



**Zur Wirkung von Ultraviolett-B-Strahlung auf FoxO-  
Transkriptionsfaktoren in dermalen Zellen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von  
**Kerstin Reimann**  
aus Hamburg

Düsseldorf, November 2011

Aus dem Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH  
Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz

Korreferent: Prof. Dr. Johannes H. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Dezember 2011

*Für meine Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis: .....	6
1.1 Einleitung.....	8
1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut .....	8
1.2 UV-Strahlung und Haut .....	9
1.2.1 Das Sonnenlicht .....	9
1.2.2 Absorption und Penetration von UV-Strahlung in der Haut .....	10
1.2.3 Photooxidativer Stress in der Haut .....	12
1.3 Intrinsische Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies .....	14
1.4 ROS und Signaltransduktion.....	15
1.5 Insulin-responsive Signaltransduktion über den PI3K/Akt-Signalweg .....	16
1.6 Stressinduzierte Signaltransduktion über den JNK-Signalweg .....	18
1.7 FoxO-Transkriptionsfaktoren.....	19
1.7.1 FoxO-Transkriptionsfaktoren .....	19
1.7.2 Post-translationale Modulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren.....	20
1.7.3 FoxO Zielgene und deren Bedeutung .....	22
1.7.4 FoxO-Proteine und Co-Regulatoren .....	23
1.7.5 FoxO-Transkriptionsfaktoren und Alterung .....	24
1.8 Sirtuine .....	25
1.9 Fragestellung .....	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1 Zellkultur.....	28
2.1.1 Isolation epidermaler Zellen .....	28
2.1.2 Anzucht von Zellen .....	28
2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	29
2.1.4 UVB-Behandlung von Zellen.....	30

2.1.5	Verwendung von Inhibitoren.....	30
2.1.6	Viabilitätsbestimmung nach UVB-Behandlung .....	31
2.1.7	Zellproliferations-Analyse (BrdU) .....	31
2.1.8	Transiente Transfektion in primären Fibroblasten .....	31
2.1.9	Reportergenanalyse.....	32
2.2	Seneszenzabhängige $\beta$ -Galaktosidase Färbung (SA- $\beta$ -Gal) .....	33
2.3	Proteinanalytik .....	33
2.3.1	Proteinquantifizierung .....	33
2.3.2	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	34
2.4	Immunodetektion von Proteinen.....	35
2.4.1	Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen.....	35
2.4.2	Immunodetektion.....	36
2.4.3	Entfernen von Antikörpern von Membranen („Strippen“)... ..	37
2.5	Immunzytochemische Färbung .....	38
2.6	Zellzyklusanalyse.....	38
2.7	RNA-Analytik.....	39
2.7.1	RNA-Isolierung .....	39
2.7.2	RNA-Quantifizierung .....	40
2.7.3	Reverse Transkription.....	40
2.7.4	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-PCR) .....	40
2.7.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	42
3.	Ergebnisse.....	44
3.1	Basale FoxO-/SIRT-mRNA-Spiegel.....	44
3.2	Einfluss von UVB-Bestrahlung auf FoxO-/SIRT-mRNA-Spiegel.....	47
3.3	Modulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch UVB .....	50
3.4	Repetitive UVB-Bestrahlung und FoxO-/SIRT-mRNA-Spiegel.....	59
3.5	Repetitive UVB-Bestrahlung und zelluläre Seneszenz.....	66

4. Diskussion .....	74
4.1 UVB reguliert FoxO-Aktivität .....	74
4.2 Einfluss von repetitiver UVB-Strahlung in primären Fibroblasten .....	79
4.3 SIPS im Vergleich zu weiteren <i>in vitro</i> -Alterungsmodellen .....	81
5. Zusammenfassung .....	83
Summary .....	84
Literaturverzeichnis: .....	85
Publikationen und Tagungsbeiträge .....	99
Danksagung .....	101

**Abkürzungsverzeichnis:**

BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
DAF	<i>dauer formation</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBE	Daf-16-Bindeelement
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Fox	<i>Forkhead Box</i>
FoxO	<i>Forkhead Box Class O</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase
HaCaT	<i>human adult low calcium temperature</i> Keratinozyten
HPRT	Hypoxanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
kDa	Kilodalton
Ktrl.	Kontrolle
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
PCR	Polymerasenkettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )

---

rel.	relativ
PI3K	Phosphoinositid 3'-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4',5'-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3',4',5'-trisphosphat
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SA-β-Gal	seneszenzassoziierte β-Galaktosidase-Aktivität
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIRT	<i>silent mating type information regulation 2 homolog</i>
SGK	<i>serum and glucocorticoid-inducible kinase</i>
SOD	Superoxiddismutase
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>units</i> (Enzymeinheiten)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## 1.1 Einleitung

### 1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die menschliche Haut ist das größte und schwerste Organ des Menschen. Sie besitzt eine Fläche von 1,5 bis 2 m<sup>2</sup> und steht im direkten Kontakt zur Umwelt (Jung & Moll, 2005). Die Haut hat eine Barrierefunktion und schützt den Körper vor thermischen, mechanischen und chemischen Reizen, verhindert den Verlust von Wasser und das Eindringen von schädlichen Mikroorganismen.

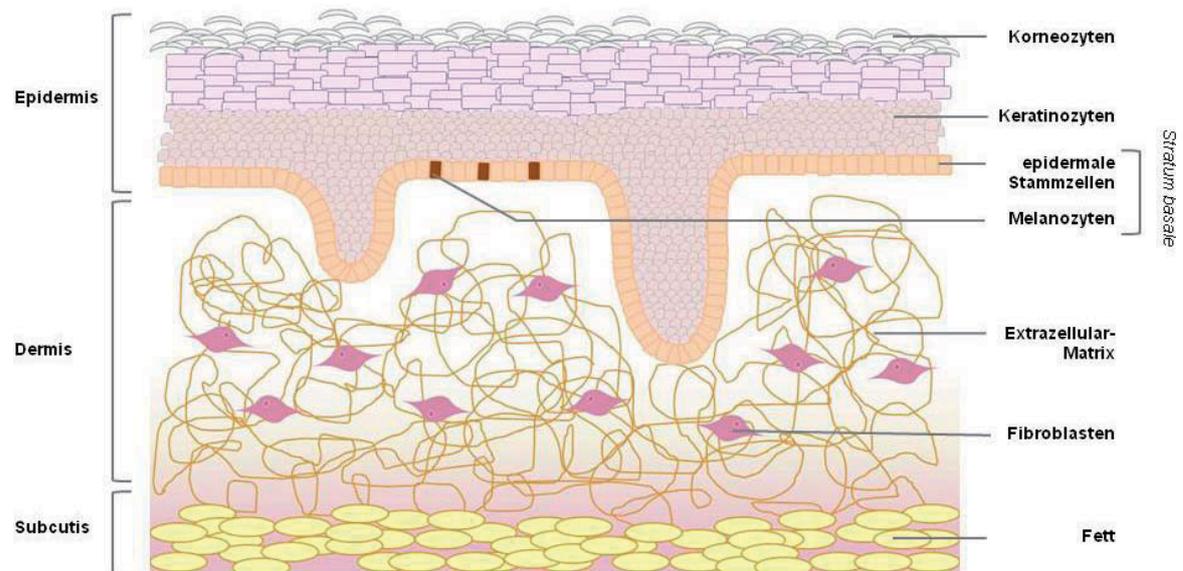
Die Haut wird grob in drei Schichten unterteilt; die oberste Schicht ist die Oberhaut (Epidermis), die sich nochmals in *Stratum corneum*, *Stratum granulosum* und *Stratum spinosum* unterteilt, darunter befindet sich die Lederhaut (Dermis), aus *Stratum papillare* und *Stratum reticulare*, und die dritte Schicht, die Unterhaut (Subcutis), die hauptsächlich aus Fett, Bindegewebe, Blutgefäßen und Nervenfasern besteht und der Thermoregulation dient.

Die drei Hautschichten beinhalten auch unterschiedliche Zelltypen und Komponenten mit verschiedenen Funktionen. Somit befinden sich in der Epidermis die Keratinozyten, die innerhalb von 28 Tagen aus epidermalen Stammzellen vom *Stratum basale* in apikale Richtung proliferieren und bis zu Korneozyten terminal differenzieren, welche als abgestorbene Zellen das mehrschichtige *Stratum corneum* bilden. Dadurch ist die Epidermis ein mechanischer Schutz vor äußeren Einflüssen, und verhindert durch Vernetzung von Lipiden den Verlust von Feuchtigkeit und Elektrolyten. Des Weiteren sind Melanozyten in der Basalmembran der Epidermis lokalisiert, welche das Pigment Melanin produzieren, das die Haut vor UV-Schädigung schützt.

Die Dermis wird durch die Basalmembran von der Epidermis abgegrenzt. Über zahlreiche Zapfen und Papillen sind die beiden Hautschichten miteinander verzahnt, wodurch die Kontaktfläche, und somit auch Nährstoffversorgung über Kapillargefäße, vergrößert wird. In der Dermis befinden sich die Fibroblasten, welche für die Synthese und Degradation der extrazellulären Matrix, wie z. B. Kollagen und Elastin, zuständig sind und somit entscheidend für die Festigkeit der Haut sind. Des Weiteren sezernieren Fibroblasten Wachstums- und Entzündungsfaktoren, z. B. nach UV-Schädigung, die auch Keratinozyten in der Epidermis erreichen und unter anderem Proliferation und Apoptose beeinflussen. Ne-

ben den Fibroblasten gehören auch Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen zu den dermalen Zellen.

Die Nervenzellen in der Haut innervieren alle Schichten und sind wichtig für die thermische und mechanische Wahrnehmung (Rhein & Fluhr, 2010).



**Abb. 1.1:** Schematischer Aufbau (nicht maßstabsgetreu). Querschnitt der menschlichen Haut von der äußeren Epidermis über die darunterliegenden Dermis und dem unterem Fettgewebe Subcutis.

## 1.2 UV-Strahlung und Haut

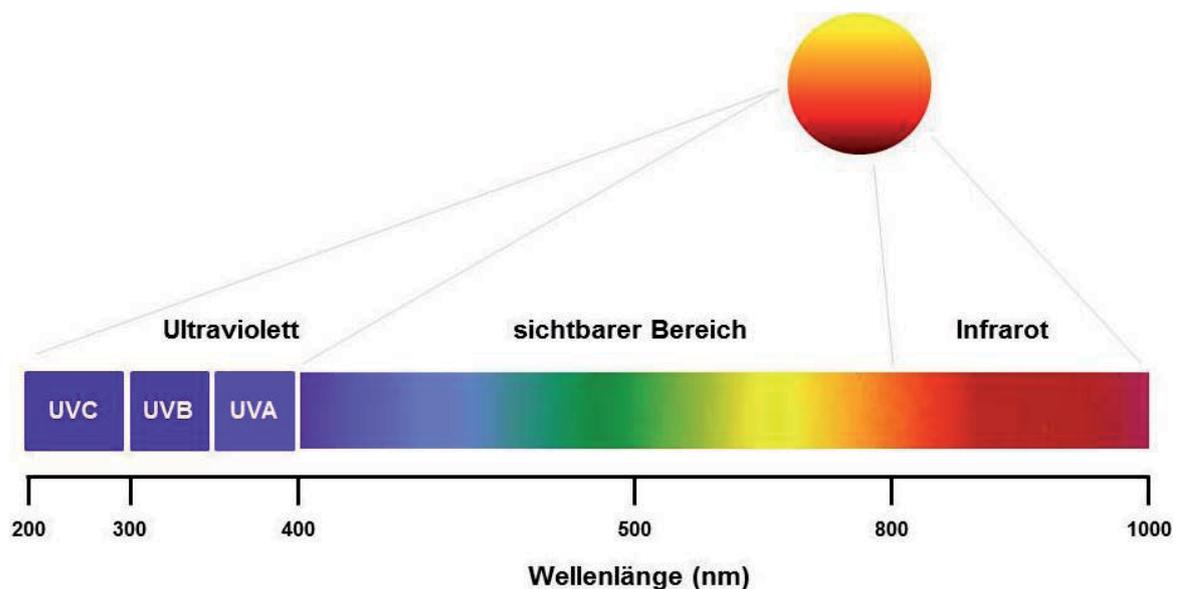
### 1.2.1 Das Sonnenlicht

Das elektromagnetische Spektrum der Sonnenstrahlung, das die Erdoberfläche erreicht, reicht von ultravioletter (UV) Strahlung ab 290 nm über den sichtbaren Bereich (VIS – *visible*) von 400–780 nm bis hin zur infraroten (IR) Strahlung von 780–1000 nm (Abb. 1.2). Die UV-Strahlung wird nochmals in UVA (320–400 nm), bzw. UVA-1 (350–400 nm) und UVA-2 (320–350 nm), in UVB (280–320 nm) und UVC (200–280 nm) unterteilt (Abb. 1.2).

Bevor die extraterrestrische als terrestrische Sonnenstrahlung auf der Erdoberfläche auftrifft, wird der größte Teil der UV-Strahlung, abhängig von der Wellenlänge, durch die Stratosphäre und Troposphäre, und das dort enthaltene Ozon ( $O_3$ ), absorbiert. Besonders die stark karzinogene UVC-Strahlung wird vollständig von der Atmosphäre abgefangen

und verfügt über keine physiologische Relevanz für den menschlichen Organismus. Letztendlich gelangt nur ein geringer Anteil der ursprünglichen UV-Strahlung auf die Erdoberfläche.

Durch anthropogene Spurengase, wie z. B. FCKW (Fluorkohlenwasserstoffe) und Distickstoffoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ), werden durch Energiezufuhr hochreaktive Cl- und NO-Radikale freigesetzt, die wiederum die schützende Ozonschicht angreifen können. Seit der Freisetzung erhöhter Mengen solcher Stoffe ist die Ozonschicht an vielen Stellen der Erde bereits kritisch dünn geworden. Dadurch ist die UVB-Belastung angestiegen und steht im engen Zusammenhang mit einem erhöhten Hautkrebsrisiko (De Gruijl, 1999).



**Abb. 1.2:** Schematische Auftrennung des terrestrischen Sonnenspektrums (200–1000 nm) nach der Wellenlänge vom ultravioletten (UV) über den sichtbaren (VIS) bis hin zum infraroten (IR) Bereich.

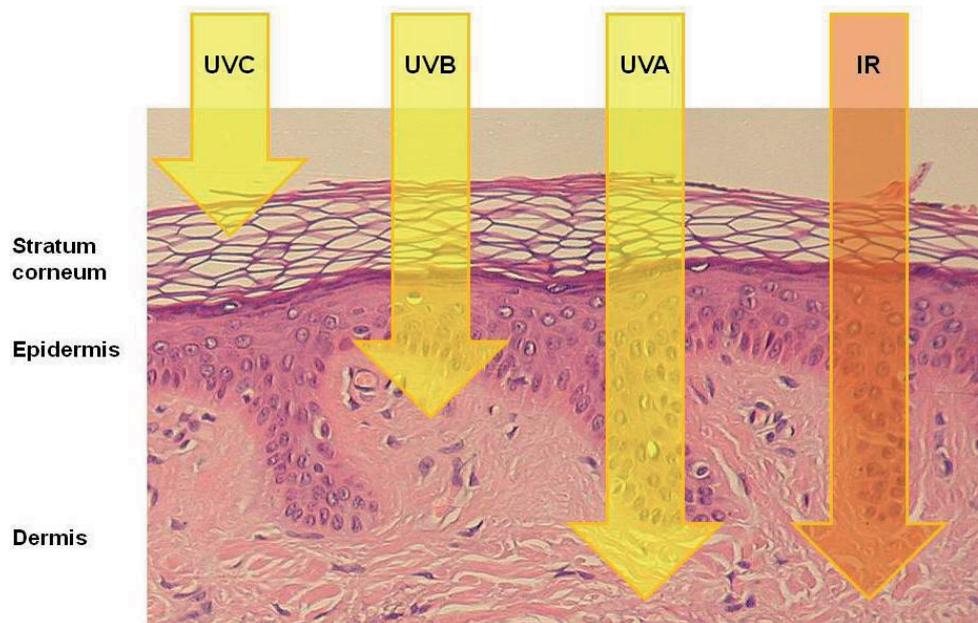
### 1.2.2 Absorption und Penetration von UV-Strahlung in der Haut

Voraussetzung für einen biologischen Effekt durch elektromagnetische Strahlung ist die Absorption durch einen Chromophor. Chromophore sind „Farbträger“, die z. B. in organischen Systemen bei einer entsprechenden Wellenlänge ein Absorptionsspektrum besitzen. Die Energie des absorbierten Lichtes entspricht dabei der Energie, die ein Elektron benötigt, um von seinem höchstbesetzten Molekülorbital (HOMO - *highest occupied molecular orbital*) zum nächsten nicht-okkupierten Molekülorbital (LUMO - *lowest*

*unoccupied molecular orbital*) zu gelangen. Im biologischen System wird die UV-Strahlung (200-350nm) z. B. von Aminosäuren, insbesondere den aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, und Nukleinsäuren absorbiert. Damit das Molekül wieder in seinen nichtangeregten Ursprungszustand zurückgeht wird unter anderem Licht (Fluoreszenz) oder Wärme freigesetzt.

Die Penetration von UV-Strahlung hängt zum einen von der Dicke der Epidermis ab, die arealabhängig von 20–5000  $\mu\text{m}$  variieren kann, und zum anderen von der Wellenlänge (Abb. 1.3). Je größer die Wellenlänge ist, desto tiefer dringt die Strahlung in die Haut ein und umgekehrt. UVC-Strahlung, die nicht die Ozonschicht durchdringt, würde von der obersten Schicht der Epidermis, dem *Stratum corneum*, reflektiert und absorbiert werden und weder Keratinozyten noch Fibroblasten direkt beeinflussen. Dagegen penetriert UVB-Strahlung die gesamte Epidermis und kann auch die oberste Schicht der Dermis erreichen. Allerdings wird sie zu einem großen Teil vom *Stratum corneum* reflektiert oder von Proteinen und Nukleinsäuren der Dermis absorbiert. Melanin, ein Pigment das als Eumelanin in den Melanozyten produziert wird, absorbiert sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung, wobei der angeregte Zustand des Moleküls durch sogenannte innere Umwandlung (IC, *internal conversion*) in Vibration umgesetzt wird und Wärme entsteht. Durch diesen Schutzmechanismus verringert sich die Freisetzung von Radikalen (Meredith & Riesz 2004). Des Weiteren können auch Nukleinsäuren (DNA 245-290 nm) und Proteine (Tyrosin-/Tryptophanreste:  $\lambda_{\text{max}} \approx 280 \text{ nm}$ ), Lipide, Karotinoide und Porphyrine als wichtige Chromophore wirken.

UVA-Strahlung hat weniger Energie als UVB-Strahlung, aber dringt aufgrund des Absorptionsspektrums deutlich tiefer in die Haut ein und erreicht sogar den Bereich der Subcutis. In der Epidermis wird die UVB-Strahlung überwiegend von Melanin und auch Nukleinsäuren absorbiert. Daher gelangt nur ein geringer UVB-Anteil in die tieferen Schichten, wogegen UVA-Strahlung durchaus weiter in die Haut eindringt. UVB steht auch im direkten Zusammenhang mit Immunsuppression, Prostaglandin-Induktion und Hautkarzinogenes.



**Abb. 1.3:** Penetration der UV- und IR-Strahlung durch die Haut. Die Tiefe der Penetration von elektromagnetischer Strahlung steigt mit der Wellenlänge. (Modifiziert nach: Tyrrell (1996) *Stress-inducible Cellular Responses*, Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland)

### 1.2.3 Photooxidativer Stress in der Haut

UV-Strahlung induziert eine Reihe von Schädigungen in der Haut, wobei ein bestimmter Anteil über die Generierung von freien Radikalen, insbesondere reaktive Sauerstoffspezies (ROS – *reactive oxygen species*), verläuft. Dabei entstehen oxidative DNA-Läsionen, die wiederum zu Mutationen führen können.

