierung der Zellen gegenüber Insulin möglicherweise auch die erhöhten Cp-Spiegel im Serum selbst zur Entstehung einer Insulinresistenz bei. So konnte gezeigt werden, dass durch Cu(II) oxidiertes LDL die Insulin-induzierte Signalübertragung negativ beeinflusst, indem es unter anderem die Phosphorylierung und Aktivierung der Akt inhibiert (Mazière et al., 2004). Somit ist die durch Cp katalysierte Oxidation von LDL nicht nur ein Risikofaktor für arteriosklerotische Prozesse bei T2DM, sondern auch für die Entstehung einer Insulinresistenz und deren Folgen. Kürzlich wurde beschrieben, dass SeP Insulinresistenz induziert. Offenbar reguliert die Leber die Sensitivität peripherer Gewebe gegenüber Insulin durch die Bildung sekretorischer Proteine, sogenannter Hepatokine (Misu et al., 2010). Möglicherweise kommt Cp in Analogie zu SeP als Induktor von Insulinresistenz eine Rolle in der Regulation der Glukosehomöostase zu.

Die in dieser Arbeit gezeigte Insulin-induzierte Senkung der hepatischen Cp-Bildung könnte somit als vor Entstehung einer Insulinresistenz schützend interpretiert werden. Demnach würde Fettleibigkeit die Glukosehomöostase unter anderem durch systemisch gesteigerte Cp-Bildung stören, wodurch die Entstehung einer Cp-induzierten Insulinresistenz begünstigt wird. Eine entwickelte Insulinresistenz würde dann eine nicht-reprimierbare Cp-Genexpression bedeuten und die Zunahme der Cp-Spiegel im Serum weiter verstärken. Die Folgen wären potenzierter oxidativer Stress und womöglich die Pathogenese von T2DM und kardiovaskulären Erkrankungen. Patienten mit Aceruloplasminämie, welche eine vollständige Cp-Defizienz im Blut aufweisen, entwickeln in der Regel aufgrund von pathologischen Eisenansammlungen im Pankreas und dem daraus resultierenden Verlust der ß-Zellen einen Typ 1 Diabetes mellitus, so dass die Auswirkung von Cp-Mangel im Blut auf die Pathogenese von T2DM nicht untersucht werden kann (Hellman und Gitlin, 2002).

Die Früherkennung von pathologischer Fettleibigkeit würde die Risiken für die Entwicklung einer Insulinresistenz und möglicherweise T2DM kontrollierbarer machen. Die Verwendung der Cp-Spiegel im Serum als Biomarker für Fettleibigkeit ist durchaus denkbar und könnte zu dieser Früherkennung beitragen (Kim et al., 2011).