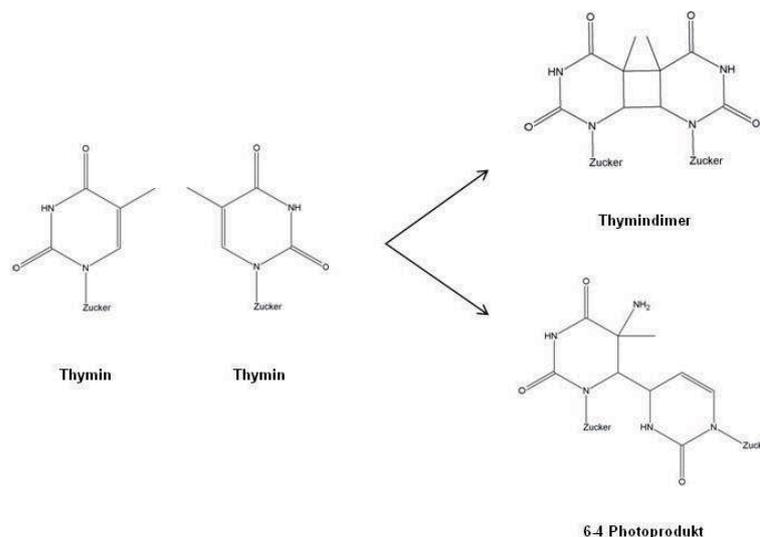
Mahns et al. (2003) konnten unter Einfluss von UVA-Strahlung *in vitro* die Bildung von  $H_2O_2$  in Zellkulturmedium nachweisen. Hierbei absorbierten Bestandteile des Zellkulturmediums die UVA-Strahlung und führten zu einer Generierung von ROS. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass das dabei entstandene Superoxid-Anion zu Wasserstoffperoxid dismutierte. In Zellen wird UVA-Strahlung von (Proto-)Porphyrinen, Flavinen und einigen Chinonen absorbiert (Tyrrell, 1991). Auch bei UVB-Bestrahlung werden nachweislich *in vivo* ROS gebildet. So wurden haarlose Mäuse mit UVB bestrahlt und nach nur 3 Stunden eine deutliche Zunahme an Lipidperoxidation in der Epidermis nachgewiesen (Fuchs & Packer, 1989; Nishi et al., 1991).

Photosensibilisatoren werden auch in der photodynamischen Therapie gegen Tumorzellen eingesetzt. Porphyrine werden vorzugsweise von stark proliferierenden Zellen aufgenommen und anschließend durch gezielte Bestrahlung angeregt. Dabei wird über vermehrte ROS-Bildung in den Zellen Apoptose induziert (Athar et al., 1989).

Des Weiteren hat UVB-Strahlung einen direkten Einfluss auf DNA und RNA, da Nukleinsäuren in einem Bereich von 260–265 nm ihr Absorptionsmaximum haben und somit auch im UVB-Bereich noch als Chromophor fungieren. UVB-Strahlung induziert die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD), wobei es zu kovalenten Bindung zwischen zwei benachbarten Cytosinen oder Thyminen kommt. Dasselbe gilt für doppelstrangige RNA, wobei hier die kovalente Bindung zwischen zwei benachbarten Uracilen entsteht. Die Bildung von CPDs führt zu Mutationen bei der DNA-Replikation, blockiert physikalisch die RNA Polymerase II und stoppt die Zellteilung (Moné et al., 2001;

Donahue et al., 1994).

Neben den CPD's können auch 6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte (6-4-PP) entstehen. Hierbei kommt es ebenfalls zu einer Fehlpaarung zweier Pyrimidine, allerdings an den Positionen 4 und 6 des Pyrimidin-Moleküls. Sind nach UVB-Einwirkung CPD's generiert worden, werden DNA-Reparaturmechanismen aktiviert.



**Abb. 1.4:** Beispiele von DNA-Schäden nach UV-Exposition. Aus 2 benachbarten Thyminen kann entweder ein Thymindimer oder 6-4-Photoprodukt entstehen.

Als weitere DNA-Schäden aufgrund von UV-Strahlungen in Zellen zählen oxidierte Basen (8-Oxo-7,8-Dihydroguanin (8-oxoG) oder 8-Oxo-7,8-Dihydroadenin (8-oxoA)), Basenmethylierungen oder Veränderung des Zuckergerüsts. Dabei kann es zu Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen, Basenfehlpaarung durch fehlerhafte Replikation oder Basenverlust kommen.

### 1.3 Intrinsische Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

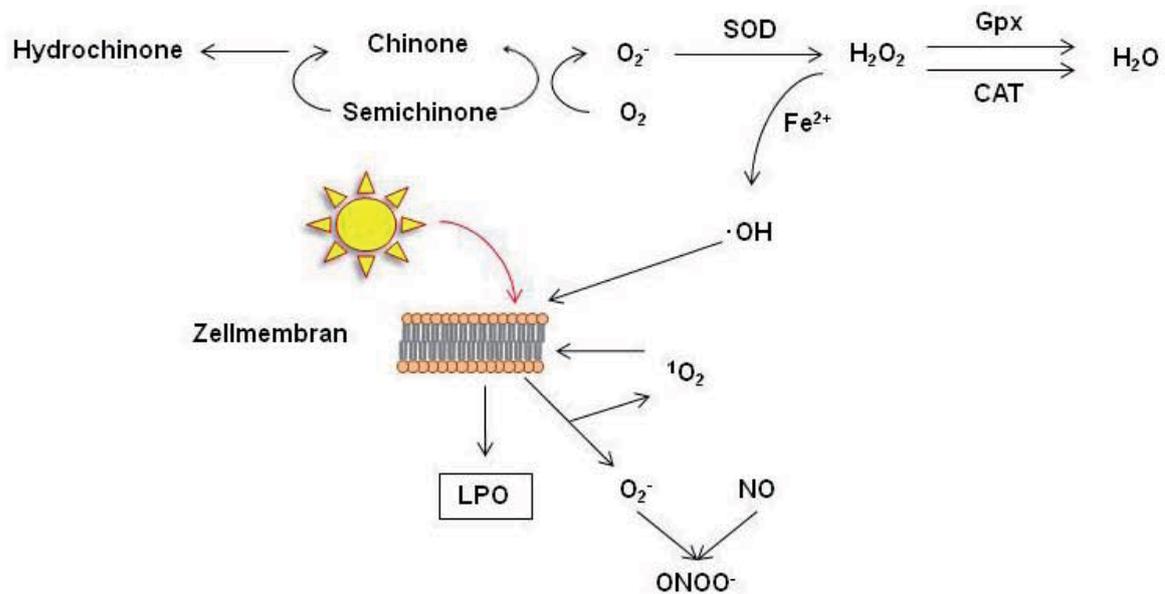
Aerobier sind Organismen, die Sauerstoff für ihren Stoffwechsel benötigen. Sie nutzen Sauerstoff als Elektronenakzeptor und reduzieren diesen über mehrere Stufen zu Wasser. Bei diesem Prozess können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (Fridovich, 1978). Es gibt eine Reihe verschiedener Typen von reaktiven Sauerstoffspezies: z.B. Superoxid-Radikalanion ( $O_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxylradikal ( $\bullet OH$ ), Peroxyl- ( $ROO\bullet$ ) und Alkoxyradikale ( $RO\bullet$ ). Reaktive Sauerstoffspezies entstehen innerhalb der Zelle unter anderem durch unvollständige Reduktion von Sauerstoff in der mitochondrialen Atmungskette. Beim Verbrauch des intrazellulären Sauerstoffs entsteht zunächst Superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), das spontan zu  $H_2O_2$  disproportionieren kann. Diese Reaktion wird auch durch Superoxiddismutasen (SOD) katalysiert. Das so entstandene Wasserstoffperoxid kann dann im nächsten Schritt durch die Katalase (CAT) oder Glutathionperoxidase (Gpx) zu Wasser umgesetzt werden.

Des Weiteren kann Superoxid mit Stickstoffmonoxid reagieren und somit Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) bilden. Stickstoffmonoxid- ( $NO\bullet$ ) und Stickstoffdioxidradikale ( $NO_2\bullet$ ) zählen zu den reaktiven Stickstoffspezies (RNS – *reactive nitrogen species*) und vermitteln ebenso wie ROS oxidativen Stress (Radi et al., 1991; Radi et al., 1991a).

Intrazelluläre Schutzsysteme bilden mit den reaktiven Spezies ein Fließgleichgewicht und verhindern Schädigungen an DNA, Lipiden und Proteinen. Überwiegen reaktive Spezies gegenüber den Antioxidantien, so werden Lipide und Makromoleküle oxidiert und oxidativer Stress entsteht (Sies, 1986; Sies, 1997). Die Akkumulation von oxidativen Schäden in Zellen führt zur Alterung und altersabhängigen Erkrankungen: Arteriosklerose, Osteoarthritis, neurodegenerative Störungen und verschiedene Formen des Krebses (Serri et al., 1979; Lopez-Torres et al., 1994)

In der Haut befinden sich verschiedene antioxidative Moleküle, die ROS reduzieren und oxidative Schädigungen weitgehend verhindern können. Hierzu gehören die bereits er-

wähnten Superoxiddismutasen, Katalase und Glutathionperoxidasen, aber auch alpha-Tocopherol (Vitamin E), Ascorbinsäure (Vitamin C), Glutathion S-Transferase (GST) und Glutathionreduktase (Amstad et al., 1991; Briganti & Picardo, 2003).



**Abb. 1.5:** Schematische Darstellung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und der antioxidativen Abwehr. Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) und  $H_2O_2$  entstehen durch die unvollständige Reduktion von Sauerstoff in der Atmungskette oder unter der Einwirkung von Fremdstoffen, wie Chinonen.  $O_2^-$  wird entweder spontan oder unter Katalyse durch Superoxiddismutase (SOD) zu  $H_2O_2$  überführt, das zur Bildung von Hydroxylradikalen über die Fenton-Reaktion führen kann, was wiederum Schäden in der Zelle verursacht. Wasserstoffperoxid wird von Glutathionperoxidasen (Gpx) oder Katalase (CAT) zu Wasser umgesetzt. UV-Einwirkung kann direkt zu Lipidperoxidation (LPO) führen oder  $O_2^-$  generieren. Sauerstoff kann entweder in einen angeregten Zustand, den Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ), übergehen oder zu Superoxid reduziert werden, das wiederum durch Verbindung mit Stickstoffmonoxid (NO) das hochreaktive Peroxynitrit bildet.

#### 1.4 ROS und Signaltransduktion

UV-Strahlung ist nicht nur in der Lage, Lipide, Nukleinsäuren, etc. zu oxidieren und ungerichtet Schaden zu verursachen, sondern auch Signalwege zu regulieren, wodurch verschiedene Zielgene transkribiert werden. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass ROS eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie z. B. AP-1 (*activator protein 1*) und NF- $\kappa$ B, induzieren kann (Dhar et al., 2002). Des Weiteren beeinflussen ROS stress-sensitive Kinasen, darunter auch die MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). UVB induziert die Phosphorylierung der Tyrosinkinase des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors

(EGFR - *epidermal growth factor receptor*), wodurch es zu einer Aktivierung des EGFR-Signalweges kommt und dabei ERK, p38 und JNK aktiviert werden (Maziere et al., 2003). Durch die p38 vermittelte Stressinduktion wird wiederum das Hitzeschockprotein (HSP) 27 phosphoryliert und verschiedene inflammatorische Signale, z. B. Interleukin-6 (IL-6) und Cyclooxygenase-2 (COX-2), induziert. Durch orale Applikation eines p38-Inhibitors und anschließender UVB-Bestrahlung konnte in Mäusen die UVB-verursachten Entzündungsreaktion verhindert werden (Kim, et al., 2005).

Zum einen sind ROS in der Lage, bei nicht toxischen Konzentrationen den PI3K/Akt-Signalweg zu inhibieren und Zelltod zu induzieren (Leslie, 2006), zum anderen kann Akt direkt oxidiert werden, wodurch es zu einem Funktionsverlust der Kinase kommt und der Signalweg ebenfalls unterbrochen wird (Murata et al., 2003). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass PTEN oxidiert wird und zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges führt. Somit kann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Stimulus für Akt wirken (Barthel & Klotz, 2005).

### 1.5 Insulin-responsive Signaltransduktion über den PI3K/Akt-Signalweg

Insulin, ein Proteohormon, welches von den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln in der Bauchspeicheldrüse gebildet wird, ist essentiell für die Regulation der Glukosekonzentration im Blutkreislauf. Nach Nahrungsaufnahme wird vermehrt Insulin freigegeben, um die Glukosekonzentration im Kreislauf zu senken und den Zellen Glukose zuzuführen. Als Gegenspieler ist das Hormon Glucagon bekannt, was wiederum zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels führt. Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselkrankheit, bei der die Regulation des Glukosespiegels gestört ist und die Glukosekonzentration im Blutkreislauf dauerhaft zu hoch ist. Diabetes mellitus wird in zwei verschiedene Diabetes Typen unterteilt; Bei Typ I sind die  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln in der Bauchspeicheldrüse zerstört, wodurch kein Insulin mehr produziert wird. Patienten mit Diabetes Typ II weisen eine Insulinresistenz auf, wobei anfangs vermehrt Insulin ausgeschüttet wird, allerdings die Zellen nicht mehr auf das Hormon reagieren.

Des Weiteren ist Insulin an der Regulation von Fett- und Aminosäurestoffwechsel, dem Kaliumhaushalt, aber auch von Proliferation und Zellwachstum beteiligt.

Der Insulinrezeptor besitzt eine extrazelluläre  $\alpha$ -Untereinheit (135 kDa) und zwei intrazelluläre  $\beta$ -Untereinheiten (95 kDa), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Bindet Insulin oder andere Wachstumsfaktoren, wie z.B. IGF-1 und IGF-2 (*insulin-like growth factor*), an die  $\alpha$ -Untereinheit, so wird eine heterologe Autophosphorylierung der Rezeptorkinase an Tyrosinresten der  $\beta$ -Untereinheiten induziert und somit das Signal von außen in die Zelle übertragen (Virkamäki et al., 1999).

Phosphoinositid 3'-Kinasen (PI3K) sind Lipidkinasen und besitzen neben einer regulatorischen Untereinheit (in der Regel p85, mit Varianten je Isoform) auch eine katalytische Untereinheit (je nach Isoform, in der Regel p110 oder p101). Die p85-Untereinheit trägt zwei Src-homology 2 (SH2)-Domänen, die phosphorylierte Tyrosinresten des Rezeptors binden und somit die Kinase aktivieren. Des Weiteren kann die Aktivierung von PI3K auch über die Bindung an ein zwischengeschaltetes Protein, das Insulinrezeptorsubstrat-1, erfolgen. Durch die Aktivierung der PI3-Kinase wird PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4',5'-bisphosphat), ein membrangebundener *second-messenger*, an der 3'-Position phosphoryliert, wodurch PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-3',4',5'-trisphosphat) entsteht. Die Entstehung von PIP<sub>3</sub> führt zur Rekrutierung sowohl der Serin/Threoninkinase Akt (PKB - Proteinkinase B) selbst, als auch der Akt phosphorylierenden Kinasen „*PIP3-dependent kinase 1*“ (PDK-1) und „*PIP3-dependent kinase 2*“ (PDK-2) an die Zellmembran. Dort wird Akt durch PDK-1 und PDK-2 an den Stellen Thr308 und Ser473 phosphoryliert, die notwendig sind, um eine Aktivierung der Kinase herbeizuführen (Alessi et al., 1997). Die aktivierte Form von Akt ist nun in der Lage, sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus andere Signalproteine zu phosphorylieren und deren Regulation zu beeinflussen. Inhibierend wirkt Akt auf Gsk3 (Glycogensynthasekinase-3), Bad, Caspase-9 und Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie, wodurch Proliferation, Zellzyklus, Stoffwechselprozesse und Apoptose beeinflusst werden (Cardone et al., 1998; Datta et al. 1997; Ozes et al., 1999; Wang et al., 1999).

Die Aktivierung von Akt kann durch unterschiedliche Phosphatasen verhindert werden. So können zum einen Proteintyrosinphosphatasen (PTPasen), wie z. B. PTPB1, die Phosphorylierung des Insulinrezeptors wieder aufheben (Kenner et al., 1996; Goldstein et al., 2000). Allerdings ist Akt wiederum in der Lage, PTP1B an Ser50 zu phosphorylieren und somit die Dephosphorylierung des Rezeptors zu verhindern, wodurch es zu einer Rückkopplung kommt (Ravichandran et al., 2001). Darüber hinaus sind Lipidphosphatasen in der Lage, in den Signalweg einzugreifen, indem PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) oder SHIP-2 (*Src-Homology Inositol Phosphatase-2*) PIP<sub>3</sub> an

3'- bzw. 5'-Position dephosphorylieren und so zu PIP<sub>2</sub> abbauen (Carracedo & Pandolfi, 2008), wodurch die Signalübertragung von PI3K auf PDK-1 und Akt unterbunden wird (Stambolic et al., 1998; Stocker et al., 2002).

Durch Wortmannin, einen aus *Penicillium wortmanni* isolierten Metaboliten, kann PI3K inhibiert werden. Dabei bindet Wortmannin spezifisch an ein Lysin im aktiven Zentrum der katalytischen Untereinheit und blockiert die Aktivität irreversibel (Yano et al., 1993). LY294002 [2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on] ist ebenfalls ein PI3K-Inhibitor, der allerdings reversibel an die katalytische Untereinheit p110 bindet.

### 1.6 Stressinduzierte Signaltransduktion über den JNK-Signalweg

Neben der insulinvermittelten Modulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren sind auch reaktive Sauerstoffspezies in der Lage, die Aktivität von FoxO-Proteinen zu beeinflussen.

Stressinduzierte Kinasen (SAPK – *stress activated protein kinase*) sind Proteinkinasen der MAP-(*mitogen-activated protein*)Kinase-Familie und werden durch Stressstimuli, unter anderem auch durch UVB, aktiviert. Zu ihnen gehören auch die p38 mitogenaktivierten Proteinkinasen und die c-Jun-N-terminalen Kinasen JNK (Adler et al., 1996). Oxidativer Stress führt zu einer doppelten Phosphorylierung von JNK an einem Thr-Pro-Tyr-Motiv, wodurch die Kinase aktiviert wird und wiederum Zielproteine über Phosphorylierung, sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma, moduliert (Kaneto et al., 2005). Zu den Zielproteinen im Zytosol gehören Bcl-2 und Akt, wobei Transkriptionsfaktoren wie p53 und FoxO-Proteine, aber auch PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor) im Zellkern durch aktiviertes JNK reguliert werden (Bogoyevitch & Kobe, 2006).

Anhand von FoxO4 konnte bereits gezeigt werden, dass JNK die Aminosäuren Thr447 und Thr451 von FoxO4 phosphoryliert und zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors aus dem Zytoplasma in den Zellkern führt. Während eine Phosphorylierung durch JNK zu einer Aktivierung der FoxO-Faktoren führt, hat eine Phosphorylierung durch Akt und SGK eine Inaktivierung zur Folge. (Essers et al., 2004; Oh et al., 2005). Hinzukommend können 14-3-3 Transportproteine, die für den Export der FoxOs notwendig sind, durch JNKs phosphoryliert und somit inaktiviert werden (Sunayama et al., 2005).

## 1.7 FoxO-Transkriptionsfaktoren

### 1.7.1 FoxO-Transkriptionsfaktoren

FoxO (*forkhead box class O*)-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, deren DNA-bindendes Element am N-terminalen Ende eine helixartige Struktur, auch „winged-helix“-Domäne genannt, aufweist (Kaestner et al., 2000). In *Drosophila melanogaster* wurde aufgrund einer Mutation in dem Gen *fkh*, die eine ektopische Kopfbildung im Vorder- und Hinterdarm zur Folge hatte, die Sequenz identifiziert (Weigel et al., 1989). FoxO-Faktoren sind hochkonserviert und in allen Eukaryoten vorzufinden; unter anderem in *Caenorhabditis elegans* als DAF-16 (*abnormal dauer formation-16*). Insgesamt sind mehr als 100 Fox-Proteine in Säugetieren bekannt und werden in Klassen von „A“ bis „S“ unterteilt. Klasse O umfasst vier verschiedene FoxO-Transkriptionsfaktoren, die in unterschiedlichen Geweben auch unterschiedlich stark exprimiert sind: FoxO1 (FKHR, *Forkhead in rhabdomyosarcoma*), FoxO3a (FKHRL1, *Forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1*), FoxO4 (AFX, *ALL1-fused-gene-from-chromosome-X*) und FoxO6, wobei FoxO6 nicht ubiquitär vertreten ist (Furuyama et al., 2000). Das ursprüngliche FoxO2-Protein wurde später als identisch mit FoxO3 identifiziert. FoxO5 wurde in Fischen (*Danio rerio*) identifiziert und als Homolog zu FoxO3a im Menschen erkannt (Rudd et al., 2003; Greer & Brunet, 2005).

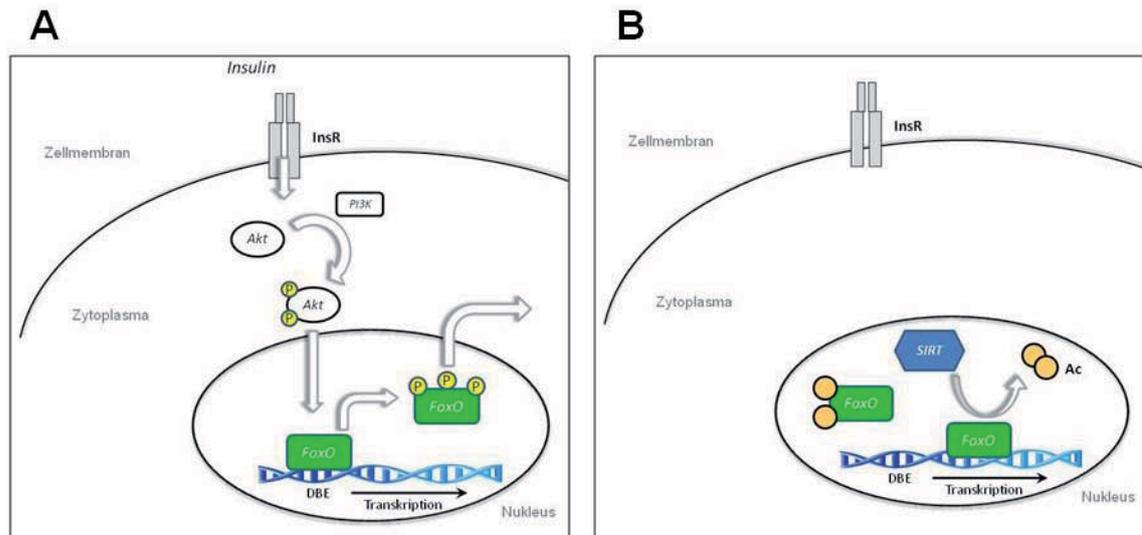
Um die Funktion der FoxO-Proteine genauer zu untersuchen, wurde im Mausmodell alle drei FoxO-Transkriptionsfaktoren je ein homozygoter Knockout durchgeführt. Die Maus-embryonen mit einem FoxO1a-Knockout starben bereits 11 Tage nach ihrer Geburt aufgrund von Missbildungen in der Gefäßentwicklung (Furuyama et al., 2004; Hosaka et al., 2004), wobei Mausembryonen einer FoxO3a- oder FoxO4a-Deletion lebensfähig waren. Ein dreifacher Knockout im hämatopoetischen System führte in adulten Tieren zu Defekten im Blutsystem und erhöhten ROS-Konzentrationen im Blut (Tothova et al., 2007).

FoxO-Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation von Zellzyklusstopp, Apoptose, antioxidativer Abwehr und DNA-Reparatur beteiligt (Arden, 2008).

### 1.7.2 Post-translationale Modulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren

FoxO-Aktivität wird durch eine Vielzahl von post-translationalen Modifikationen reguliert; Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, Methylierung und Glykosylierung. Hierdurch wird die subzelluläre Lokalisation und DNA-Bindeaktivität beeinflusst.

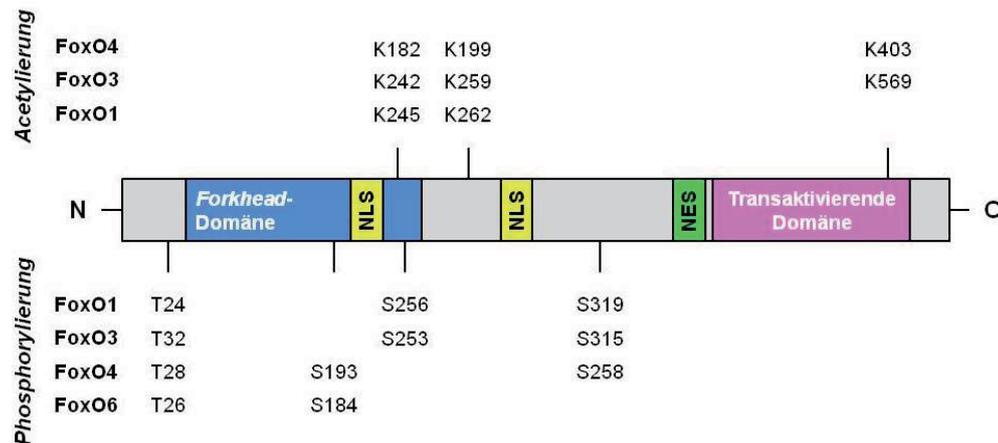
Im Modellorganismus *C. elegans* wird die Modulation von DAF16, dem Ortholog zu FoxO1a, anhand des Insulin-Signalweges veranschaulicht (Lee et al., 2001). Hierbei bindet ein Wachstumsfaktor, Insulin oder IGF (*insulin-like growth factor*) an den Insulinrezeptor, wobei eine Autophosphorylierung am Insulinrezeptor in der Zelle folgt, was zur Aktivierung der PI3K und anschließend Akt führt. Akt ist nun in der Lage, FoxO im Zellkern an spezifischen Phosphorylierungsstellen (z. B. für FoxO3a: Thr32, Ser253, Ser315) zu phosphorylieren, wodurch Chaperon-Proteine der 14-3-3-Gruppe an den Transkriptionsfaktor binden und FoxO aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportieren können. Die Phosphorylierung von FoxO1a an Thr24 und Ser256 ist verantwortlich für dessen Export (Zhao et al., 2004). Zusätzlich führt die Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung des Proteins und somit der Freilegung der Kernexportsequenz (NES – *nuclear export sequence*). Des Weiteren verändert 14-3-3 die Faltung von FoxO, sodass die Kernlokalisationssequenz verdeckt wird und eine Relokalisation in den Nukleus verhindert wird (Obsilova et al., 2005). Im Zytoplasma werden die FoxO-Proteine ubiquitiniert und proteasomal abgebaut (Matsuzaki et al., 2003; Plas & Thompson, 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Akt FoxO3a an Ser253 phosphoryliert und eine erhöhte Translokation des Transkriptionsfaktors ins Zytoplasma induziert (Brunet et al., 2009). Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinasen (SGKs – *serum and glucocorticoid-inducible kinases*) werden ebenfalls über den PI3K-Signalweg aktiviert und können FoxO3a an Ser315 phosphorylieren, was ebenfalls zum Kernausschluss führt (Brunet et al., 1999; Pearce, 2003).



**Abb. 1.6:** Schematische Darstellung der Regulation von FoxO-Proteinen. (A) Durch die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor (InsR) erfolgt die Aktivierung von PI3K und Akt-Phosphorylierung durch PIP<sub>3</sub>-abhängigen Kinasen an der Zellmembran. Akt phosphoryliert FoxO im Zellkern, wodurch das Adapterprotein 14-3-3 FoxO ins Zytosol transportiert und dort degradiert wird. (B) Deacetylierung von FoxO durch die NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase SIRT wird die Bindeaktivität seine Zielsequenz erhöht.

Neben der Phosphorylierung ist auch Acetylierung/Deacetylierung ein Mechanismus zur Regulation der FoxO-Aktivität. Das CREB (*cAMP response element binding*)-Protein-Bindeprotein (CBP) ist eine Histon-Acetyltransferase (HAT), die auch andere Proteine wie z. B. FoxO1a acetylieren kann und die Aktivität des Transkriptionsfaktors reduziert. Zudem wird durch die Acetylierung PI3K/Akt-abhängige Phosphorylierung ermöglicht (Matsuzaki et al., 2005). Die Deacetylierung durch SIRT (*silent information regulator 2*) an den Stellen Lys242, Lys245 und Lys262 hebt die Acetylierung durch CBP wieder auf und führt zu einer Aktivitätssteigerung von FoxO1a (Daitoku et al., 2004).

Zusätzlich wird durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung eine vermehrte Acetylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch den Proteinkomplex p300/CBP (Histon-Acetyltransferasen) induziert. Eine Behandlung mit Insulin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatte keinen Einfluss auf die Acetylierung von FoxO4 und deutet darauf hin, dass die FoxO-Modulation über die PI3K/Akt-vermittelte Phosphorylierung dominanter ist gegenüber der Acetylierung (van der Horst et al., 2004).



**Abb. 1.7:** Schematische Darstellung der FoxO-Proteine und ihrer Phosphorylierungs- bzw. Acetylierungsstellen, modifiziert nach van der Armando & Burgering (2007). Über die *Forkhead*-Domäne bindet der Transkriptionsfaktor an seine spezifische Promotorregion und induziert die Transkription bestimmter Zielgene. NLS (*nuclear localisation sequence*) und NES (*nuclear exclusion sequence*) bestimmen die subzelluläre Lokalisation der FoxOs.

### 1.7.3 FoxO Zielgene und deren Bedeutung

FoxO-Transkriptionsfaktoren binden an ihre spezifische Zielsequenz (5'TTGTTTAC3') (Furuyama et al., 2000) und sind in der Lage, sowohl induzierend als auch reprimierend auf eine Vielzahl von unterschiedlichen Zielgenen zu wirken. Diese regulieren unter anderem Zellzyklus, Apoptose, Glukosemetabolismus und die antioxidative Abwehr der Zellen.

Zur Abwehr gegen oxidativen Stress induzieren FoxO-Proteine Mangan-Superoxid-dismutase (MnSOD) und Katalase zum Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (Huang & Tildall, 2007). Sowohl extrinsischer als auch intrinsischer Stress führen zu DNA-Schäden, wodurch wiederum FoxO aktiviert werden können und die Expression von *Gadd45a* (*growth arrest and DNA damage response gene product of 45 kDa*) induziert wird. Unter oxidativem Stress verhindern *Gadd45a* und Cyclin G2 den Übergang von der Zellzyklusphase G2- zu M-Phase, was zu einem Zellzyklusstopp führt. In dieser Zeit werden DNA-Reparaturmechanismen initiiert (Furukawa-Hibi et al., 2002; Tran et al., 2002). Des Weiteren konnte durch eine Überexpression von FoxO-Proteinen in immortalisierten Mausfibroblasten gezeigt werden, dass vermehrt KIP1 (*kinase inhibitor protein p27*,  $p27^{kip1}$ ) induziert wird. Dieses Protein inhibiert die Aktivität von cyclinabhängigen Kinasen und führt ebenfalls zu einem Zellzyklusstopp, hier allerdings

von der G1- in die S-Phase (Collado et al., 2000; Medema et al., 2000). In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren werden FoxO-Proteine im Zellkern lokalisiert und induzieren die Expression von p21<sup>WAF1</sup> (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) (Huang & Tildall, 2007).

Darüber hinaus sind FoxO-Transkriptionsfaktoren nicht nur in der Lage, den Zellzyklus zu unterbrechen, sondern auch Apoptose einzuleiten. Demzufolge kann auch eine Überexpression von FoxO-Proteinen zu einer Induktion von FasL (Fas-Ligand) führen und Apoptose auslösen (Zheng et al., 2000; Dijkers et al., 2002). Als weitere FoxO-Zielgene, die ebenfalls Zelltod induzieren, zählen Bim (*Bcl2-interacting mediator of cell death*) und TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Huang & Tildall, 2007).

Neben der antioxidativen Abwehr regulieren FoxO-Transkriptionsfaktoren die Bildung von Proteinen des Glukosestoffwechsels. Durch Insulinbehandlung wird die Expression von G6Pase (Glukose-6-Phosphatase) und auch PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase), die Reaktionsschritte der Gluconeogenese katalysieren, inhibiert (Schmoll et al., 2000). Ebenso wird IGFBP-1 (*Insulin-like growth factor binding protein 1*) durch FoxO-Proteine induziert, was IGF (*Insulin-like growth factor*) bindet und zu einer Verlängerung der Halbwertszeit von IGF führt (Guo et al., 1999).

#### 1.7.4 FoxO-Proteine und Co-Regulatoren

FoxO-Transkriptionsfaktoren wirken nicht nur alleine auf bestimmte Zielgene, sondern wirken auch in Zusammenarbeit mit anderen Co-Faktoren.

PGC-1 $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) ist ein Transkriptions-Co-Aktivatoren und sowohl an der Regulation antioxidativer Abwehrmechanismen als auch mitochondrialer Biogenese beteiligt (St-Pierre et al., 2006). In murinen Endothelzellen und Fibroblasten konnte eine direkte Abhängigkeit von FoxO3a-Zielgenen, die an der antioxidativen Abwehr beteiligt sind, durch PGC-1 $\alpha$  nachgewiesen werden. Eine Deletion von PGC-1 $\alpha$  hatte zur Folge, dass die Expressionsrate dieser Zielgene deutlich reduziert war und in Folge dessen die ROS-Spiegel zunahmen. Des Weiteren beeinflusst FoxO3a die Expression von PGC-1 $\alpha$  und es kommt somit zu einer Autoregulation von FoxO3a/PGC-1 $\alpha$  (Valle et al., 2005; Olmos et al., 2009). Zudem wurde in Rattenleberzellen gezeigt, dass FoxO1a die Promotoraktivität von

Selenoprotein-P, ein weiteres Zielgen der FoxO-Faktoren, induziert und durch Überexpression von PGC-1 $\alpha$  noch zusätzlich gesteigert wird (Speckmann et al., 2008).

$\beta$ -Catenin, ein wichtiger Modulator im Wnt (*wingless Int*)-Signalweg, steht im engen Zusammenhang mit der Entstehung von Darmkrebs und inflammatorischen Prozessen. Es ist in der Lage, direkt an FoxO-Proteine zu binden und die FoxO-Aktivität zu steigern. So wurde anhand des Modellorganismus *C. elegans* gezeigt, dass ein Verlust des  $\beta$ -Catenin Orthologen BAR-1 die Expression des DAF-16 Zielgens *sod3* verringert war (Essers et al., 2005).

### 1.7.5 FoxO-Transkriptionsfaktoren und Alterung

Bereits in *C. elegans* wurde beobachtet, dass unter bestimmten äußeren Bedingungen die postembryonale Entwicklung der verschiedenen Larvenstadien (L1–L4) unterbrochen werden kann, und so eine längere „Überdauerung“ der Larve begünstigt wird. DAF-16 spielt hierbei eine zentrale Rolle, ob die Embryogenese unterbrochen wird oder nicht (Cassada & Russel, 1975). Des Weiteren führt der Verlust von DAF-2 durch Mutation des Gens *daf-2*, Ortholog zum Insulinrezeptor, oder des *age-1*-Gens (Ortholog der PI3K) zu einer Verdopplung der Lebensspanne (Kenyon et al., 1993).

Im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von dFOXO die Lebensspanne um ca. 50 % verlängert, Körperfett reduziert und die Stressresistenz steigert (Hwangbo et al., 2005).

Aber nicht nur das direkte Eingreifen in den Signalweg moduliert FoxOs, sondern auch die Zufuhr bzw. Abstinenz von Nahrung beeinflusst die Regulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren über den Insulinsignalweg. Bereits 1935 beobachtete McCay et al., dass durch Kalorienrestriktion (*caloric restriction*) die Lebensspanne von Nagetieren verlängert und eine Vielzahl von altersabhängigen Erkrankungen vermindert werden kann (Weindruch & Walford, 1988).

In einer Studie von 2008 wurden Probanden mit chronischen Erkrankungen (z. B. Diabetes Typ II, Krebs, Herz-/Kreislauf-Beschwerden) mit gesunden Probanden hinsichtlich des Insulinsignalweges und den involvierten Genen analysiert. Dabei wurden drei Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP - *single nucleotide polymorphism*) im Gen von *foxo3a* in älteren gesunden Probanden beobachtet. Des Weiteren erhöhte die SNPs die

Lebenserwartung der Probanden und diejenigen, die einen nicht so stark ausgeprägten Genotyp hatten, neigten im Alter zu vermehrt chronischen Erkrankungen (Willcox et al., 2008).

In einer weiteren unabhängigen Studie wurden in 1700 Hundertjährigen sogar 16 verschiedene SNPs im Gen von *foxo3a* nachgewiesen. Ein Vergleich zwischen jungen Probanden, alten Menschen unter 100 Jahren und Hundertjährigen zeigte, dass vermehrt bei den Hundertjährigen SNPs für FoxO3a auftraten und mit Langlebigkeit in Zusammenhang gebracht wurden. Ähnliche Untersuchungen für FoxO1a, FoxO4 und FoxO6 konnten keine Einzelnukleotidpolymorphismen aufzeigen, die mit dem Alter korrelieren (Flachsbart et al., 2009; Kleindorp et al., 2011).

## 1.8 Sirtuine

Sirtuine (SIRT-Proteine) sind  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamidadenindinukleotid)-abhängige Deacetylasen und ADP(Adenosindiphosphat)-Ribosyltransferasen, die in den 90er Jahren erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben worden sind. Sirtuine sind Histon-Deacetylasen (HDAC) der Klasse III, wobei die Lysinreste von Proteinen deacetyliert werden und die Acetylgruppe auf den 2'- oder 3'-Rest der Ribose von  $\text{NAD}^+$  übertragen wird. Durch Histon-Deacetylierung bindet vermehrt Chromatin an die Histone, wodurch einige Chromatinbereiche unerreichbar für Replikation, Rekombination und Transkription werden. Nach der Deacetylierung verbleiben als Reaktionsprodukt nur noch das deacetylierte Protein, Nicotinamid und O-Acetyl-ADP-Ribose (Blander & Guarente, 2004; Sauve et al., 2006).

Sirtuine sind hochkonservierte Enzyme, die in allen Eukaryoten vorkommen, wobei SIRT1 ein Homolg zu *sir2* aus der Hefe ist. Säugetiere exprimieren sieben verschiedene Sirtuine (SIRT1 – SIRT7), welche unter anderem durch ihre unterschiedliche subzelluläre Lokalisation auch unterschiedliche Funktionen übernehmen (Haigis & Guarante, 2006). SIRT1, SIRT6 und SIRT7 sind im Nukleus lokalisiert, wodurch sie Einfluss auf DNA-Reparatur, Transkription, Zellzyklus und Stressresistenz nehmen. SIRT3 – 5 sind in den Mitochondrien vertreten und regulieren metabolische Prozesse (Michan & Sinclair, 2007).

SIRT1 ist das meistbeschriebene Sirtuin und kann wie SIRT2 sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert sein (North & Verdin, 2007; Tanno et al., 2007). Neben der

Histon-Deacetylierung werden noch weitere Proteine, wie z. B. p53, p73, FoxO oder NF- $\kappa$ B, von Sirtuinen deacetyliert und somit Transkription, Apoptose oder metabolische Prozesse beeinflusst. Es ist beschrieben, dass SIRT1 den Tumorsuppressor p53 deacetyliert, wodurch Apoptose und DNA-Reparaturmechanismen inhibiert werden, was als problematisch für die therapeutische Krebsbehandlung gilt (Olmos et al., 2010). Des Weiteren deacetylieren SIRT1 und SIRT2 FoxO-Proteine. FoxO1a und FoxO4 werden durch Deacetylierung aktiviert und die Expression von MnSOD sowie GADD45 induziert (Tran et al., 2002; Furukawa-Hibi et al., 2002). Des Weiteren wurde eine direkte Interaktion zwischen SIRT1 und FoxO3a durch oxidativen Stress beschrieben. Durch Hitzeschock, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- oder Menadion-Behandlung wurde die Translokation von FoxO3a aus dem Zytoplasma in den Zellkern induziert, allerdings nicht mit IGF-1 oder UV-Strahlung (Brunet et al., 2004). Außerdem konnte durch Aktivierung mit Resveratrol-Behandlung eine FoxO-abhängige Steigerung der Gluconeogenese nachgewiesen werden (Frescas et al., 2005). Zusätzlich führt eine Inhibierung von SIRT2 durch Sirtinol oder Nicotinamid zu einer erhöhten Apoptoserate (Cong et al., 2008).