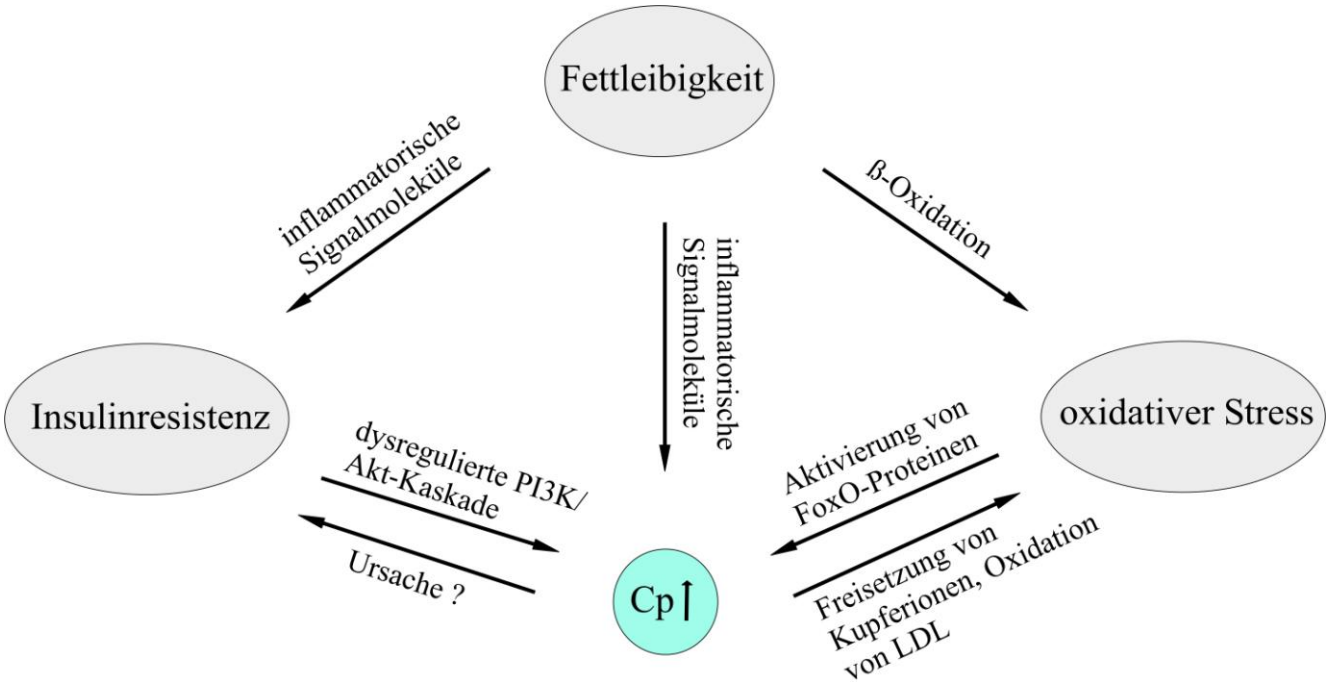

Abb. 4.1: Schematische Darstellung zur Erklärung erhöhter Cp-Spiegel im Serum bei Fettleibigkeit
Fettlleibigkeit führt zur vermehrten Freisetzung von inflammatorischen Signalmolekülen, die einerseits die Expression des Akutephaseproteins Cp induzieren und andererseits zur Entstehung einer Insulinresistenz beitragen. Erhöhte Mengen freier Fettsäuren bedeuten gesteigerte ß-Oxidation und die vermehrte Bildung von ROS. Sowohl Insulinresistenz als auch ROS bewirken die Steigerung der Cp-Spiegel im Serum. Cp selbst kann ROS-Bildung potenzieren und tritt möglicherweise auch als Ursache oder Verstärker von Insulinresistenz auf. Cp (Coeruloplasmin).

4.3 Modulation der Cp-Synthese durch Metformin

Metformin ist ein Antidiabetikum und wird in der T2DM-Therapie zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter anderem durch Repression der hepatischen Glukoseproduktion eingesetzt. Die in der Literatur beschriebene Metformin-induzierte Senkung der G6Pase-Expression in PI3K/Akt-unabhängiger Weise (Morioka et al., 2005) konnte in der vorliegenden Arbeit in den Zelllinien der Ratte bestätigt werden (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.14; Abb. 3.15). Neben der Regulation der Glukosehomöostase sind auch antiatherogene Wirkungen von Metformin bei fettleibigen T2DM-Patienten nachgewiesen worden (Mamputu et al., 2003). Interessanterweise bewirkte Metformin parallel zur Senkung der G6Pase-Expression die Abnahme der Cp-mRNA- und Proteinspiegel. Es ist von daher durchaus denkbar, dass Metformin bei Anwendung in der T2DM-Therapie die durch erhöhte Cp-Spiegel induzierten prooxidativen Effekte auf arteriosklerotische Prozesse vermindert (Fox et al. 2000; Shukla et al.,2006).

Da der AMPK-Aktivator AICAR einen ähnlich inhibierenden Effekt auf Cp- und G6Pase-Expression ausübte wie Metformin (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.14), kann über eine Beteiligung der AMPK bei der Metformin-induzierten Regulation von Cp und G6Pase spekuliert werden. Obwohl SeP-Expression in primären Rattenhepatozyten bereits als durch Metformin modulierbar beschrieben wurde (Speckmann et al., 2009), zeigte die Behandlung mit diesem Arzneistoff keine Wirkung auf die SeP-mRNA-Spiegel in H4IIE-Rattenhepatomzellen (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.14). Dies deutet auf einen zelltypspezifischen Unterschied in der Metformin-induzierten Signalübertragung hin, der speziell die SeP-Expression betrifft. Möglicherweise sind auch hier in den Leberkrebszellen für diese Regulation wichtige Ko-Faktoren dysreguliert und für die unbeeinflussten SeP-mRNA-Spiegel verantwortlich.

Hyperglykämie induziert G6Pase-Expression und potenziert somit die hepatische Glukoseproduktion bei T2DM (Massillon et al., 1996). Tatsächlich konnte eine drastische Steigerung der G6Pase-Expression unter hyperglykämischen Bedingungen in den primären Rattenhepatozyten beobachtet werden (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.16). Im Gegensatz dazu zeigte sich die hepatische Bildung von Cp durch eine Glukosekonzentration von 25 mM nicht moduliert (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.16). An dieser Stelle können jedoch keine Rückschlüsse auf die Wirkung einer Hyperglykämie auf die hepatische Cp-Synthese gezogen werden, da die Kontrollsituation mit 11 mM Glukose bereits im hyperglykämischen Bereich lag und das System womöglich schon gesättigt war.

Ob den durch Metformin gesenkten FoxO1-Proteinspiegeln ein proteasomaler Abbau zu Grunde liegt, kann an dieser Stelle nicht abschließend beurteilt werden. Es ist jedoch bekannt, dass FoxO-Proteine nach Inaktivierung durch Akt und Export aus dem Zellkern proteasomal im Zytoplasma degradiert werden (Plas und Thompson, 2003). Da in der Literatur AMPK-Phosphorylierungsstellen zumindest für FoxO3 beschrieben wurden, ist es durchaus denkbar, dass auch hier die AMPK bei der Signalvermittlung von zentraler Bedeutung ist. Interessanterweise waren die FoxO-mRNA-Spiegel nach Metformin-Behandlung gesteigert (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.17). Dies könnte als ein zu den gesenkten FoxO1-Proteinspiegeln kompensatorischer Mechansimus interpretiert werden, der auch die nur transiente Abnahme der FoxO1-Spiegel (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.18) erklären würde. Ein direkter Zusammenhang zwischen den durch Metformin gesenkten FoxO1-Spiegeln und der ebenfalls durch Metformin reprimierten Expression der FoxO1-Zielgene Cp und G6Pase (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.14) wäre an dieser Stelle rein spekulativ. Sicherlich sind jedoch weitere Mechanismen

und Regulatoren an der Metformin-induzierten Abnahme der Cp- und G6Pase-Expression beteiligt. Im Gegensatz zu Insulin bewirkten Metformin und AICAR keine subzelluläre Translokation von FoxO1 aus dem Zellkern ins Zytoplasma (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.19). Daher muß davon ausgegangen werden, dass sich die Wirkmechanismen von Insulin und Metformin/AICAR hinsichtlich der Hemmung der Cp- und G6Pase-Expression grundlegend unterscheiden.
Interessanterweise induzierte Insulin die Repression der FoxO-Expression (vgl. Ergebnisse, Abb. 3.20). Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass die transkriptionelle Regulation der FoxO-Proteine auch über FoxO-Faktoren selbst reguliert wird.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte ein neuer Zusammenhang zwischen Energiestoffwechsel und der Homöostase der Spurenelemente Kupfer und Eisen hergestellt werden. Insulin reguliert die hepatische Bildung der kupferhaltigen Ferroxidase Coeruloplasmin, welches die Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) katalysiert und dadurch zellschädigenden Effekten dieses Metalls vorbeugt. Somit nimmt die Kalorienzufuhr direkten Einfluss auf metallinduzierte antioxidative Prozesse und begünstigt bei Fehlernährung die Entstehung von Insulinresistenz und daraus resultierenden Krankheiten wie T2DM und Arteriosklerose. Als durch Insulin regulierbares Plasmaprotein könnte Cp als Biomarker bereits auf einer unteren Stufe der Pathogenese eine drohende Insulinresistenz anzeigen und die Risiken für folgenschwere Erkrankungen kontrollierbarer machen.

Zusammenfassung

Der Phosphoinositid 3'-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg kontrolliert die Expression von Proteinen, die in der Abwehr gegen oxidativen Stress, im Glukosemetabolismus und in der Regulation des Zellzyklus involviert sind. Diese Signalkaskade wird nicht nur durch Insulin oder andere Wachstumsfaktoren aktiviert, sondern auch durch Stressimpulse wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die Stimulation des Insulinrezeptors induziert eine Phosphorylierungskaskade, die zur Aktivierung der Serin-/Threonin-Kinase Akt führt. Aktivierte Akt transloziert in den Zellkern und inaktiviert FoxO-Transkriptionsfaktoren, die unter anderem die Expression des hepatischen und antioxidativ wirkenden Plasmaproteins SeP regulieren.

In der hier angefertigten Arbeit konnte die Insulin-induzierte Regulation von Coeruloplasmin (Cp), eines weiteren antioxidativen von der Leber produzierten Plasmaproteins, nachgewiesen und in Analogie zum SeP gezeigt werden, dass dies über den PI3K/Akt/FoxO-Signalweg erfolgt. So führte die Insulinbehandlung von Rattenhepatomzellen zur Abnahme der Cp-Expression, wobei dieser Effekt vollständig durch den spezifischen PI3K-Inhibitor Wortmannin blockiert wurde. Zudem bewirkte Insulin die Repression der Cp-mRNA-Spiegel in primären Rattenhepatomzellen, wodurch die Cp-Spiegel in den entsprechenden Zellkulturüberständen gesenkt wurden. Weiterhin resultierte die Aktivierung eines konstitutiv exprimierten und regulierbaren FoxO1-Konstrukts in der Steigerung der Cp-Expression in Rattenhepatomzellen. Dieser Effekt wurde durch gleichzeitige Behandlung mit Insulin unterbunden, wodurch Cp als FoxO-Zielgen bestätigt wurde. Im Gegensatz dazu zeigte weder die Insulinbehandlung noch die Überexpression der FoxO-Faktoren eine Wirkung auf die Cp-Expression in humanen HepG2-Hepatomzellen, was auf speziesspezifische Unterschiede in der Cp-Expression hindeutet. Die Belastung von Rattenhepatomzellen mit Cu(II) führte zudem zur Repression der Cp-mRNA-Spiegel. Dies geschah in PI3K/Akt-unabhängiger Weise.