Dadurch werden Sirtuine, und damit verbunden FoxO-Regulation, mit der Verlängerung der Lebensspanne in Verbindung gebracht. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass SIRT1 inhibierend auf FoxO-Transkriptionsfaktoren wirken kann (Motta et al., 2004). Dennoch konnte anhand vieler Studien gezeigt werden, dass Sirtuine zu einer Aktivitätssteigerung der FoxO-Proteine und auch deren Zielgene führen (van der Horst et al., 2004; Brunet et al., 2004; Daitoku et al., 2004).

### 1.9 Fragestellung

FoxO-Transkriptionsfaktoren sind an verschiedenen altersrelevanten zellulären Prozessen beteiligt, darunter die Kontrolle der Expression von Genen zur Regulation von Zellzyklusstopp, Apoptose, antioxidativer Abwehr, Proliferation, Energiestoffwechsel und DNA-Reparatur (Greer & Brunet 2005). Die Modulation der FoxO-Proteine wurde anhand unterschiedlichster Stressstimuli, wie z. B. Schwermetallionen (Eckers et al., 2009), bereits beschrieben, jedoch ist über die Expression und Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren unter UVB-Einfluss in humanen dermalen Fibroblasten nichts bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von UVB-Strahlung auf Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie in Hautzellen untersucht. Es sollten

- i) die Expressionsmuster der FoxO-Isoformen FoxO1a, 3a und 4 sowie der SIRT-Isoformen SIRT1 – SIRT7 analysiert werden
- ii) Änderungen von FoxO-Expressionsmuster und -Aktivität unter Einfluss subtoxischer UVB-Bestrahlung sowie die Rolle des PI3K/Akt-Signalweges untersucht werden
- iii) unterschiedliche *in vitro*-Alternsmodelle hinsichtlich ihrer FoxO-Expressionsmuster im Alter verglichen werden

## 2. Material und Methoden

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

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Isolation epidermaler Zellen

Für die Isolation epidermaler Zellen aus unterschiedlichen Arealen (z. B. Bauch, Brust, Lid, Ohr) wurden Biopsien zunächst von Haaren und Fett gesäubert und in kleine Quadrate geschnitten. Anschließend wurden die Hautstücke zur oberflächlichen Sterilisation kurz in 70 % Ethanol getaucht, dann in zwei Schritten mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und für 2 Std. bei 37°C in Dispase (PAA, Pasching, Österreich) inkubiert. Danach wurde die Epidermis von der Dermis mit einer Pinzette abgelöst und in frisches PBS überführt. Die Dermisstücke wurden in einer 6-Loch-Platte ca. 20 Min. angetrocknet und dann mit Zellkulturmedium (s. 2.1.2) beschichtet.

Die Epidermis wurde nach der Trennung von der Dermis in Trypsin-EDTA-Lösung (PAA) überführt und für 5–10 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels Triturieren vereinzelt und die Trypsinaktivität durch Zugabe von Stopp-Medium [PBS, Penicillin/Streptomycin (100 U/ml bzw. 0,1 mg/ml), 10 % FCS (*fetal calf serum*, PAA)] abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1000 rpm für 5 Min. zentrifugiert, anschließend das Zellpellet in Keratinozytenmedium (KGM-2, Lonza, Basel, Schweiz) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

#### 2.1.2 Anzucht von Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen primäre Hautfibroblasten aus Vorhaut (entnommen an der Universitätsklinik Düsseldorf; Quelle: Dr. Peter Schröder, IUF) und aus Hautbiopsien Probanden unterschiedlichen Alters (Quelle: Dr. G. M. Muhr, Beiersdorf

AG, Hamburg), zum anderen die Keratinozytenzelllinie HaCaT, immortalisierte humane Keratinozyten aus der distalen Peripherie eines Melanoms (Quelle: Dr. P. Boukamp, Heidelberg), verwendet.

Beide Zelltypen wurden in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM mit 1 g/l Glukose, PAA), versetzt mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMax<sup>TM</sup>-I, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) und Penicillin/Streptomycin (100 U/ml bzw. 0,1 mg/ml), in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % (v/v) bei 37°C kultiviert. DMEM ohne FCS wurde als FCS-freies bzw. serumfreies Medium oder 0 %/DMEM bezeichnet.

Zum Waschen kultivierter Zellen wurde PBS (*phosphate buffered saline*, PAA, 140 mM NaCl; 11,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) verwendet.

Zum Passagieren oder Einfrieren wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % herangezogen, mit PBS gewaschen und mit 17 µl Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 mg/ml) je cm<sup>2</sup> inkubiert. Nach Ablösen der Zellen unter mikroskopischer Beobachtung wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von Zellkulturmedium abgestoppt, die Zellen resuspendiert und verdünnt in Zellkulturflaschen oder -schalen überführt.

### 2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurde nach der Trypsinierung (s. 2.1.2) die Zellsuspension bei 1000 g für 2 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Einfriermedium [Zellkulturmedium, 20 % FCS, 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)] resuspendiert und bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dabei wurden Zellen einer vollbewachsenen 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche auf drei Gefrier Röhrchen aufgeteilt oder 10<sup>6</sup> Zellen pro ml eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden durch Zugabe von vorgewärmtem Zellkulturmedium rasch aufgetaut und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach ca. 4 Std., nachdem die Zellen adhärirt waren, wurde das Medium ausgetauscht, um abgestorbene Zellen und das DMSO des Einfriermediums zu entfernen.

#### 2.1.4 UVB-Behandlung von Zellen

Für die Behandlung mit UVB wurden Zellen in 96-, 24- oder maximal 6-Loch-Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz ca. 80 % herangezogen. Größere Kulturschalen hätten eine gleichmäßige Bestrahlung der gesamten Zellfläche nicht zugelassen. Vor der Bestrahlung der Fibroblasten wurde das UV-Bestrahlungsgerät Oriol (Lot Oriol Gruppe, Darmstadt) mit einer 1600 W Xenon Kurzbogenlampe (ozonfrei, Modell Nr. 62711 von Newport, Stratford, USA) mit dem entsprechenden UVB-Filter (Spezialanfertigung: „UVB-Bandpassfilter“ von Tafelmaier Dünnschicht Technik GmbH, Rosenheim) nach einer Vorlaufzeit von ca. 15 Min. mittels UV-Meter (IL1700 Research Radiometer, InternationalLight Technologies, Massachusetts USA) vermessen und so die Bestrahlungsdauer zum Erreichen einer Dosis von  $100 \text{ J/m}^2$  ermittelt. Der Filter lässt nur die Wellenlängen im UVB-Bereich ( $\lambda = 280\text{-}320 \text{ nm}$ ) hindurch, wobei ein Emissionsmaximum bei  $\lambda = 310 \text{ nm}$  erreicht wird. Ein geringer Teil an UVA-Strahlung ist nicht völlig auszuschließen, aber in Anbetracht der eingesetzten geringen UVB-Dosis und somit relativ kurzen Bestrahlungsdauer vernachlässigbar. Die Expositionszeit für eine bestimmte Dosis wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Expositionszeit [s]} = \text{Dosis [J/m}^2\text{]} / (10 \times \text{Strahlungsintensität [mW/cm}^2\text{]})$$

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch eine dünne Schicht PBS ( $100 \mu\text{l/cm}^2$ ) bestrahlt bzw. im Falle der Kontrollen lediglich ohne UVB-Behandlung unter PBS inkubiert. Im Anschluss wurde das PBS entfernt und die Fibroblasten in Zellkulturmedium bei  $37^\circ\text{C}$  weiter inkubiert.

#### 2.1.5 Verwendung von Inhibitoren

Für die Verwendung der PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 (Sigma Aldrich) wurden Fibroblasten für Western-Blot Analysen in 6-Loch-Zellkulturplatten und für Reporteranalysen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Um eine Endkonzentration von  $100 \text{ nM}$  Wortmannin und  $20 \mu\text{M}$  LY294002 zu erreichen, wurden die Inhibitoren in Zellkulturmedium verdünnt und für 30 Min. auf den Zellen präinkubiert, bevor eine UVB-Behandlung folgte.

### 2.1.6 Viabilitätsbestimmung nach UVB-Behandlung

Zellviabilität wurde mittels *WST-1 Cell Proliferation Reagent* (Roche) nach Angaben des Herstellers überprüft. Hierfür wurde der Überstand entfernt und eine 1:10-Verdünnung des Reagens ins Kulturmedium gegeben. Nach 2 Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurden die Proben in der Platte bei einer Absorption von 460 nm (*reference* 650 nm) vermessen. Für die Korrelation von Emission und Zellzahl wurden die Fibroblasten im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen und mit Propidiumiodid (Invitrogen) in 1:4 PBS/EtOH angefärbt. Die Gesamtfluoreszenz pro Loch wurde ebenfalls im TECAN infinite M1000 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei 535 nm angeregt und 617 nm detektiert.

### 2.1.7 Zellproliferations-Analyse (BrdU)

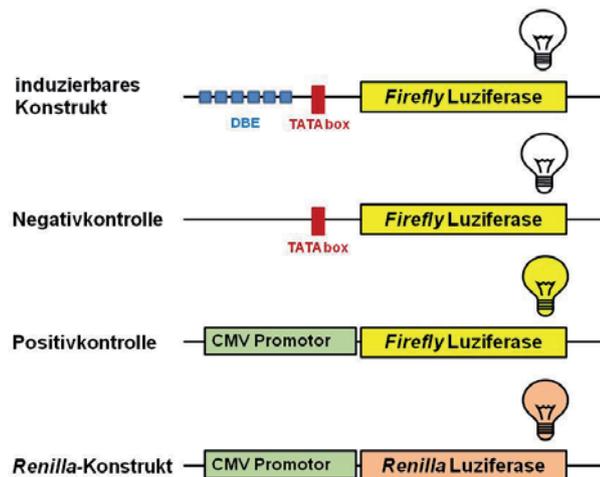
Zellproliferation wurde mittels BrdU-Test (5-Bromo-2'-desoxyuridin) analysiert. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers (*Cell Proliferation ELISA, BrdU*, Roche) durchgeführt.

Hierfür wurde der Überstand von den Fibroblasten entfernt, die Zellen 3x mit PBS gewaschen und für 30 Min. in 200 µl Fixierlösung (*FixDenat Solution*) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden 100 µl der in „*Anti-BrdU-POD Working Solution*“ 1:100 verdünnten BrdU-Antikörperlösung für 90 Min. hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Antikörperlösung abgeschüttet und die gefärbten Zellen 3x mit der dazugehörigen „*Washing Solution*“ gewaschen. Zur Detektion wurden 100 µl „*Substrate Solution*“ hinzugegeben und für 5–30 Min., bis eine Farbentwicklung zu beobachten ist, inkubiert. Zuletzt wurden die Proben bei 370 nm (*reference* 492 nm) im TECAN infinite M1000 vermessen. Für den Abgleich des Hintergrundes wurde ein Loch der Zellkulturplatte mit Medium ohne Zelle behandelt und ebenfalls mit vermessen.

### 2.1.8 Transiente Transfektion in primären Fibroblasten

Für die transiente Transfektion von Hautfibroblasten wurden die Zellen in 24-Loch-Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 50-70 % in Kompletmedium kultiviert. Als Transfektionsreagens für Reportgenanalysen wurde *Lipofectamine LTX and Plus*

*Reagent* (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden die Zellen in 24-Loch-Zellkulturschalen herangezogen und je Loch mit 180 ng Reporterkonstrukt (CCS-1022L, Qiagen, Hilden), 0,5 µl *PLUS* Reagenz und 0,6 µl *Lipofectamine LTX* transfiziert. Nach 6 Stunden wurde das Transfektionsgemisch für die Negativ- und Positivkontrolle gegen Medium ausgetauscht und die Zellen mit dem transfiziertem Reporterkonstrukt behandelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen lysiert und die Proben vermessen (s. Reporteranalyse).



**Abb. 2.1:** Darstellung der verwendeten Reportergenkonstrukte (modifiziert nach: Handbuch CCS-1022L, Qiagen, Hilden). Das induzierbare Konstrukt enthält mehrere FoxO-Zielsequenzen hintereinander (DBE – DAF16 binding element), eine TATA-Box und das Reporterogen *Firefly* Luziferase. Die Negativkontrolle ist bis auf die fehlende DBE-Region gleich zu dem induzierbaren Konstrukt. Bei der Positivkontrolle ist nur ein CMV(Cytomegalo-Virus)-Promotor vor das Reporterogen geschaltet, wodurch die Luziferase konstitutiv aktiv ist. Das *Renilla*-Konstrukt ist ebenfalls durch den CMV-Promotor permanent aktiv, allerdings wird hier die *Renilla*-Luziferase transkribiert und dient als Normierung der Transfektionseffizienz.

### 2.1.9 Reporteranalyse

Die Vermessung der FoxO-abhängigen Luziferaseaktivität erfolgte mit Hilfe des „*Dual Luciferase® Reporter Assay*“ Systems (Promega, Mannheim) in einem *TECAN infinite M1000* (Tecan Group Ltd.) mit Injektoranlage und der dazugehörigen Software.

Nachdem die Fibroblasten transfiziert und behandelt worden waren, wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 50 µl PLB (*passive lysis buffer*, Promega) bei -80°C eingefroren. Die Zellkulturplatten wurden vor der Messung wieder aufgetaut, die Proben mit Hilfe eines Zellschabers lysiert und das Lysat in ein

Eppendorfggefäß überführt. Für die Analyse der Luziferaseaktivität wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen und von jedem Lysat 20 µl in eine weiße 96-Loch Lumineszenzplatte (Greiner) pipettiert. Zuerst wurde durch Zugabe von 100 µl LAR II (*luciferase assay reagent II*)-Reagens die reporterabhängige Lumineszenz gemessen, anschließend die Reaktion mit 100 µl S&G (*stop & glow*)-Lösung abgestoppt und die Aktivität der Renilla-Luziferase für den Abgleich protokolliert.

## 2.2 Seneszenzabhängige $\beta$ -Galaktosidase Färbung (SA- $\beta$ -Gal)

Für die Anfärbung von Zellen mit seneszenzabhängiger  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) wurden Fibroblasten bis zu einer Zelldichte von ca. 50-75 % in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 30 mm herangezogen. Die Zellen wurden für die Fixierung mit PBS gewaschen, für 7 Min. bei Raumtemperatur mit einer Fixierlösung (2 % Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd) inkubiert, anschließend nochmals mit PBS gewaschen und über Nacht mit 1 ml Färbelösung [1 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal, Roche), 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(II) (Roth, Karlsruhe), 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) (Roth), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, mit HCl auf pH 6,0 titriert] bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde die Aktivität der lysosomalen  $\beta$ -Galaktosidase mit Hilfe derselben, jedoch auf pH 4,0 eingestellten Färbelösung nachgewiesen. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung entfernt, die fixierten Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend ausgewertet. Alternativ konnten die Präparate mit PBS beschichtet für mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden. Die Auswertung erfolgte mittels Auszählung von drei Gesichtsfeldern und mindestens 150 Objekten unter einem Lichtmikroskop.

## 2.3 Proteinanalytik

### 2.3.1 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte nach Lowry et al. (1951). Die Lysate wurden im Lysispuffer (s. u.) mit Hilfe eines Zellschabers auf Eis erzeugt und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Für die Proteinquantifizierung wurden die Lysate aufgetaut, sonifiziert, um die auf genomische DNA zurückzuführende Viskosität der Proben zu verringern, und anschließend bei 4°C und 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt und mittels *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* (Pierce Protein Research

Products, Rockford USA) nach Angaben des Herstellers im Spektralphotometer (PowerWave 340, BioTeK, Bad Friedrichshall) bei 562 nm quantifiziert.

Die Proteinkonzentration wurde aus der Absorption, korreliert mit einer mitgeführten BSA-Eichgeraden (0,2–2 µg/µl), bestimmt.

Lysispuffer:

- 1x Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Beverly USA)
- 175 µM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
- 1x Proteaseinhibitor (Roche)

### 2.3.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für Western-Blot Analysen wurden insgesamt 40 µg Proteinmenge der Probe 1:2 in Laemlipuffer (*Sample Buffer*, Sigma) verdünnt. Auf die Denaturierung der Proben bei 95°C wurde generell verzichtet, da praktische Erfahrungen innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass phosphorylierte Proteine in der Western-Blot-Analyse nicht mehr nachzuweisen waren.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen Gelelektrophorese-System nach Laemmli (Laemmli, 1970). Das obere weitporige Sammelgel komprimiert das aufgetragene Lysat, während das darunterliegende engporige Trenngel die Proteine der Molekulargröße nach auftrennt. Durch SDS (Natriumdodecylsulfat) wird die Proteinladung überdeckt, und die Proteine migrieren ihrer Ladung und Größe entsprechend durch das Gel. Die Gelelektrophorese wurde in einem vertikalen Gelsystem *Criterion Cell* (Bio-Rad, München) in Elektrophorese-Laufpuffer (s. u.) bei 120 V durchgeführt.

10x Laufpuffer:

- 250 mM Tris (pH 8,8)
- 1,9 M Glycin
- 1 % SDS

## 2.4 Immunodetektion von Proteinen

### 2.4.1 Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen

Die Proteine wurden zunächst auf eine PVDF(Polyvinylidendifluorid)-Membran (Bio-Rad) transferiert, um sie dann in einem indirekten Enzymimmuno-Test nachzuweisen.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mittels einer Blottingkammer (*Criterion Blotter*, Bio-Rad) aus dem Gel auf eine PVDF-Membran transferiert und somit immobilisiert. Der Aufbau der Blottingkammer erfolgte nach folgendem Schema von Kathode zu Anode:

Für den Transfer wurden zwei Blottingpapiere, zwei Schwämme und das Gel in 1x Transferpuffer (1,9 M Glycin, 250 mM Tris) äquilibriert. Das Gel wird auf einen Schwamm und Blottingpapier gelegt und die in Methanol aktivierte PVDF-Membran nach kurzem Waschen in Transferpuffer blasenfrei auf das Gel gebracht. Darauf wurde wiederum ein Blottingpapier und ein Schwamm gelegt, die Kammer geschlossen und in die Transferapparatur eingespannt. Die Transferkammer wurde mit dem restlichen Transferpuffer aufgefüllt und bei 4°C und 360 mA für 180 Min. gestartet. Zur Überprüfung des Transfers kann die Membran 1 Minute in Ponceau S Lösung [5% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) Ponceau S] gefärbt werden. Die Proteinbanden erhalten eine stärker rötliche Färbung als die restliche Membran, wodurch Transferfehler gut zu erkennen sind. Die Färbung kann durch dreimaliges Waschen mit TBS-Puffer rückgängig gemacht werden. Es wurde für die alle Waschschritte nur TBS und kein TBST verwendet, da praktische Erfahrungen innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass der Proteinnachweis mittels Wester-Blot-Analyse wesentlich besser erfolgte.

20x Transferpuffer:

1,2 M Glycin  
400 mM Tris-Base

10x TBS-Puffer:

200 mM Tris (pH 7,2)  
1,5 M NaCl

### 2.4.2 Immunodetektion

Nach dem Elektrotransfer wurden die Membranen aus der Kammer direkt herausgenommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in TBS-Puffer mit 5 % (w/v) Milchpulver oder BSA auf einem Schüttler inkubiert. Die Inkubation der Membranen mit den entsprechenden Primärantikörpern (s. Tab. 2.1) wurde stets bei 4°C auf einem Schüttler über Nacht durchgeführt.

Im Anschluss wurden die Membranen dreimal á 10 Min. mit TBS gewaschen, um die unspezifisch gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Daraufhin wurde der entsprechende sekundäre Antikörper (s. Tab. 2.1), gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (HRP-*horseradish peroxidase*) zur Proteinmarkierung, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Detektierung der Proteine wurden die Membranen mit einem HRP-spezifischen Substrat (*Lumi-Light Western Blotting Substrate*, Roche) benetzt und mit einer *Kodak Image Station 4000 MM* (Kodak, Rochester) zur Protokollierung aufgenommen. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden wurde mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt.

**Tabelle 2.1:** Liste in dieser Arbeit verwendeter Primär- und Sekundärantikörper.  
BSA – Rinderserumalbumin, TBS – *tris buffered saline*

Antikörper	FirmaKatalog-/Nr.	Verdünnung	Sek. AK
Anti-FoxO3a	Cell Signaling Technology # 9467	1:1000 5 % Milchpulver/TBS	<i>anti-rabbit</i> , 1:5000
Anti-FoxO1a	Cell Signaling Technology # 2880	1:1000 5 % BSA/TBS	<i>anti-rabbit</i> 1:5000
Anti-phospho-FoxO1a/FoxO3a (T24/T32)	Cell Signaling Technology # 9464	1:1000 5 % BSA/TBS	<i>anti-rabbit</i> 1:5000
Anti-Akt (pan)	Cell Signaling Technology # 4691	1:1000 5 % BSA/TBS	<i>anti-rabbit</i> 1:5000
Anti-phospho-Akt	Cell Signaling Technology # 9271	1:1000 5 % BSA/TBS	<i>anti-rabbit</i> 1:5000
Anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling Technology # 9251	1:1000 5 % BSA/TBS	<i>anti-rabbit</i> 1:5000
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology # sc-47724	1:3000 5% Milchpulver/TBS	<i>anti-mouse</i> 1:5000
<i>anti-rabbi-HRP*</i>	Sigma Aldrich #A6154	1:5000 5 % Milchpulver/TBS	
<i>anti-mouse-HRP*</i>	Sigma Aldrich #A6782	1:5000 5 % Milchpulver/TBS	

\*HRP - *horseradish peroxidase*

#### 2.4.3 Entfernen von Antikörpern von Membranen („Strippen“)

Für die Detektion weiterer Proteine wurden die gebundenen primären und sekundären Antikörper von den proteinbeladenen Membranen entfernt. Hierfür wurden die PVDF-Membranen für 40 Minuten bei Raumtemperatur in Stripping-Puffer auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mehrmals gründlich mit TBS gewaschen und konnte danach erneut für Immunodetektionen (s. 2.4.2) verwendet werden.

Stripping-Puffer:

25 mM Glycin-HCl, pH 2,0

1 % (w/v) SDS

## 2.5 Immunzytochemische Färbung

Fibroblasten wurden in schwarzwandigen 96-Loch-Zellkulturplatten mit Kunststofffolienboden (BD Falcon, New Jersey) zu einer Konfluenz von ca. 50 % herangezogen. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen, für 30 Min. bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen wieder 3x mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Min. mit 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Es folgte wiederum ein dreimaliger Waschschrift mit PBS, bevor die Fibroblasten in 1 % BSA/PBS für 30 Min. bei Raumtemperatur geblockt wurden. Anschließend wurden 50 µl FoxO3a (s. Tabelle 3) Erstantikörperlösung (1:200 in 1 % BSA/PBS) auf die fixierten Fibroblasten gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper entfernt, die Präparate 3x mit PBS gewaschen und anschließend für mindestens eine Stunde der Sekundärantikörper *Alexa Fluor 546 goat anti rabbit* (#A11010, Invitrogen) bei Raumtemperatur, alternativ bei 4°C über Nacht, auf einem Schüttler lichtgeschützt inkubiert. Darauf wurde der überschüssige sekundäre Antikörper entfernt, die Präparate mehrmals mit PBS gewaschen und mit PBS beschichtet. Für die Zellzyklusanalyse wurde eine DNA-Färbung mit Hoechst 33342 (Invitrogen) vorgenommen (s. 2.6).

Die fixierten Zellen wurden entweder direkt am Olympus IX2 (Olympus, Hamburg) mikroskopiert, mit der dazugehörigen Software „*ScanR Automated Image Acquisition*“ und „*ScanR Analysis*“ ausgewertet, oder lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Bei allen Messungen wurde die Fluoreszenzintensität von FoxO3a im Zellkern berechnet.

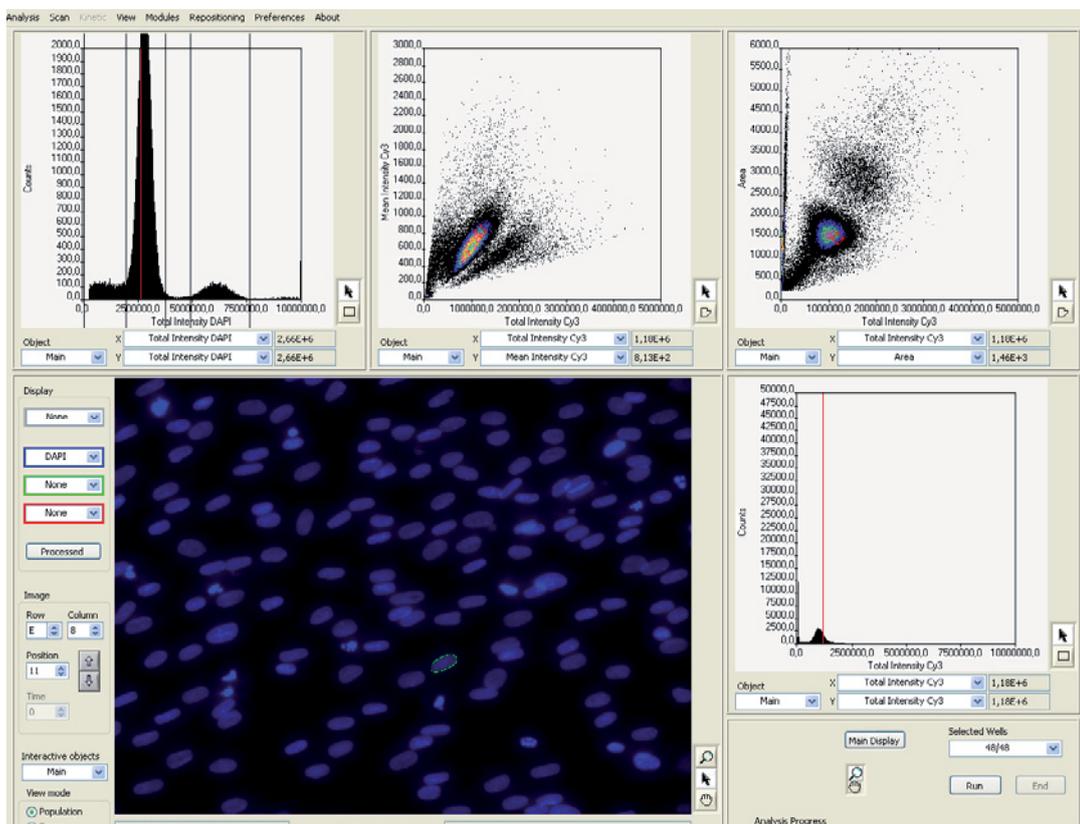
## 2.6 Zellzyklusanalyse

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Zellzyklusanalyse im Mikroskop und wurde anhand der Fluoreszenzintensität der Zellkerne ausgewertet (Siegel et al., 2008).

Für eine mikroskopische Analyse der Zellzyklusphasen wurden Fibroblasten in 96-Loch-Zellkulturplatten mit schwarzer Wandung und durchsichtigem Boden (BD Falcon) bis zu einer Konfluenz von ca. 50 % herangezogen. Nach der Behandlung und entsprechender Postinkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Anschließend folgte eine Fixierung mit 4 % PFA-Lösung für 30 Min. bei Raumtemperatur. Nach mehrfachem Waschen mit PBS wurde eine DNA-Färbelösung mit Hoechst

33342 (4 µg/ml in PBS) für eine Stunde hinzugegeben und lichtgeschützt bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Bevor die Zellen mikroskopiert wurden, wurde die Färbelösung entfernt, die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und abschließend mit PBS beschichtet.

Die automatisierten mikroskopischen Aufnahmen erfolgten im Olympus IX2 (Olympus) und wurden mit Hilfe von „ScanR Automated Image Acquisition“ und „ScanR Analysis“ ausgewertet.



**Abb. 2.2:** Beispiel eines Bildschirmfotos einer analytischen Auswertung mit Hilfe von „ScanR Analysis“ der aufgenommen mikroskopischen Aufnahmen. Links oben sind die verschiedenen Zellzyklusphasen in sogenannte „Gates“ unterteilt. Es wurde die Anzahl der Zellen gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen

## 2.7 RNA-Analytik

### 2.7.1 RNA-Isolierung

Fibroblasten und HaCaT-Keratinozyten wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 60 mm zur Konfluenz herangezogen und nach Behandlung die RNA mit Hilfe

von *Qias shredder*, RNeasy Mini Kit und *RNase-Free DNase Set* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Bevor die isolierte RNA in die reverse Transkription eingesetzt wurde, erfolgte eine Quantifizierung der Konzentration.

### 2.7.2 RNA-Quantifizierung

Für die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurden 3 µl der Probe 1:50 in bidest. H<sub>2</sub>O verdünnt und an einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) photometrisch bei 260 nm gegen bidest. H<sub>2</sub>O als Referenz gemessen. Für eine Extinktion von 1 wurde dabei einer RNA-Konzentration von 50 µg/ml angenommen.

### 2.7.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines *Omniscript-RT-Kit* (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurden 0,5 µg RNA in Gegenwart von 2 µl *Random-Primer* (50 µM Stammlösung), 4 µl 10x RT-Puffer (Qiagen), 4 µl dNTP-Mix (je dNTP 5 mM), 0,25 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl), 0,25 µl Omniscript-Reverse Transkriptase (40 U/µl), sowie RNase-freies Wasser (bis zu einem Gesamtvolumen von 40 µl) eingesetzt und die Ansätze für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden im Anschluss bei -20°C aufbewahrt oder direkt in die PCR eingesetzt.

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

Für die Realtime-PCR per *LightCycler 2.0* (Roche) wurde nach der reversen Transkription 4 µl der in Wasser 1:3 verdünnten cDNA-Lösung zusammen mit je Primer 2 µl Prim-erlösung (je Primer 5 µM Endkonzentration im Ansatz), 2 µl "*Reaction Mix Vial 1*" (*LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I*, Roche), 1,6 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM) und 8,4 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt. Die Sequenzen der eingesetzten Primerpaare sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

**Tabelle 2.2:** Sequenzen der für die in dieser Arbeit etablierten Realtime-PCR-Analysen verwendeten Primer.

Zielgen/Primerpaar	Sequenz (5' nach 3')
FoxO1a	AAGGGTGACAGCAACAGCTC TTCTGCACACGAATGAACTTG
FoxO3a	TTGCTCTCCAAGCTTCCTA CCCCATGCTACTAGTGCCTCT
FoxO4	ACGAGTGGATGGTCCGTA GTGGCGGATCGAGTTCTTC
SIRT1	TGTACGACGAAGACGACGAC TTCATCACCGAACAGAAGGTT
SIRT1-2*	AAATGCTGGCCTAATAGAGTGG TGGTGGCAAAAACAGATACTGA
SIRT1-3*	CTCCAAGGCCACGGATAG GCCACAGTGTCATATCATCCA
SIRT2*	GAAGGTGCAGGAGGCTCA CAGGAAGTCCATGTCTGCTTC
SIRT2-4	TCAAGCCAACCATCTGTCAC CGCTCCAGGGTATCTATGTTCT
SIRT3-4	TTGCTGCATGTGGTTGATTT GGTCAAGCTGGCAAAGG
SIRT4-3	GCACACTGGGCTTTGAGC CCACAATCCAAGCACAGGA
SIRT4-4*	TGGTGGGATCATCCTTGC GGCCAATGTTTCAGTATTGC
SIRT5	TGTACCCAGCAGCCATGTT TCCCTGGAAATGAAACCTGA
SIRT5-2*	TCCAATTTGTCCAGCTTTATCA TGCTGGCATCTTGAGTTCC
SIRT5-3*	CCATTCTGGAGGAGGTTGAC CAAACATGGCTGCTGGGTA
SIRT6	AGCTGAGGGACACCATCCTA ATGTACCCAGCGTGATGGAC
SIRT6-2*	TCTTCCAGTGTGGTGTTC CCTCCATGGTCCAGACTCC
SIRT6-3*	GGTCAGCCAGAACGTGGA GTGGAGCTCTGCCAGTTTGT
SIRT7	TTGGAGATCCCCGCCTAT CTGCCTTCTTCACCAGCAC
HPRT <sup>a</sup>	GACCAGTCAACAGGGGACAT GTGTCAATTATATCTTCCACAAT- CAAG
18s*	GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG

<sup>a</sup>HPRT: Hypoxanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase

\*Primer wurden lediglich bei der Etablierung der Realtime-PCR verwendet

Das Programm für die Amplifikation konnte für alle in dieser Arbeit verwendeten Primer gleichermaßen verwendet werden, da alle Primer die gleiche Annealing-Temperatur und Amplifikatgröße besitzen. Der Ablauf des Programms ist in folgender Tabelle dargestellt:

**Tabelle 2.3:** Programm der Realtime-PCR

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
Initiale Denaturierung	95	10 Min.
Denaturierung	95	30 Sek.
Annealing	59	5 Sek.
Elongation	72	5 Sek.
Finale Elongation	72	2 Min.



Die Amplifikation erfolgte stets in 50 Zyklen durch Repetition der durch den Pfeil in Tabelle 2.3 angezeigten PCR-Schritte, gefolgt vom Aufschmelzen der Amplifikate. Die Auswertung aller Daten erfolgte mit der zum LightCycler gehörigen Software.

### 2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in der vorliegenden Arbeit zur Überprüfung der RNA nach Isolation bzw. Quantifizierung (s. 2.7.1 und 2.7.2) und der Amplifikate nach Realtime-PCR (s. 2.7.4) verwendet.

Nukleinsäuren besitzen aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ein konstantes Ladungs-Massen-Verhältnis und wandern durch ihre negative Ladung zur Anode. Sowohl das Molekulargewicht und die Konformation von DNA- und RNA-Fragmenten, als auch die Agarosekonzentration des Gels und die Stärke des elektrischen Feldes, wirken sich auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Proben aus, wodurch sie sich im Gel auftrennen.

Die Gele bestanden aus 1 % (w/v) Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA; pH 8,3). Die Agarose wurde im TAE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst, anschließend auf ca. 60°C

abgekühlt und dann mit 5 µg/ml Ethidiumbromid angereichert. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff und dient zur Visualisierung der Probe, da es in die DNA interkaliert und mit UV-Bestrahlung im sichtbaren Bereich ( $\lambda = 452$ ) emittiert. Die Proben wurden mit 1/5 ihres Volumens an Ladepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 30 % (v/v) Glycerol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und anschließend in die gegossenen Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese in einer horizontalen Gelkammer wurde bei einer Spannung von max. 100 V mit TAE-Puffer als Elektrophoresepuffer gestartet.

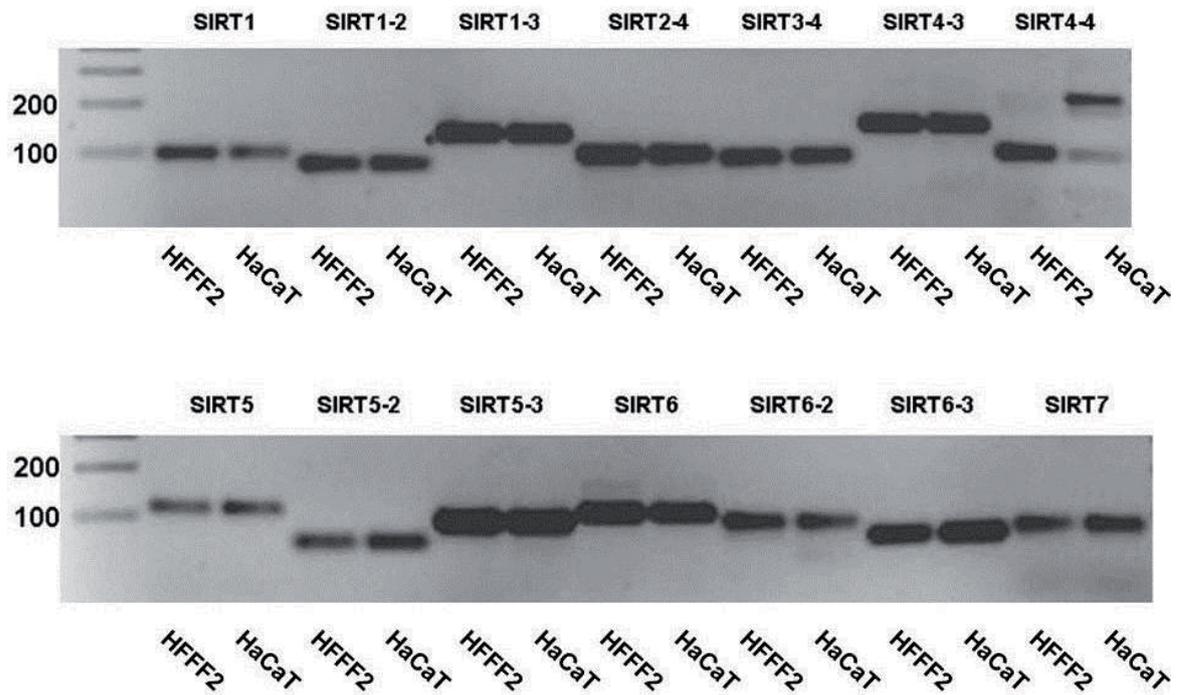
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Basale FoxO-/SIRT-mRNA-Spiegel

Die basale Expression der verschiedenen FoxO- und SIRT-Isoformen in dermalen Fibroblasten und Keratinozyten ist bisher nicht beschrieben, sodass sie im Folgenden *in vitro* untersucht werden sollte.

Zum Etablieren der Realtime-RT-PCR-Bedingungen zur Bestimmung der FoxO- und SIRT-mRNA-Spiegel in HFFF2 Zellen (HFFF - *human fetal foreskin fibroblast*) und HaCaT-Keratinozyten wurden verschiedene Primerpaare mit Hilfe des Programms „Primer 3“ erstellt (s. 2.7.4 Tabelle 2.2). Für die Vergleichbarkeit der verschiedenen mRNA-Spiegel wurden alle Primer auf eine maximale Länge von 22 Nukleotiden begrenzt und die Schmelztemperatur auf 59°C festgelegt. Mindestens ein Primer je Paar wurde über eine Exon-Intron-Grenze positioniert, um eine Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Des Weiteren wurde die maximale Amplifikatgröße auf 150 Basenpaare begrenzt und die *Annealing*-Zeit entsprechend angepasst (20 Nukleotide pro Sekunde).

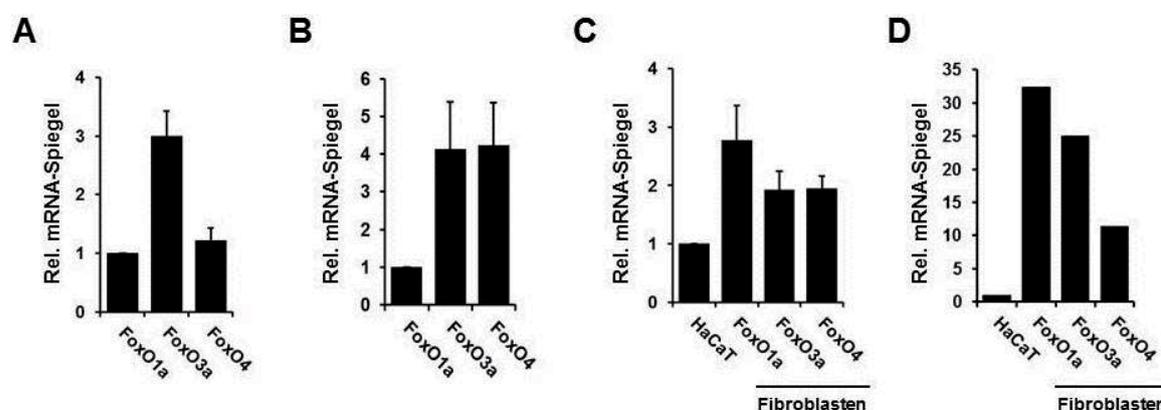
Abbildung 3.1 zeigt die Auftrennung der PCR-Produkte SIRT1-7 per Agarosegelelektrophorese nach Realtime-PCR-Analyse. Diese Kontrolle ergab, dass unter den eingesetzten Bedingungen dieselben klar auftrennbaren und nachweisbaren PCR-Produkte ohne ungewollte Nebenprodukte sowohl für cDNA aus HFFF2 als auch aus HaCaT-Keratinozyten entstanden. Eine Ausnahme ist das Primerpaar 4 für den Nachweis von SIRT4-mRNA, das zwei Produkte ergab, die sich zwischen den Zelltypen unterschieden. Aus diesem Grunde wurde für weitere Analysen der mRNA-Spiegel von SIRT4 das Primerpaar SIRT 4-3 eingesetzt. Eine quantitative Analyse der Banden in Abb. 3.1 mittels Densitometrie war hier nicht möglich, da sich die PCR-Produkte nach der Realtime-PCR-Analyse in einem gesättigten Bereich befanden.