Unter hoher Fettzufuhr gehaltene Mäuse, die eine Insulinresistenz und Hyperglykämie aufwiesen, zeigten leicht gesteigerte hepatische Cp-mRNA-Spiegel und eine starke Zunahme der Cp-Spiegel im Serum. Zudem konnten wir erhöhte Mengen oxidierter Proteine in den Seren feststellen, was oxidativen Stress indiziert. Aufgrund der Daten dieser Arbeit wird postuliert, dass hauptsächlich eine durch Fettleibigkeit induzierte Insulinresistenz für die gesteigerten Cp-Spiegel in den Seren der mit hohen Fettkonzentrationen ernährten Mäuse verantwortlich ist.

Die Behandlung von primären Rattenhepatozyten mit dem Antidiabetikum Metformin führte zu einer starken Unterdrückung der Cp-Synthese und einer transienten Abnahme des FoxO1 Proteinspiegels. Dies deutet darauf hin, dass dieser Arzneistoff neben der Senkung des Blutzuckerspiegels auch mögliche prooxidative Effekte von Cp bei Typ 2 Diabetes mellitus vermindern könnte.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der hepatischen Cp-Expression durch Insulin über die PI3K/Akt/FoxO-Kaskade nachgewiesen und eine ausgeprägte Steigerung der Cp-Konzentrationen im Serum unter hoher Fettzufuhr gehaltener Mäuse festgestellt. Künftige Untersuchungen müssen klären, inwieweit dies für die Eignung von Cp als Biomarker zur Früherkennung diabetischer Komplikationen spricht.

Summary

The phosphoinositide 3'-kinase (PI3K)/Akt pathway controls the expression of a number of proteins involved in the defense against oxidative stress, glucose metabolism and cell cycle progression. This signaling cascade is not only activated by insulin or other growth factors but also by stressful stimuli such as reactive oxygen species (ROS). Stimulation of the insulin receptor induces a phosphorylation cascade resulting in the activation of the serine-/threonine-kinase Akt. Activated Akt shuttles into the nucleus and inactivates FoxO transcription factors which regulate the expression of target genes such as that of the hepatic and antioxidative plasma protein, selenoprotein P (SeP).

In this work, I identified the expression of ceruloplasmin (Cp), an antioxidative plasma protein produced and secrected by the liver like SeP, as being regulated by insulin via the PI3K/Akt/FoxO-signaling pathway. Thus, insulin treatment of rat hepatoma cells resulted in a downregulation of Cp expression, and this process was completely blocked by the specific PI3K-inhibitor, wortmannin. In addition, insulin lowered Cp mRNA levels in primary rat hepatocytes, resulting in a decrease of Cp protein levels in the corresponding cell culture supernatants. Furthermore, the activation of a constitutively expressed regulatable version of FoxO1 increased Cp expression in rat hepatoma cells. This effect was counteracted by exposure to insulin, indicating that the Cp gene is a target gene of FoxO transcription factors. In contrast, neither insulin treatment nor the overexpression of FoxO factors had an effect on Cp expression in human HepG2 hepatoma cells, indicating differences in the regulation of Cp expression between species. Furthermore, exposure to Cu^{2+} attenuated Cp expression in a PI3K/Akt-independent manner in rat hepatoma cells.

High fat-fed mice, for which insulin resistance and hyperglycemia had been demonstrated previously, had slightly upregulated hepatic Cp mRNA levels and strongly elevated Cp protein levels in the serum relative to control mice. Moreover, we observed increased amounts of oxidized proteins in the sera of these mice, indicating oxidative stress. Based on the data of this work, I postulate that the elevated serum Cp protein levels in high fat-fed mice were mainly due to obesity-induced insulin resistance.

Treatment of primary rat hepatocytes with metformin resulted in a strong decrease of Cp levels and a transient decay of FoxO1 protein levels. This indicates that this antidiabetic drug, in addition to lowering blood glucose levels, may diminish potential prooxidative effects of Cp under conditions of a type 2 diabetes mellitus.

This work provides evidence for the regulation of hepatic Cp expression by insulin via the PI3K/Akt/FoxO cascade. Moreover, it is demonstrated that Cp levels are strongly elevated in sera of mice held under a high fat diet. Whether or not this renders Cp a suitable biomarker for early detection of diabetic complications remains to be elucidated.

6. Literaturverzeichnis

Aoki M, Jiang H, Vogt PK (2004) Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. Proc Natl Acad Sci USA. 101(37):13613-7

Arden KC (2008) FOXO animal models reveal a variety of diverse roles for FOXO transcription factors. Oncogene. 27(16):2345-50

Atanasiu RL, Stea D, Mateescu MA, Vergely C, Dalloz F, Briot F, Maupoil V, Nadeau R, Rochette L (1998) Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. Mol Cell Biochem. 189(1-2):127-35

Babior BM, Lambeth JD, Nausseef W (2002) The neutrophil NADPH oxidase. Arch Biochem Biophys. 397(2):342-4

Barthel A, Klotz LO (2005) Phosphoinositide 3-kinase signaling in the cellular response to oxidative stress. Biol Chem. 386(3):207-16

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(2):175-82

Barthel A, Schmoll D, Krüger KD, Bahrenberg G, Walther R, Roth RA, Joost HG (2001) Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells. Biochem Biophys Res Commun. 285(4):897-902