**Abb. 3.1:** Nachweis der mit Hilfe der angegebenen Primerpaare für den Nachweis von SIRT1 bis SIRT7 aus cDNA von HFFF2 und HaCaT-Keratinocyten gewonnenen PCR-Amplifikationsprodukte per Agarosegelelektrophorese.

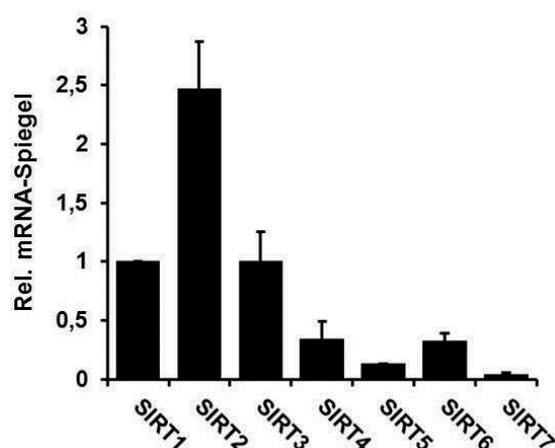
Ein Vergleich der mRNA-Spiegel ubiquitärer FoxO-Isoformen (FoxO1a, 3a und 4, Abb. 3.2A) ergab, dass basal die Expression von FoxO3a in primären Hautfibroblasten etwa dreimal höher war als diejenige von FoxO1a. Weiterhin waren die FoxO4-mRNA-Spiegel etwa gleich jenen von FoxO1a. Sehr ähnliche Verhältnisse fanden sich in HaCaT-Zellen wieder. Auch hier war der mRNA-Spiegel von FoxO3a höher als der von FoxO1a, allerdings konnte in HaCaT Keratinocyten ein zu FoxO1a relativ höherer Spiegel von FoxO4 gemessen werden (Abb. 3.2B). Weiterhin wurden die mRNA-Spiegel der Zelltypen miteinander verglichen, wobei sich für alle drei Patientenfibroblastenlinien ergab, dass die auf mRNA-Spiegel der Hypoxanthin/Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) normierten FoxO-mRNA Spiegel über jenen von HaCaT-Zellen lagen (Abb. 3.2C). Zur Kontrolle der erhobenen Daten wurden die Realtime-PCR-Analysen in HFFF2 und HaCaT von Frau Elisabeth Sauerbier (AG Prof. Klotz) nochmals unabhängig durchgeführt und auf ein anderes *Housekeeping*-Transkript, die 18S rRNA, normiert. Auch dort ergab der Vergleich der FoxO-mRNA-Spiegel zwischen den Zelltypen, dass die mRNA-Spiegel in HFFF2-Fibroblasten deutlich über jenen von HaCaT-Zellen lagen (Abb. 3.2D). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass unter basalen Bedingungen sowohl in primären Hautfibroblasten als auch in Zellen einer Keratinozytenlinie zum einen mehr

FoxO3a- als FoxO1a-mRNA vorhanden waren. Zweitens haben Fibroblasten höhere auf *hprt* normierte FoxO-mRNA-Spiegel als HaCaT-Zellen.



**Abb. 3.2:** Vergleich der auf *hprt* normierten mRNA-Spiegel von FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 in (A) primären Hautfibroblasten und (B) HaCaT-Zellen. Die FoxO1a-mRNA-Spiegel wurden in den ersten beiden Diagrammen gleich 1 gesetzt. (C) Vergleich der relativen FoxO-mRNA-Spiegel zwischen HaCaT-Zellen und primären Fibroblasten, wobei die mRNA-Spiegel aus HaCaT-Keratinocyten gleich 1 gesetzt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Bestimmungen ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM. (D) Vergleich der auf 18S rRNA normierten relativen FoxO-mRNA-Spiegel zwischen HaCaT-Zellen, auch hier gleich 1 gesetzt, und HFFF2-Zellen. Daten aus Diagramm D wurden von Frau Elisabeth Sauerbier (AG Prof. Klotz) zur Verfügung gestellt ( $n = 2$ ).

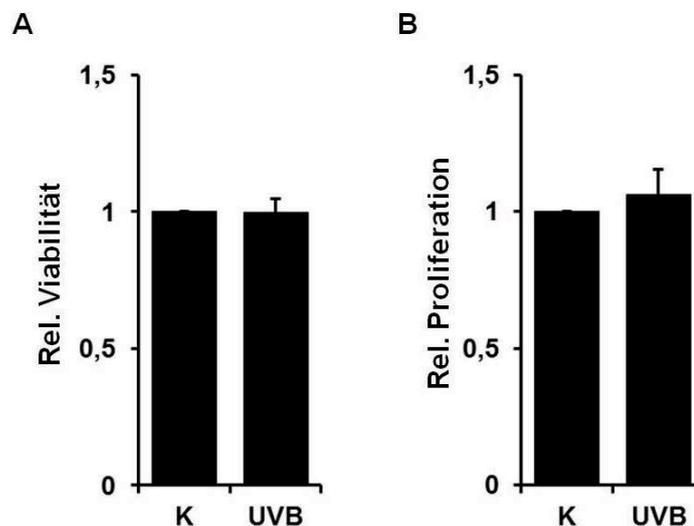
Neben den FoxO-mRNA-Spiegeln wurden die basalen mRNA-Spiegel aller sieben Sirtuine in primären Hautfibroblasten mittels Realtime-PCR analysiert. In Abbildung 3.3 zeigt sich, dass die basalen Spiegel der SIRT2-mRNA etwa dreimal höher sind als diejenigen von SIRT1. Weiterhin lagen die mRNA-Spiegel von SIRT4 bis SIRT7 deutlich unterhalb jenen von SIRT1. SIRT3-Spiegel waren etwa gleich jenen von SIRT1.



**Abb. 3.3:** Vergleich der auf *hprt* normierten SIRT-mRNA-Spiegel in primären Fibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Bestimmungen ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM, wobei SIRT1-mRNA gleich 1 gesetzt wurde.

### 3.2 Einfluss von UVB-Bestrahlung auf FoxO-/SIRT-mRNA-Spiegel

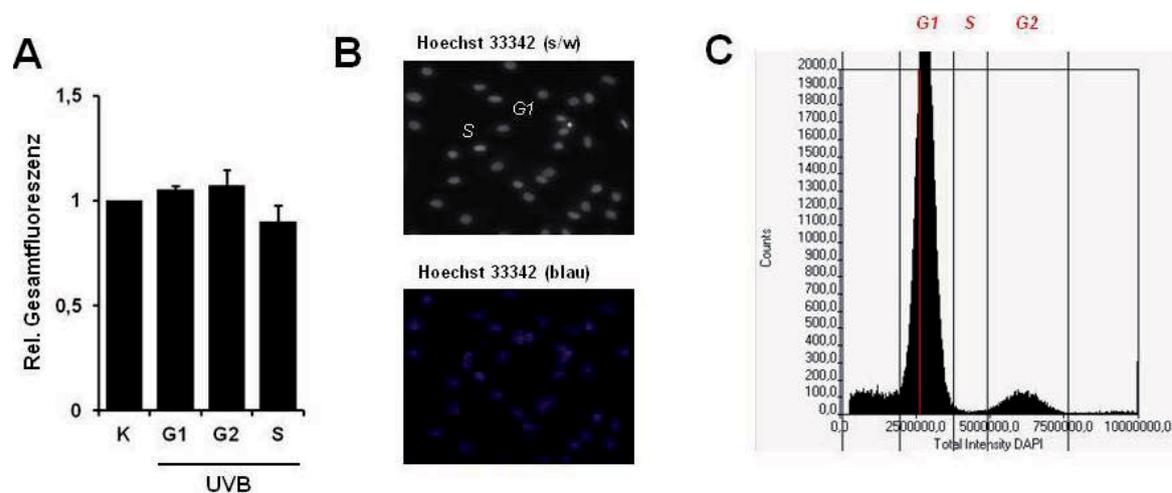
Nachdem die basalen mRNA-Spiegel aller drei FoxO-Isoformen in primären Hautfibroblasten untersucht worden waren, sollte eine mögliche Änderung nach einer einmaligen UVB-Bestrahlung analysiert werden. Als adäquate Dosis ergaben sich  $100 \text{ J/m}^2$ , da sie sich als subtoxisch und doch wirksam erwies. Die Toxizität der UVB-Behandlung wurde hierzu nach 72 Stunden Postinkubation mittels Viabilitätstest (WST-1, *water soluble tetrazolium*) und Propidiumiodidfärbung untersucht. Als Kontrolle dienten hier Zellen, die nach dem jeweiligen Behandlungsmuster ohne UVB-Bestrahlung inkubiert worden waren. Die relative Viabilität wurde auf die Werte der unbehandelten Fibroblasten normiert. Wie Diagramm A in Abbildung 3.4 zu entnehmen ist, war die Viabilität nach UVB-Exposition im Vergleich zur Kontrollbehandlung unverändert. Des Weiteren wurde durch eine Proliferationsanalyse mittels BrdU-Test keine Änderung der Replikationsrate festgestellt (Abb. 3.4B).



**Abb. 3.4:** Vergleich der relativen Viabilität (A) und relativen Proliferationsrate (B) in humanen Hautfibroblasten nach UVB-Behandlung ( $100 \text{ J/m}^2$ ) mit anschließender Postinkubationszeit von 72 Stunden und der entsprechenden Kontrollbehandlung. Hierbei handelt es sich um Daten aus unabhängigen Versuchen, die je als Triplikat vermessen wurden und deren Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM dargestellt sind.

Um zu testen, ob eine UVB-Behandlung zu einer Verschiebung der Zellzyklusphasen führt, wurde eine Zellzyklusanalyse vorgenommen. Hierzu wurden wiederum primäre Hautfibroblasten mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVB bestrahlt und anschließend für 24 Stunden postinkubiert, bevor die Zellen für die Zellzyklusanalyse fixiert und mit einem DNA-

Farbstoff (Hoechst 33342) gefärbt wurden. Zellen, die sich z. B. in der S-Phase befanden, in der sich die DNA verdoppelt, enthielten mehr DNA-Farbstoff als Zellen die z. B. in der Zellzyklusphase G1 waren (s. Abb. 3.5B). Mit Hilfe einer automatisierten mikroskopischen Analyse wurde die Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Objektgröße auf die Objektzahl normiert. Die zusammengefassten Daten aus fünf unabhängigen Versuchen in Abbildung 3.5 A zeigen, dass es zu keiner Verschiebung der Zellzyklusphasen nach einmaliger UVB-Behandlung im Vergleich zu der Kontrollbehandlung kam.

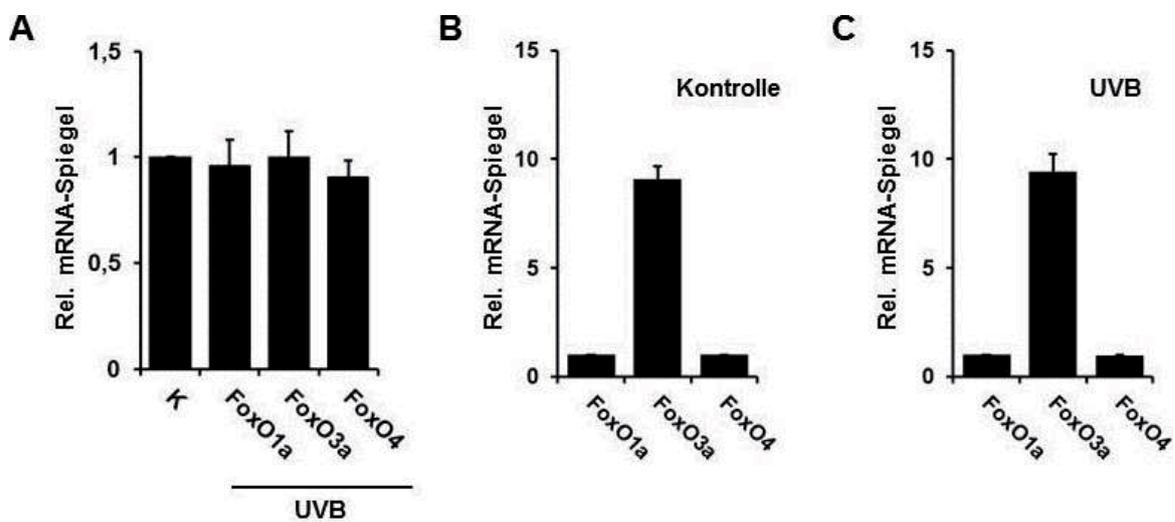


**Abb. 3.5:** Vergleich der relativen Gesamtfluoreszenz von Hoechst 33342 im Zellkern primärer Hautfibroblasten unterschiedlicher Spender. Die Zellen wurden einmalig mit  $100 \text{ J/m}^2$  UVB bestrahlt und nach 24 Stunden Postinkubationszeit fixiert (A). Die Fluoreszenzintensität im Zellkern wurde gegen die Anzahl der Objekte (Zellzahl) korreliert (C) und die unterschiedlichen Zellzyklusphasen (G1-, G2-, S-Phase) mit der Kontrolle (K) verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 voneinander unabhängigen Behandlungen ( $n = 5$ )  $\pm$  SEM.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine UVB-Behandlung mit  $100 \text{ J/m}^2$  für alle nachfolgenden Experimente mit primären Hautfibroblasten nicht toxisch ist.

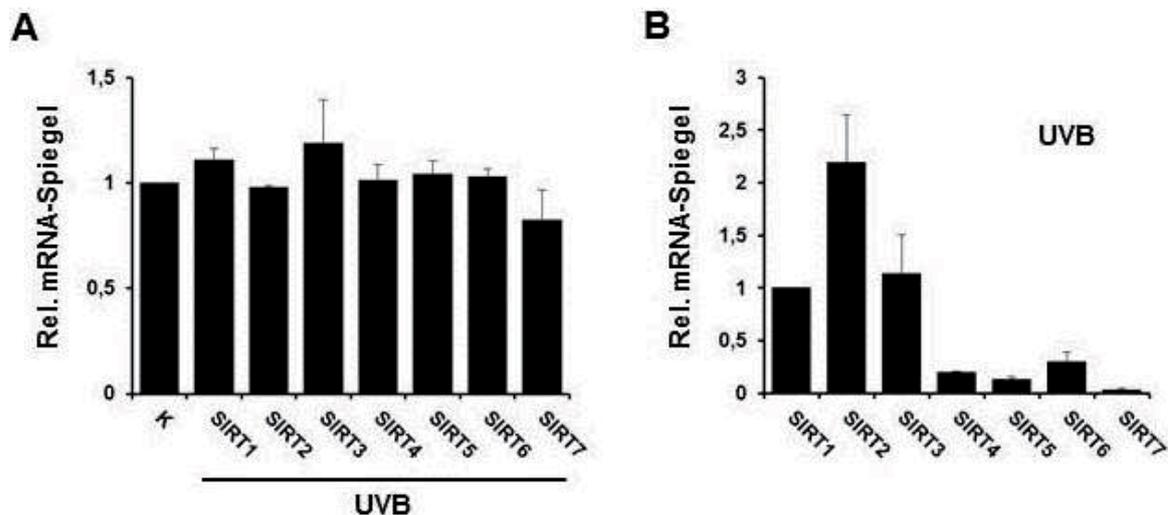
Aus vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe Klotz war bekannt, dass eine geringe UVB-Dosis von  $100 \text{ J/m}^2$  eine Veränderung der mRNA-Spiegel von an Entzündungsprozessen beteiligten Enzymen bei humanen Keratinozyten hervorruft (Fernau et al., 2010). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch die mRNA-Spiegel von FoxO-Transkriptionsfaktoren oder Sirtuine im Rahmen einer Stressantwort in humanen dermalen Fibroblasten beeinflusst werden.

Der Vergleich der FoxO-mRNA-Spiegel nach  $100 \text{ J/m}^2$  UVB-Strahlung in Abbildung 3.6A zeigt, dass die mRNA-Spiegel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unverändert waren. In Diagramm B und C wurden die mRNA-Spiegel für FoxO1a gleich 1 gesetzt. Die FoxO-Spiegel sowohl in den UVB-behandelten als auch in den unbestrahlten Zellen waren kongruent zu den basalen mRNA-Spiegeln aus Abbildung 3.2. Demnach hatte eine einfache UVB-Behandlung keine Auswirkungen auf die Verschiebung des Gleichgewichts aus Transkription und Abbau der mRNAs aller drei FoxO-Isoformen zur Folge.



**Abb. 3.6:** Vergleich der per Realtime-RT-PCR bestimmten, auf *hprt* normierten FoxO-mRNA-Spiegel in primären Hautfibroblasten nach UVB-Behandlung. (A) Relative FoxO-mRNA-Spiegel nach UVB-Behandlung ( $100 \text{ J/m}^2$ ) und anschließender Postinkubation von 72 Stunden, wobei die jeweiligen mRNA-Spiegel der unbestrahlten Kontrollzellen (K) gleich 1 gesetzt wurden. (B) Relative FoxO-mRNA-Spiegel der Kontrollzellen ohne UVB-Bestrahlung, in denen FoxO1a-mRNA-Spiegel gleich 1 gesetzt wurde. (C) Relative FoxO-mRNA-Spiegel nach UVB-Behandlung ( $100 \text{ J/m}^2$ ) und anschließender Postinkubation von 72 Stunden, wobei die jeweiligen FoxO1a-mRNA-Spiegel gleich 1 gesetzt wurden. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM.

Abbildung 3.7 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der per Realtime-PCR bestimmten und auf *hprt* normierten SIRT-mRNA-Spiegel nach einfacher UVB-Bestrahlung. In Diagramm A wurde die unbehandelte Kontrolle gleich 1 gesetzt und die untersuchten SIRT-mRNA-Spiegel dazu ins Verhältnis gebracht. Es wurde keinerlei Änderung der mRNA-Spiegel aller sieben Sirtuine nach UVB-Exposition beobachtet. Auch hier war keine Änderung der Sirtuin-mRNA-Spiegel im Vergleich zu den basalen Bedingungen (s. Abb. 3.3) festzustellen.



**Abb. 3.7:** Vergleich der per Realtime-RT-PCR bestimmten, auf *hprt* normierten SIRT-mRNA-Spiegel in primären Hautfibroblasten. (A) Relative SIRT-mRNA-Spiegel nach UVB-Behandlung ( $100 \text{ J/m}^2$ ) und anschließender Postinkubation von 72 Stunden, wobei die jeweiligen mRNA-Spiegel in unbestrahlten Kontrollzellen (K) gleich 1 gesetzt wurden. (B) Relative SIRT-mRNA-Spiegel der Kontrollzellen ohne UVB-Bestrahlung, in denen die SIRT1-mRNA-Spiegel gleich 1 gesetzt wurde. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM.

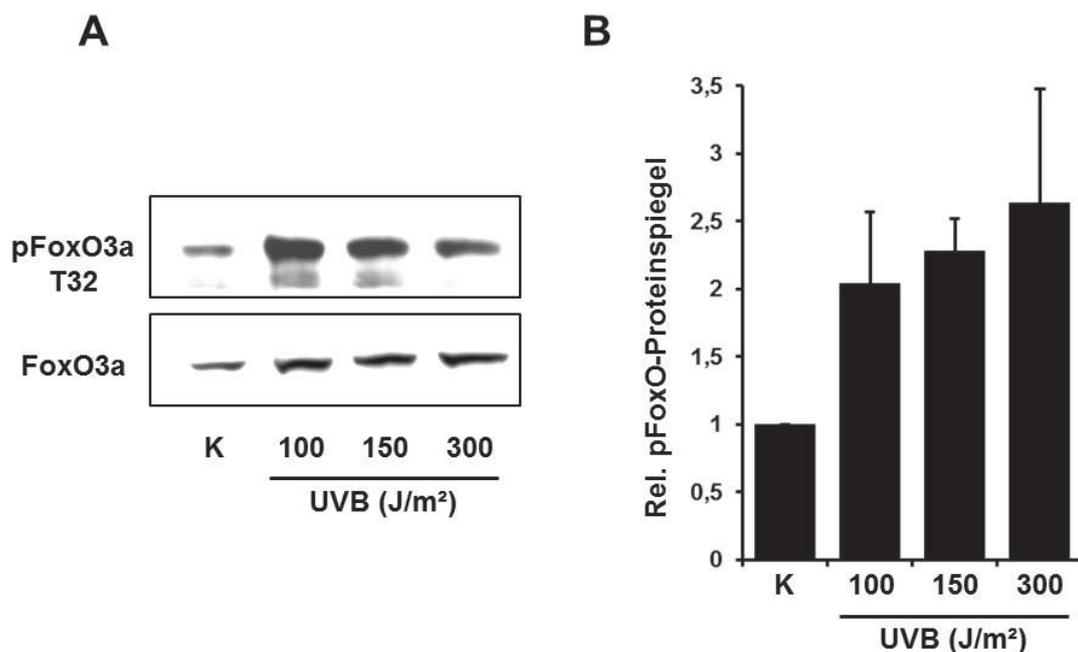
### 3.3 Modulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch UVB

Nachdem keine Änderung der mRNA-Spiegel nach UVB-Behandlung zu beobachten war, wurde zunächst in humanen Keratinozyten untersucht, ob UVB die Regulation von FoxO-Proteinen auf posttranslationaler Ebene zu beeinflussen vermag. Exogene Stressfaktoren sind bekanntermaßen in der Lage, den PI3K/Akt-Signalweg zu regulieren und somit Einfluss auf FoxO-Transkriptionsfaktoren zu nehmen (Walter et al., 2006).

Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob physiologisch relevante UVB-Dosen eine Phosphorylierung und damit verbundene Translokation von FoxO3a ins Zytoplasma zur Folge hat. Hierzu wurden HaCaT Zellen für 24 Stunden vor der Bestrahlung in serumfreiem Medium kultiviert. Es folgte eine Bestrahlung mit 100, 150 bzw. 300  $\text{J/m}^2$  UVB und eine anschließende Western-Blot Analyse der FoxO3a-Phosphorylierung. Abbildung 3.8A zeigt die Phosphorylierung von FoxO3a-Protein an Threonin 32 nach UVB-Bestrahlung. Phosphorylierung von Thr24/Thr32 wird auch durch Insulin induziert und ist eine Voraussetzung für den Export von FoxO3a aus dem Nukleus.

Bereits nach einer UVB-Behandlung von  $100 \text{ J/m}^2$  und einer Postinkubationszeit von 15 Minuten wurde im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle eine erhöhte Phosphorylierung für FoxO3a detektiert. Ebenfalls konnte in UVB-behandelten HaCaT-Zellen mit einer Dosis von 150 und  $300 \text{ J/m}^2$  eine Zunahme der Phosphorylierung von FoxO3a-

Protein nachgewiesen werden. Die densitometrische Auswertung der Western-Blot Analysen, normiert auf die FoxO3a-Gesamtproteinmenge, zeigt eine Verdopplung der FoxO3a-Phosphorylierung für alle drei UVB-Dosen. Obgleich Abbildung 3.8A eine dosisabhängige Abnahme der Phosphorylierung von FoxO3a-Protein nach 300 J/m<sup>2</sup> UVB-Bestrahlung suggeriert, konnte dies nach mehrmaliger Wiederholung nicht bestätigt werden (Abb. 3.8B).

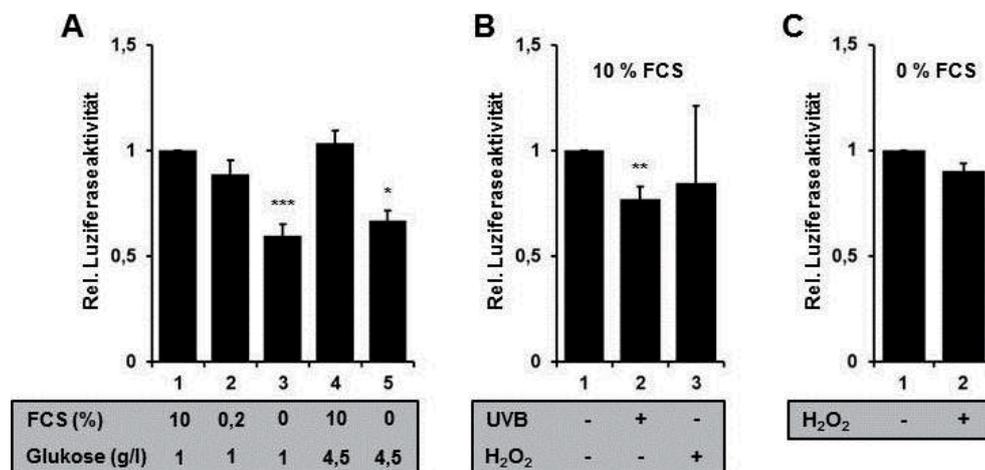


**Abb. 3.8:** (A) Vergleich der FoxO3a-Phosphorylierung in HaCaT-Zellen nach 100, 150 und 300 J/m<sup>2</sup> UVB-Bestrahlung mit anschließender Postinkubation von 15 Min., normiert auf gesamtes FoxO3a-Protein. (B) Densitometrische Auswertung dreier voneinander unabhängiger Versuche, wobei die Kontrollbehandlung (K) gleich 1 gesetzt wurde ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM.

Nachdem eine eindeutige Zunahme der Phosphorylierung von FoxO3a-Protein nachgewiesen worden war stellte sich die Frage, ob UVB-Bestrahlung eine Aktivitätsänderung der FoxO-Transkriptionsfaktoren herbeiführen würde. Um die Bindeaktivität der FoxO-Transkriptionsfaktoren zu untersuchen wurden primäre Hautfibroblasten mit einem FoxO-abhängigen Reporterkonstrukt transfiziert und sowohl mit UVB als auch anderen möglichen und bekannten Modulatoren von FoxO-Transkriptionsfaktoren behandelt.

In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren sind FoxO-Transkriptionsfaktoren überwiegend im Nukleus lokalisiert (Greer & Brunet., 2005). Darüber hinaus können unterschiedliche Glukosekonzentrationen im Zellkulturmedium den zellulären Stoffwechsel derart beeinflussen, dass vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden können (Wilk et

al., 2011). Abbildung 3.9A zeigt die relative FoxO-abhängige Luziferaseaktivität nach Behandlung mit Medium mit hoher (4,5 g/l) und niedriger (1 g/l) Glukosekonzentration in Gegenwart unterschiedlicher Serumkonzentrationen. Die FoxO-abhängige Luziferaseaktivität nimmt mit abnehmender FCS-Konzentration in *low glucose* Medium um ca. 50 % signifikant ab (Balken Nr. 1-3). Der Vergleich zwischen *high glucose* Medium mit 10 % FCS (Balken Nr. 4) und 0 % FCS (Balken Nr. 5) zeigt ebenfalls eine Reduktion der relativen Luziferaseaktivität im serumfreien Medium, allerdings zeigt sich kein Einfluss der Glukosekonzentration. Dagegen wird durch Reduktion der FCS-Konzentration die relative Luziferaseaktivität wider Erwarten stark gehemmt. Abbildung 3.9B zeigt die zusammengefassten Daten der relativen Luziferaseaktivität nach 100 J/m<sup>2</sup> UVB-Bestrahlung (Balken 2): UVB induziert eine ca. 25 % geringere FoxO-abhängige Luziferaseaktivität im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, induziert UVB unter anderem die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Um zu testen, ob reaktive Sauerstoffspezies in der Lage sind, die FoxO-Aktivität zu beeinflussen wurden die transfizierten Fibroblasten für 30 Minuten mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sowohl mit 10 % FCS (B) als auch 0 % FCS (C) inkubiert. In beiden Fällen konnte eine tendenzielle Abnahme der der FoxO-abhängigen Luziferaseaktivität festgestellt werden.

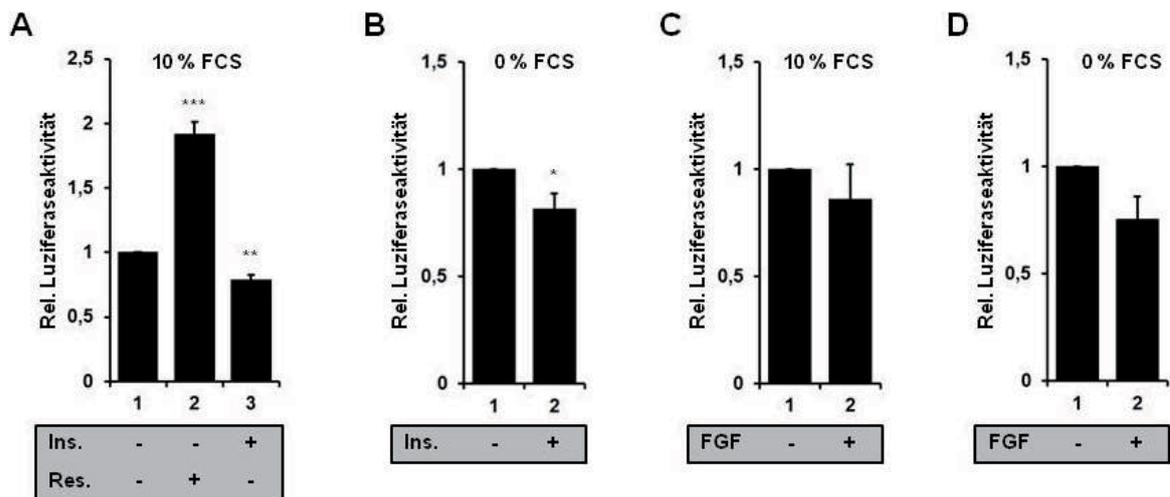


**Abb. 3.9:** Vergleich der relativen FoxO-abhängigen Luziferaseaktivität in primären Hautfibroblasten unterschiedlicher Spender. Sechs Stunden nach der transienten Transfektion wurden die Zellen mit (A) 10 %, 0,2 %, 0 % FCS/DMEM *low glucose* (1 g/l) und 10 % bzw. 0 % FCS in *high glucose* (4,5 g/l) Medium über Nacht behandelt. (B, C) Die UVB-Bestrahlung (100 J/m<sup>2</sup>) und Behandlung mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 10 % FCS/DMEM und in 0 % FCS/DMEM erfolgte ebenfalls sechs Stunden nach der Transfektion. Die reporterabhängige Luziferaseaktivität wurde auf die konstitutive Renilla-Luziferaseaktivität normiert und die Kontrolle (1) gleich 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen (n ≥ 3) ± SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen T-Tests errechnet (\*\*\*P<0,001; \*\*P<0,01; \*P<0,05).

Wie bereits in der Literatur beschrieben (s. Einleitung), führt eine Aktivierung des Insulin-signalweges über PI3K und Akt zu einer Phosphorylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren und somit zu deren Inaktivierung. Abbildung 3.10A und B zeigen eine deutlich geringere Luziferaseaktivität in insulinbehandelten (Ins.) Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle. Hierbei war es gleich, ob die Behandlung mit 100 nM Insulin in DMEM mit 10 % oder mit 0 % FCS erfolgte.

Resveratrol (Res.), ein aus der Schale roter Weintrauben isoliertes Polyphenol, führt hier in der Reporter-genanalyse zu einer zweifach höheren FoxO-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.10A). In Rattenleberzellen wurde die FoxO-Lokalisation durch Resveratrol-Behandlung *in vitro* moduliert und die Transkription FoxO-spezifischer Zielgene des Glukosemetabolismus nachgewiesen (Frescas et al., 2005).

Neben Insulin wurde als weitere Kontrolle die transfizierten Fibroblasten mit 10 ng/ml FGF2 inkubiert. In neuronalen Rattenzellen war die FoxO-Aktivität deutlich reduziert worden (Essaghir et al., 2009), und auch hier zeigt sich eine tendenzielle Abnahme der FoxO-abhängigen Luziferaseaktivität in primären Hautfibroblasten nach FGF2-Behandlung, unabhängig von der FCS-Konzentration im Medium (Abb. 3.10C und D).

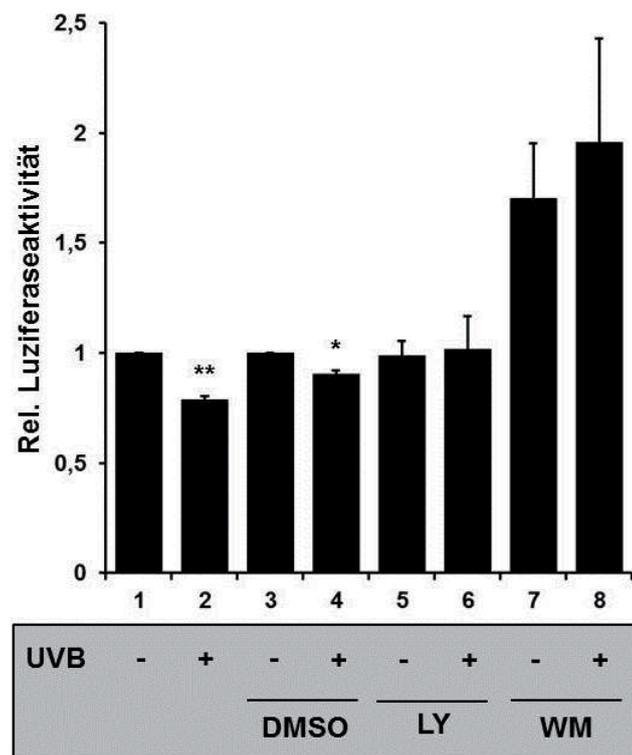


**Abb. 3.10:** Vergleich der relativen FoxO-abhängigen Luziferaseaktivität in primären Hautfibroblasten unterschiedlicher Spender. Sechs Stunden nach der transienten Transfektion wurden die Zellen (A) mit 100 nM Insulin (Ins.) oder mit 50  $\mu$ M Resveratrol (Res.) in 10 % FCS/DMEM, (B) mit 100 nM Insulin in 0% FCS/DMEM, (C) mit 10 ng/ml *fibroblast growth factor 2* in 10 % FCS/DMEM und (D) und mit 10 ng/ml *fibroblast growth factor 2* in 10 % FCS/DMEM behandelt. Die reporterabhängige Luziferaseaktivität wurde auf die konstitutive Renilla-Luziferaseaktivität normiert und die unbehandelte Kontrolle (1) auf 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ( $n \geq 3$ )  $\pm$  SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen T-Tests errechnet (\*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,05$ ).

Die Modulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren kann über verschiedene Kinasen, wie z. B. Akt, SGK oder JNK, erfolgen. Wortmannin und LY294002 inhibieren die PI3-Kinase und unterbrechen somit die Signalweitergabe an nachgeschaltete Proteine, wie etwa Akt. In den vorherigen Versuchen wurde eine Aktivitätsänderung durch UVB-Behandlung mittels Reporteranalyse nachgewiesen (Abb. 3.10A) und eine Zunahme der Phosphorylierung an Akt-spezifischen Phosphorylierungsstellen von FoxO3a-Protein in HaCaT-Zellen (Abb. 3.8). Im Folgenden sollte mittels Hemmung der PI3-Kinase die Beteiligung der PI3K/Akt-Kaskade an der UVB-vermittelten Stressantwort zur FoxO-Modulierung untersucht werden.

Hierzu wurden transfizierte Zellen mit zwei unterschiedlichen PI3K-Inhibitoren, 20  $\mu$ M LY294002 und 100 nM Wortmannin, für 30 Minuten vor der UVB-Bestrahlung inkubiert. Die in Abbildung 3.11 zusammengefassten Daten der FoxO-abhängigen Reporteranalyse zeigen eine verringerte Luziferaseaktivität nach einmaliger UVB-Behandlung, auch für die bestrahlte Lösemittelkontrolle mit DMSO. Die Luziferaseaktivität der mit LY294002 behandelten Zellen war unverändert (Balken Nr. 5) und entsprach der unbehandelten Kontrolle, wogegen 100 nM Wortmannin bereits eine erhöhte

Luziferaseaktivität induzierte (Balken Nr. 7). In beiden Fällen jedoch konnte die Behandlung mit PI3K-Inhibitor die UVB-induzierte Abnahme der Luziferaseaktivität unterbinden (Balken Nr. 6 und Nr. 8). Daraus lässt sich schließen, dass die UVB-vermittelte Modulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren über eine Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade erfolgt.

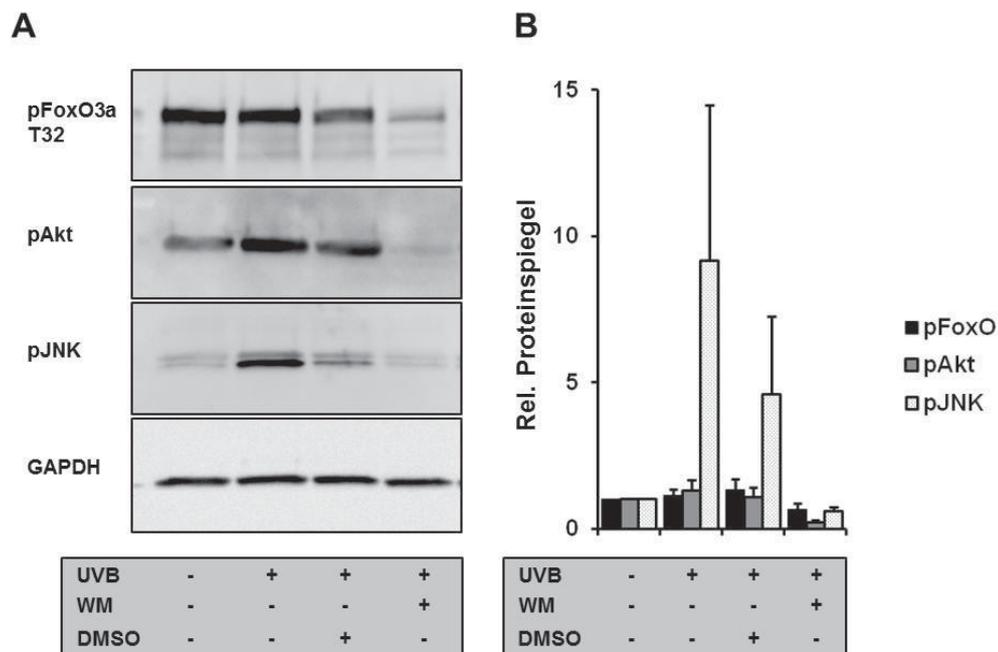


**Abb. 3.11:** Vergleich der relativen FoxO-abhängigen Luziferaseaktivität in primären Hautfibroblasten unterschiedlicher Spender. Sechs Stunden nach der transienten Transfektion wurden die Zellen mit 100 nM Wortmannin (WM), 20  $\mu$ M LY294002 (LY) und entsprechender DMSO-Lösemittelkontrolle für 30 Min. vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 J/m<sup>2</sup> UVB bestrahlt. Die reporterabhängige Luziferaseaktivität wurde am darauffolgenden Tag bestimmt und auf die konstitutive Renilla-Luziferaseaktivität normiert und die unbehandelte Kontrolle bzw. DMSO-Kontrolle gleich 1 gesetzt: Die Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen T-Tests errechnet (\*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,05$ ).

Zur Überprüfung der Phosphorylierung von FoxO3a-Protein in primären dermalen Fibroblasten wurden die Zellen für 30 Minuten mit 100 nM Wortmannin oder DMSO (Lösemittelkontrolle) präinkubiert und anschließend mit 100 J/m<sup>2</sup> UVB bestrahlt. In Abbildung 3.10 ist bereits eine starke Phosphorylierung von FoxO3a unter Kontrollbedingungen zu erkennen. Darüber hinaus war keine signifikante Zunahme der Phosphorylierung nach UVB-Bestrahlung zu beobachten, im Gegensatz zu HaCaT-Zellen (Abb. 3.8).

Ähnlich verhielt es sich mit der Phosphorylierung von Akt; bereits die unbehandelten Kontrollzellen wiesen ein hohes Maß an phosphoryliertem Akt-Protein auf. Auch hier war keine signifikante Änderung der Phosphorylierung durch UVB-Behandlung zu beobachten. Die Aktivität von Akt wird durch die Phosphorylierung an Ser473 erhöht (Alessi et al., 1996), wodurch die Aktivierung von Akt mit der Phosphorylierung von FoxO3a-Protein einhergehen könnte.