Barthel A, Schmoll D, Unterman TG (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. Trends Endocrinol Metab. 16(4):183-9

Bartholome A, Kampkötter A, Tanner S, Sies H, Klotz LO (2010) Epigallocatechin gallate-induced modulation of FoxO signaling in mammalian cells and C. elegans: FoxO stimulation is masked via PI3K/Akt activation by hydrogen peroxide formed in cell culture. Arch Biochem Biophys. 501(1):58-64

Berry FB, Skarie JM, Mirzayans F, Fortin Y, Hudson TJ, Raymond V, Link BA, Walter MA (2008) FOXC1 is required for cell viability and resistance to oxidative stress in the eye through the transcriptional regulation of FOXO1A. Hum Mol Genet. 17(4):490-505

Bielli P, Calabrese L (2002) Structure to function relationships in ceruloplasmin: a 'moonlighting' protein. Cell Mol Life Sci. 59(9):1413-27

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(6):857-68

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(5):817-28

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(5666):2011-5

Burgering BM (2008) A brief introduction to FOXOlogy. Oncogene. 7;27(16):2258-62

Calnan DR, Brunet A (2008) The FoxO code. Oncogene. 27(16):2276-88

Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science. 296(5573):1655-7

Carlsson P, Mahapuu (2002) Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. Dev Biol. 250(1):1-23

Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA (2003) Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. Science. 301(5630):215-8

Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev. 59(3):527-605

Chen K, Vita JA, Berk BC, Keaney JF Jr. (2001) -Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. J Biol Chem. 6(19):16045-50

Chen F, Zhu Y, Tang X, Sun Y, Jia W, Sun Y, Han X (2011) Dynamic Regulation of PDX-1 and FoxO1 Expression by FoxA2 in Dexamethasone-Induced Pancreatic {beta}-cells Dysfunction. Endocrinology. 152(5):1779-88

Choi SY, Kwon HY, Kwon OB, Eum WS, Kang JH (2000) Fragmentation of human ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide. Biochimie. 82(2):175-80

Cignarelli M, DePergola G, Picca G, Sciaraffia M, Pannacciulli N, Tarallo M, Laudadio E, Turrisi E, Giorgino R (1996) Relationship of obesity and body fat distribution with ceruloplasmin serum levels. Int J Obes Relat Metab Disord. 20(9):809-13

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

Clore JN, Stillman J, Sugerman H (2000) Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. Diabetes. 49(6):969-74

Coffer PJ, Burgering BM (2004) Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. Nat Rev Immunol. 4(11):889-99

Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. Biochem J. 335 (Pt 1):1-13

Daimon M, Sugiyama K, Saitoh T, Yamaquchi H, Hirata A, Ohnuma H, Igarashi M, Eguchi H, Manaka H, Kato H (2000) Increase in serum ceruloplasmin levels is correlated with a decrease of serum nitric oxide levels in type 2 diabetes. Diabetes Care. 23(4):559-60

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev. 13(22):2905-27

Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG (1994) Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. Cancer Res. 54(11):2869-72

De La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C (1998) Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA. 95(15):8847-51.

Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffer PJ (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. Curr Biol. 10(19):1201-4

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. 22(2):307-16

Ehrenwald E, Chisolm GM, Fox PL (1994) Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. J Clin Invest. 93(4):1493-501

Erdal E, Ozturk N, Cagatay T, Eksioglu-Demiralp E, Ozturk M (2005) Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. Int J Cancer. 115(6):903-10

Essaghir A, Dif N, Marbehant CY, Coffer PJ, Demoulin JB (2009) The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. J Biol Chem. 284(16):10334-42

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(5725):1181-4

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(24):4802-12

Féry F (1994) Role of hepatic glucose production and glucose uptake in the pathogenesis of fasting hyperglycemia in type 2 diabetes: normalization of glucose kinetics by short-term fasting. J Clin Endocrinol Metab. 78(3):536-42

Flitter W, Rowley DA, Halliwell B (1983) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. FEBS Letters, London, England. Volume 158, number 2

Fox PL, Mazumder B, Ehrenwald E, Mukhopadhyay CK (2000) Ceruloplasmin and cardiovascular disease. Free Radic Biol Med. 28(12):1735-44

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(33):34741-9

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(Pt 2):629-34

Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ 3rd, 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(3):230-5

Gitlin JD (1988) Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. J Biol Chem. 263(13):6281-7

Gitlin JD, Schroeder JJ, Lee-Ambrose LM, Cousins RJ (1992) Mechanisms of caeruloplasmin biosynthesis in normal and copper-deficient rats. Biochem J. 282(Pt3):835-9

Glauser DA, Schlegel W (2007) The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic beta cells. J Endocrinol. 193(2):195-207

Goldstein BJ, Ahmad F, Ding W, Li PM, Zhang WR (1998) Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. Mol Cell Biochem. 182(1-2):91-9

Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G (1993) The Fenton reagents. Free Radic Biol Med. 15(4):435-45

Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL (1995) Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. J Clin Invest. 95(5):2195-204

Grant S (2008) Cotargeting survival signaling pathways in cancer. J Clin Invest. 118(9):3003-6

Greer EL, Brunet A (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. Oncogene. 24(50):7410-25

Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, Brunet A (2007) The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. J Biol Chem. 282(41):30107-19

Grempler R, Kienitz A, Werner T, Meyer M, Barthel A, Ailett F, Sutherland C, Walther R, Schmoll D (2004) Tumour necrosis factor alpha decreases glucose-6-phosphatase gene expression by activation of nuclear factor kappaB. Biochem J. 382(Pt 2):471-9

Haeusler RA, Kaestner KH, Accili D (2010) FoxOs function synergistically to promote glucose production. J Biol Chem. 285(46):35245-8

Harris ZL, Takahashi Y, Miyajima H, Serizawa M, MacGillivray RT, Gitlin JD (1995) Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. Proc Natl. Acad Sci USA. 92(7):2539-43

Hart PJ, Balbirnie MM, Ogihara NL, Nersissian AM, Weiss MS, Valentine JS, Eisenberg D (1999) A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase. Biochemistry. 38(7):2167-78

Hellman NE, Gitlin JD (2002) Ceruloplasmin metabolism and function. Annu Rev Nutr. 22:439-58

Hellman NE, Kono S, Mancini GM, Hoogeboom AJ, De Jong GJ, Gitlin JD (2002) Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin. J Biol Chem. 277(48):46632-8

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(15):13056-60

Holleran JL, Egorin MJ, Zuhowski EG, Parise RA, Musser SM, Pan SS (2003) Use of high-performance liquid chromatography to characterize the rapid decomposition of wortmannin in tissue culture media. Anal Biochem. 323(1):19-25

Honda Y, Honda S (2002) Oxidative stress and life span determination in the nematode Caenorhabditis elegans. Ann N Y Acad Sci. 959:466-74

Hopkin K (1998) A surprising function for the PTEN tumor suppressor. Science. 282(5391):1027,1029-30

Hosaka T, Biggs WH 3rd, 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(9):2975-80

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavar A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. Science. 271(5249):665-8

Hresko RC, Mueckler M (2005) mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem. 280(49):40406-16

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(5):1649-54

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(38):35959-67

Jürgens G, Weigel D (1988) Terminal versus segmental development in the Drosophila embryo: the role of the homeotic gene forkhead. Dev Genes Evol. 197(6):345-354

Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. Genes Dev. 15;14(2):142-6

Kahn BB, Flier JS (2000) Obesity and insulin resistance. J Clin Invest. 106(4):473-81

Kenyon C (2005) The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. Cell. 120(4):449-60

Kim Oy, Shin MJ, Moon J, Chung JH (2011) Plasma ceruloplasmin as a biomarker for obesity: A proteomic approach. Clin Biochem. 44(5-6):351-6

Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M (2001) Role of oxidized LDL in atherosclerosis. Ann N Y Acad Sci. 947:199-205; discussion 205-6

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 tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. Mol Cell Biol. 20(15):5479-89

Klotz LO, Schieke SM, Sies H, Holbrook NJ (2000) Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. Biochem J. 352 Pt 1:219-25

Klotz LO, Sies H (2009) Cellular Generation of Oxidants: Relation to Oxidative Stress, in Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine (eds C. Jacob and P. G. Winyard), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. pp. 45-61

Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffer PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. Nature. 419(6904):316-21

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(7):5242-9

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227(5259):680-5

Lam TK, Carpentier A, Lewis GF, van der Werve G, Fantus IG, Giacca A (2003) Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. Am J Physiol Endocrinol Metab. 284(5):E863-73

Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nat Rev Immunol. 4(3):181-9

Lee J, Pilch PF (1994) The insulin receptor: structure, function, and signaling. Ann J Physiol. 266(2 Pt 1):C319-34

Leoni V, Albertini R, Passi A, Abuja PM, Borroni P, D'Eril GM, De Luca G (2002) Glucose accelerates copper- and ceruloplasmin-induced oxidation of low-density lipoprotein and whole serum. Free Radic Res. 36(5):521-9

Leyendecker M, Korsten P, Reinehr R, Speckmann B, Schmoll D, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A, Klotz LO (2011) Ceruloplasmin Expression in Rat Liver Cells is Attenuated by Insulin: Role of FoxO Transcription Factors. Hormon Metab Res. 43(4):268-74

Lizcano JM, Alessi DR (2002) The insulin signalling pathway. Curr Biol. 12(7):R236-8

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 PEPCK and glucose-6-phosphatase. Diabetes. 49(6):896-903.

Lynch SM, Colón W (2006) Dominant role of copper in the kinetic stability of Cu/Zn superoxide dismutase. Biochem Biophys Res Commun. 340(2):457-61

Mabayoje VO, Akanni EO, Arinola GO, Hassan RO (2010) Plasma Transferrin and Caeruloplasmin Levels in Nigerians with Diabetes Mellitus. Int J Trop Med. 5(1): 6-9

Mamputu JC, Wiernsperger NF, Renier G (2003) Antiatherogenic properties of metformin: the experimental evidence. Diabetes Metab. 29(4 Pt 2):6S71-6

Massillon D, Barzilai N, Chen W, Hu M, Rossetti L (1996) Glucose regulates in vivo glucose-6-phosphatase gene expression in the liver of diabetic rats. J Biol Chem. 271(17):9871-4

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(20):11285-90

Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S (2008) Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. Metabolism. 57(8):1071-7

Mazière C, Morlière P, Santus R, Marcheux V, Louandre C, Conte MA, Mazière JC (2004) Inhibition of insulin signaling by oxidized low density lipoprotein. Protective effect of the antioxidant Vitamin E. Atherosclerosis. 175(1):23-30

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(6779):782-7

Misra HP (1974) Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. J Biol Chem. 249(7):2151-5

Morioka K, Nakatani K, Matsumoto K, Urakawa H, Kitagawa N, Katsuki A, Hori Y, Gabazza EC, Yano Y, Nishioka J, Nobori T, Sumida Y, Adachi Y (2005) Metformin-induced suppression of glucose-6-phosphatase expression is independent of insulin signaling in rat hepatoma cells. Int J Mol Med. 15(3):449-52.

Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Lindley PF, Fox PL (1997) Identification of the prooxidant site of human ceruloplasmin: a model for oxidative damage by copper bound to protein surfaces. Proc Natl Acad Sci USA. 94(21):11546-51

Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D (2001) The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. J Clin Invest. 108(9):1359-67

Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, Kaneko S (2009) Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. J Biol Chem. 284(22):14809-18

Nemoto S, Finkel T (2002) Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. Science. 295(5564):2450-2

Nguyen TT, Sheppard AM, Kaye PL, Noakes PG (2007) IGF-I and insulin activate mitogen-activated protein kinase via the type 1 IGF receptor in mouse embryonic stem cells. Reproduction. 134(1):41-9

Nittis T, Gitlin JD (2002) The copper-iron connection: hereditary aceruloplasminemia. Semin Hematol. 39(4):282-9

Nowak K, Killmer K, Gessner C, Lutz W (2007) E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. Biochim Biophys Acta. 1769(4):244-52

Obsil T, Obsilova V (2010) Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. Biochim Biophys Acta. [Epub ahead of print]

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(6654):994-9

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(2):232-9

Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, Miao L, Tothova Z, Horner JW, Carrasco DR, Jiang S, Gilliland DG, Chin L, Wong WH, Castrillon DH, DePinho RA (2007) FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. Cell . 128(2):309-23

Paquot N, Scheen AJ, Dirlewanger M, Lefèbvre PJ, Tappy L (2002) Hepatic insulin resistance in obese non-diabetic subjects and in type 2 diabetic patients. Obes Res. 10(3):129-34

Patel BN, David S (1997) A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. J Biol Chem. 272(32):20185-90

Plas DR, Thompson CB (2003) Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. J Biol Chem. 278(14):12361-6

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altmonte J, Dong H, Accili D, Spiegelmann DM (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. Nature. 423(6939):550-5

Rana SV, Prakash R, Kumar A, Sharma CB (1985) A study of glycogen in the liver of metal-fed rats. Toxicol Lett. 29(1):1-4

Richter C (1987) Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. Chem Phys Lipids. 44(2-4):175-89

Rinner O, Mueller LN, Hubálek M, Müller M, Gstaiger M, Aebersold R (2007) An integrated mass spectrometric and computational framework for the analysis of protein interaction networks. Nat Biotechnol. 25(3):345-52

Rotilio G, Calabrese L, Bossa F, Barra D, Agrò AF, Mondovì B (1972) Properties of the apoprotein and role of copper and zinc in protein conformation and enzyme activity of bovine superoxide dismutase. Biochemistry. 11(11):2182-7

Sato M, Gitlin JD (1991) Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. J Biol Chem. 266(8):5128-34

Schenker E, Kohanski RA (1988) Conformational states of the insulin receptor. Biochem Biophys Res Commun. 157(1):140-5

Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompmaker R, Kops GJ, Lam EW, Burgering BM, Medema RH (2002) Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. Mol Cell Biol. 22(22):7842-52

Schmoll D, Grempler R, Barthel A, Joost HG, Walther R (2001) Phorbol ester-induced activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal-regulated kinase kinase and extracellular-signal-regulated protein kinase decreases glucose-6-phosphatase gene expression. Biochem J. 357(Pt 3):867-73

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 Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. J Biol Chem. 275(46):36324-33

Shukla N, Maher J, Masters J, Angelini GD, Jeremy JY (2006) Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor? Atherosclerosis. 187(2):238-50

Sidhu A, Miller PJ, Hollenbach AD (2011) FOXO1 stimulates ceruloplasmin promoter activity in human hepatoma cells treated with IL-6. Biochem Biophys Res Commun. 404(4):963-7

Sies H (1985) Oxidative stress: introductory remarks, in Oxidative Stress. Academic Press, London, England. pp. 1-8

Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem. 215(2):213-9

Speckmann B, Sies H, Steinbrenner H (2009) Attenuation of hepatic expression and secretion of selenoprotein P by metformin. Biochem Biophys Res Commun. 387(1):158-63

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-1alpha with FoxO1a and hepatocyte nuclear factor 4alpha transcription factors. Hepatology. 48(6):1998-2006

Stadtman ER, Berlett BS (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. Chem Res Toxicol. 10(5):485-94

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(9):936-43

Tolbert ME, Kamalu JA, Draper GD (1981) Effects of cadmium, zinc, copper and manganese on hepatic parenchymal cell gluconeogenesis. J Environ Sci Health B. 16(5 Pt B):575-85

Toledano MB, Planson AG, Delaunay-Moisan A (2010) Reining in H(2)O(2) for safe signaling. Cell. 140(4):454-6

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(5567):530-4

Tsai KL, Sun YJ, Huang CY, Yang JY, Hung MC, Hsiao CD (2007) Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. Nucleic Acids Res. 35(20):6984-94

Valenti L, Rametta R, Dongiovanni P, Maggioni M, Fracanzani AL, Zappa M, Lattuada E, Roviaro G, Fargion S (2008) Increased expression and activity of the transcription factor FOXO1 in nonalcoholic steatohepatitis. Diabetes. 57(5):1355-62

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact. 0(1):1-40

Van Epps-Fung M, Williford J, Wells A, Hardy RW (1997) Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. Endocrinology. 138(10):4338-45

Van der Heide LP, Jacobs FM, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP (2005) FoxO6 transcriptional activity is regulated by Thr26 and Ser184, independent of nucleo-cytoplasmic shuttling. Biochem J. 391(Pt 3):623-9

Van der Horst A, de Vries-Smits AM, Brenkman AB, van Triest MH, van den Broek N, Colland F, Maurice MM, Burgering BM (2006) FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. Nat Cell Biol. 8(10):1064-73

Van der Vos KE, Coffer PJ (2008) FOXO-binding partners: it takes two to tango. Oncogene. 27(16):2289-99

Van Weeren PC, de Bruyn KM, de Vries-Smits AM, van Lint J, Burgering BM (1998) Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. J Biol Chem. 273(21):13150-6

Vina J, Borrás C, Miguel J (2007) Theories of ageing. IUBMB Life. 59(4-5):249-54

Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest. 103(7):931-43

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(2):107-13

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(2):316-21

Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, Klip A (1999) Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. Mol Cell Biol. 19(6):4008-18

Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ (2000) Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. J Biol Chem. 275(19):14624-31

Weigel D, Jäckle H (1990) The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? Cell. 63(3):455-6

Weigel D, Jürgens 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

Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. J Clin Invest. 115(5):1111-9

Wiseman H, Halliwell B (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J. 313 (Pt 1):17-29

Woods YL, Rena G (2002) Effect of multiple phosphorylation events on the transcription factors FKHR, FKHRL1 and AFX. Biochem Soc Trans. 30(4):391-7

Zhao X, Gan L, Pan H, Kann 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(Pt 3):839-49

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman NF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest. 108(8):1167-74

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz für das interessante Thema und seine fachliche Betreuung. Trotz der großen räumlichen Entfernung in den letzten zehn Monaten meiner Arbeit stand er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Groth danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Holger Steinbrenner und Herrn Dr. Bodo Speckmann für die umfangreiche Unterstützung und die zur Verfügungstellung diverser Proben, die meine Arbeit bereichert haben.

Ich möchte mich bei allen ehemaligen Mitgliedern der AG Klotz für die humorvolle und schöne Zeit bedanken. Ich denke gerne an eine bestimmte Weihnachtsfeier zurück, bei der ich zum ersten Mal in meinem Leben vor fremdem Publikum gesungen habe. Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Nilofar Ale-Agha für die vielen Hilfen und Mandarinen bedanken.

Mein Dank gilt auch den ehemaligen Mitgliedern der AG Schroeder und der AG Haendeler. Ich habe viele Fragen gestellt und viele Antworten bekommen. Auf diesem Weg möchte ich auch Herrn Dr. Peter Schroeder alles Gute für seine weitere berufliche Laufbahn wünschen.

Ich möchte mich besonders bei meiner Freundin Lisa für ihre Unterstützung und ihr großes Verständnis bedanken. Sie hat mir immer den Rückhalt gegeben, den ich brauchte, um mich voll auf meine Arbeit konzentrieren zu können.

Ein großer Dank geht an meine Eltern und an meinen Bruder. Ich kann mich jeder Zeit auf ihre Hilfe und Unterstützung verlassen, was in diesem Maße etwas ganz Besonderes ist.

Meinen Freunden danke ich für ihre Geduld und ihr Verständnis, wenn ich mal kurzfristig absagen musste und auch sonst wenig Zeit hatte. Dies gilt besonders für die vielen abgesagten Bandproben.