JNK (c-Jun N-terminale Kinasen), werden unter Stressbedingungen phosphoryliert und somit aktiviert. UVB induziert eine Aktivierung von JNK (Adler et al., 1996) und wurde hier als Kontrolle für die UVB-Stressantwort in den Zellen ebenfalls überprüft. Die Western-Blot Analyse zeigt eine starke Zunahme der Phosphorylierung von JNK an Thr183 und Thr185 nach 100 J/m<sup>2</sup> UVB im Vergleich zu der unbestrahlten Kontrolle. Durch die Präinkubation des PI3K-Inhibitors Wortmannin wurde in allen drei untersuchten Proteinen die Phosphorylierung nach UVB-Behandlung stark reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass die durch UVB induzierte Stressantwort über PI3K verläuft. Es ist bekannt, dass aktivierte JNK wiederum FoxO-Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren vermag, was deren Aktivierung zur Folge hat (Essers et al., 2004; Oh et al., 2005).

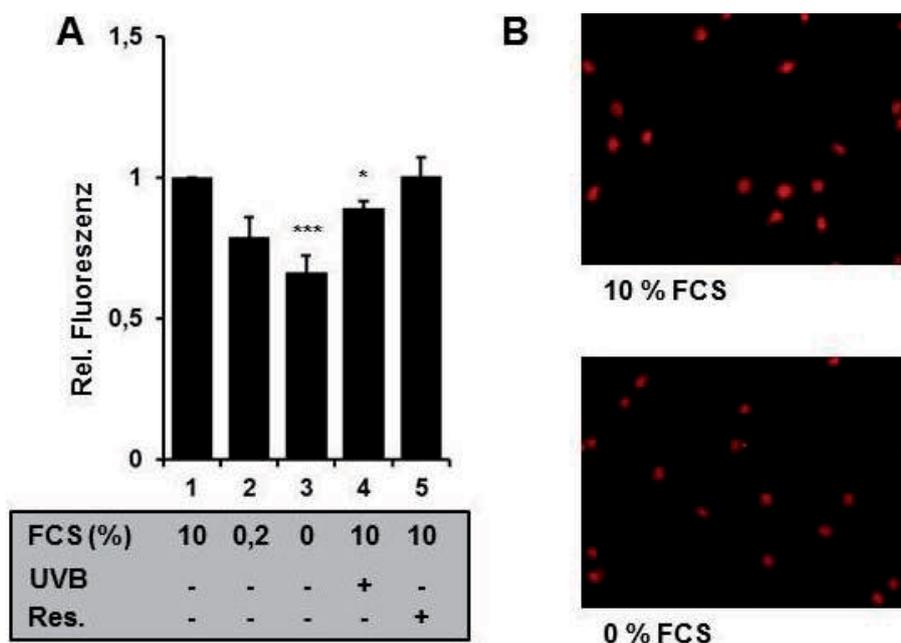


**Abb. 3.12:** (A) Vergleich von phosphoryliertem FoxO3a-, Akt- und JNK-Protein in primären Fibroblasten mittels Western-Blot Analyse. Die Zellen wurden mit 100 nM Wortmannin präinkubiert, anschließend mit UVB (einmalig 100 J/m<sup>2</sup>) bestrahlt und 30 Minuten postinkubiert. (B) Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen (n = 3) normiert auf GAPDH, Mittelwerte aller Daten ± SEM und die Kontrolle auf 1 gesetzt.

Nachdem in den Reporteranalysen gezeigt werden konnte, dass die Bindeaktivität der FoxO-Transkriptionsfaktoren an ihre Zielsequenz durch UVB (sowie FCS und Resveratrol) regulierbar ist, sollte im nächsten Schritt die Lokalisation von FoxO3a in der Zelle betrachtet werden.

Abbildung 3.13 zeigt die zusammengefassten Daten zur kernlokalisierten FoxO3a-Fluoreszenz nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an FCS, UVB-Strahlung und Resveratrol-Behandlung. Nach einer UVB-Behandlung mit 100 J/m<sup>2</sup> und einer Postinkubationszeit von 30 Minuten ist eine Abnahme der FoxO3a-Proteinmenge im Zellkern zu verzeichnen (Balken Nr. 4). Somit führt UVB zu einem Export von FoxO3a-Protein aus dem Zellkern, wodurch sich die Abnahme der FoxO-abhängigen Luziferaseaktivität in den vorherigen Analysen (Abb. 3.9) erklären lässt.

In Hepatozyten erhöht Resveratrol die Lokalisation von FoxO1a im Zellkern (Frescas et al., 2005). In primären Hautfibroblasten wurde die Menge an kernlokalisiertem FoxO3a-Protein durch Zugabe von 50 µM Resveratrol nicht erhöht (Balken Nr. 5), sondern verhielt sich wie die unbehandelten Fibroblasten. Dagegen induzierte Resveratrol in den FoxO-abhängigen Reporteranalysen eine Aktivitätssteigerung um Faktor 2, die sich demnach nicht über eine Änderung der Lokalisation des Transkriptionsfaktors erklären lässt, sondern vermutlich auf eine durch Resveratrol induzierte FoxO-Aktivitätssteigerung im Zellkern zurückzuführen ist.

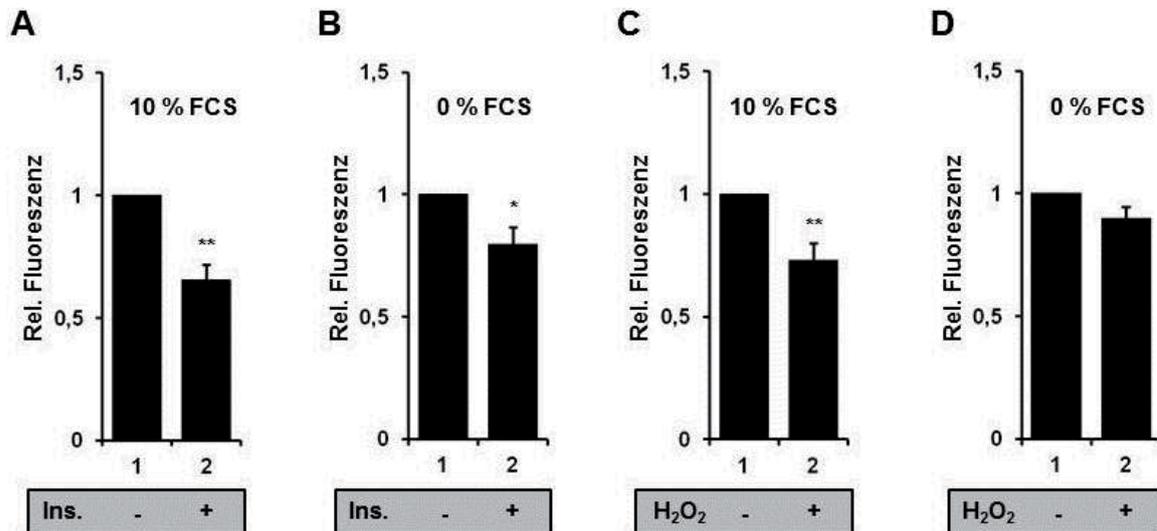


**Abb. 3.13:** Vergleich der relativen Gesamtfluoreszenz von FoxO3a-Protein im Zellkern primärer Hautfibroblasten unterschiedlicher Spender. Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Fixierung in (A) 10 %, 0,2 % und 0 % FCS/DMEM *low glucose* kultiviert. 50  $\mu$ M Resveratrol (Res.) wurde für 24 Stunden in 10 % FCS/DMEM hinzugeben. (B) Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von FoxO3a im Zellkern kultivierter Fibroblasten mit 10 % und 0 % FCS/DMEM *low glucose*. Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anzahl der Objekte (Zellzahl) korreliert. Die Daten sind Mittelwerte ( $n \geq 4$ )  $\pm$  SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen T-Tests errechnet (\*\* $P < 0,001$ ; \* $P < 0,05$ ).

Zur Kontrolle wurden Fibroblasten mit 100 nM Insulin behandelt und nach 30 Minuten fixiert. Sowohl die Behandlung in Gegenwart von 10 % FCS (Abb. 3.14 A) als auch in serumfreiem Medium (B) verringerte die Menge an FoxO3a-Protein im Zellkern. Somit führte die Stimulierung mit Insulin zu einer Modulation von FoxO3a und einhergehenden Export aus dem Nukleus ins Zytoplasma. Diese Beobachtung deckt sich mit den vorherigen Ergebnissen der FoxO-abhängigen Reporteranalysen, in denen eine Insulinbehandlung zu einer Verringerung der Luciferaseaktivität führte.

UVB ist unter anderem an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt und führt zu oxidativem Stress in Zellen. Daher wurden Fibroblasten mit 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  behandelt und anschließend auf die Lokalisation von FoxO3a-Protein hingehend untersucht. Die zusammengefassten Daten in Abbildung 3.14C und D zeigen eine Reduktion der FoxO3a-Proteinmenge im Zellkern. Somit sind reaktive Sauerstoffspezies in der Lage, FoxO3a zu modulieren und den Export aus dem Zellkern zu induzieren. Aus den Daten zur immunzytochemischen Färbung für FoxO3a und zur reduzierten Luciferaseaktivität in

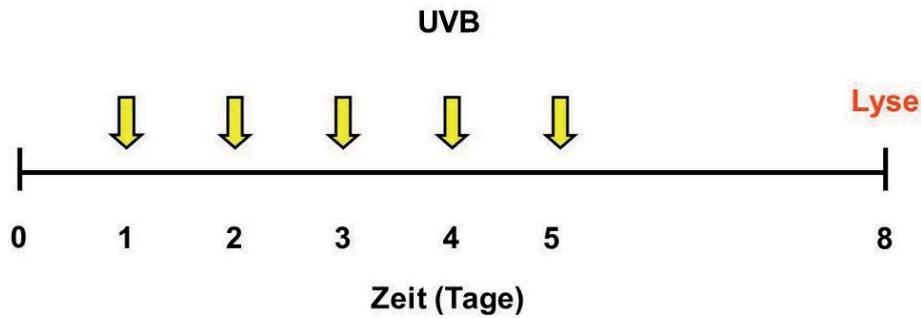
Abb. 3.9 lässt sich folgern, dass 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  die FoxO-Aktivität aufgrund eines Exports aus dem Zellkern ins Zytoplasma reprimiert. Außerdem sind die Effekte von UVB und  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit der Hypothese vereinbar, dass UVB die Modulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies hervorruft.



**Abb. 3.14:** Vergleich der relativen Gesamtfluoreszenz von FoxO3a-Protein im Zellkern von primären Hautfibroblasten unterschiedlicher Spender. Die Zellen wurden 30 Min. (A) mit 100 nM Insulin (Ins.) und (C) 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in 10% FCS/DMEM behandelt. Bei FCS-reduziertem Medium wurden die Fibroblasten 24 Stunden vor der Behandlung in 0 % FCS/DMEM kultiviert und erst dann für 30 Min. (B) mit 100 nM Ins. und (C) mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt. Die Gesamtfluoreszenz von FoxO3a im Zellkern wurde auf die Anzahl der Objekte (Zellzahl) normiert und die Kontrollbehandlung (Balken 1) auf 1 gesetzt: Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens 5 voneinander unabhängigen Versuchen ( $n \geq 3$ )  $\pm$  SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen T-Tests errechnet (\*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,05$ ).

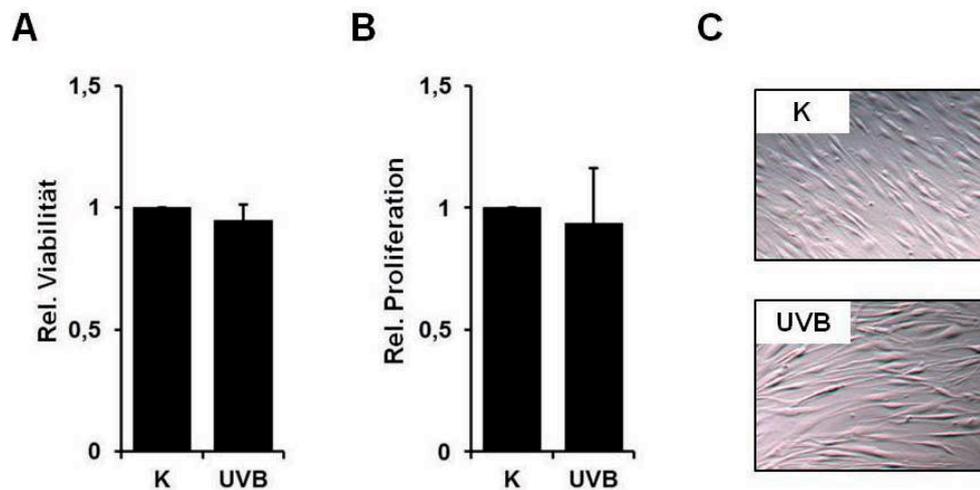
### 3.4 Repetitive UVB-Bestrahlung und FoxO-/SIRT-mRNA-Spiegel

Nachdem die Aktivität und Lokalisation von FoxO-Transkriptionsfaktoren unter verschiedenen exogenen Einflüssen in Fibroblasten untersucht wurde, stellte sich die Frage, wie sich UVB-Behandlung über einen längeren Zeitraum, wie bei Sonnenexposition üblich, auf die FoxO-Regulation auswirken könnte. Hierzu wurden UVB-Bestrahlungen mit 100  $\text{J}/\text{m}^2$  pro Tag über einen Zeitraum von 5 Tagen vorgenommen. Zusätzlich wurde eine Postinkubation von 72 Stunden angeschlossen, um einen möglichen UVB-induzierten chronischen Effekt beobachten zu können und nicht nur die letzte Bestrahlung der Expositionsreihe betrachtet wird (Abb. 3.15).



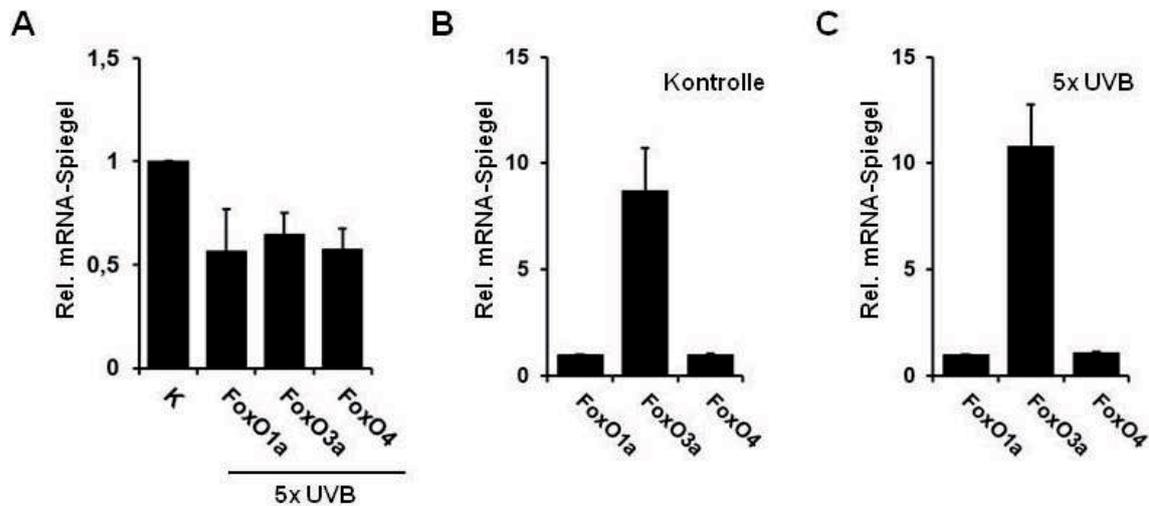
**Abb. 3.15:** Schematische Darstellung der repetitiven UVB-Behandlung. Die Fibroblasten wurden an Tag 0 ausgebracht und an den 5 folgenden Tagen täglich einmalig mit  $100 \text{ J/m}^2$  bestrahlt. Im Anschluss an die fünfte Bestrahlung folgte eine Postinkubationszeit von 72 Stunden, bevor die Zellen lysiert wurden.

Nach repetitiver UVB-Bestrahlung war eine veränderte Zellmorphologie zu beobachten (Abb. 3.16C). Die UVB-behandelten Fibroblasten sahen im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen sehr schmal und ausgedünnt aus, was auf einen Stresszustand hindeutet. Um eine Toxizität der repetitiven UVB-Behandlung mit anschließender 72-stündiger Postinkubation auszuschließen, wurde die Viabilität mittels WST-1 und Propidiumiodidfärbung ermittelt. Als Kontrolle dienten hier Zellen, die nach dem jeweiligen Behandlungsmuster ohne UVB-Bestrahlung inkubiert worden waren. Wie Diagramm A in Abbildung 3.16 zu entnehmen ist, war die Viabilität nach mehrfacher UVB-Exposition im Vergleich zur Kontrollbehandlung unverändert. Des Weiteren wurde durch eine Proliferationsanalyse mittels BrdU-Test keine Änderung der DNA-Replikation festgestellt (Abb. 3.16B).



**Abb. 3.16:** Vergleich der relativen Viabilität (A) und relativen Proliferationsrate (B) in humanen Hautfibroblasten nach fünf UVB-Behandlungen ( $\acute{a}$  100 J/m<sup>2</sup>) mit anschließender Postinkubation von 72 Stunden und der entsprechenden Kontrollbehandlung. Die Daten wurden mit der Zellzahl korreliert und auf die Kontrolle normiert. Hierbei handelt es sich um Daten aus drei unabhängigen Versuchen, die je als Triplikat vermessen wurden und deren Mittelwerte  $\pm$  SEM abgebildet sind. (C) Lichtmikroskopische Aufnahme von UVB-behandelten und unbehandelten Fibroblasten.

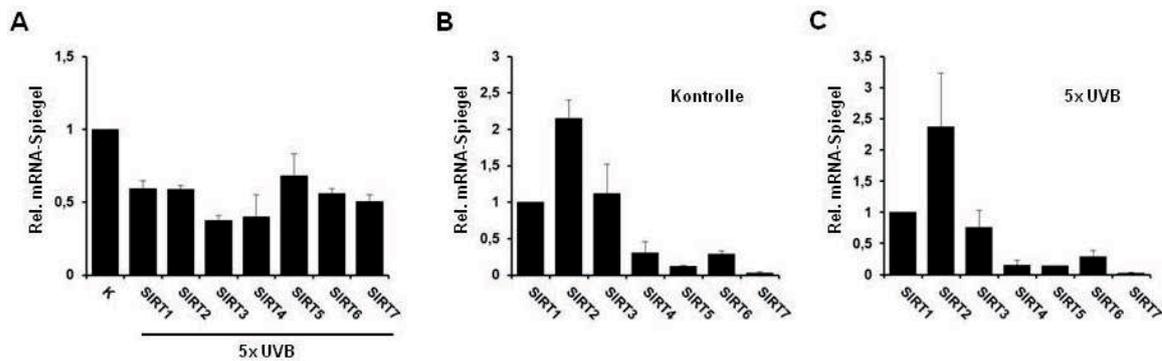
Während eine einmalige Bestrahlung keine Veränderung der FoxO-mRNA-Spiegel induzierte (Abb. 3.6), zeigt Abb. 3.17, dass repetitive Bestrahlung eine deutliche Abnahme der mRNA-Spiegel aller FoxO-Isoformen um ca. 50 % bewirkte. Die Tatsache, dass die Änderung auch 72 Stunden nach Behandlung nachweisbar war, lässt die Vermutung zu, dass es sich hierbei um einen langfristigen Effekt und keine kurzzeitige Stressantwort auf einen UVB-Reiz handelt. Ein Vergleich der FoxO-mRNA-Spiegel innerhalb der UVB-behandelten und Kontrollzellen, wobei FoxO1a gleich 1 gesetzt wurde, ergab, dass FoxO3a-mRNA-Spiegel deutlich höher sind als jene von FoxO1a. Weiterhin waren die mRNA-Spiegel von FoxO4 etwa gleich jenen von FoxO1a. Demzufolge verringern sich alle FoxO-mRNA-Spiegel nach fünffacher UVB-Exposition, allerdings bleibt die Verteilung zwischen den drei verschiedenen FoxO-Isoformen untereinander unverändert im Vergleich zu den basalen Bedingungen (Abb. 3.2A).



**Abb. 3.17:** Vergleich der per Realtime-RT-PCR bestimmten und auf *hprt* normierten FoxO-mRNA-Spiegel in primären Hautfibroblasten. (A) Relative FoxO-mRNA-Spiegel nach repetitiver UVB-Behandlung, je Tag  $100 \text{ J/m}^2$ , und anschließender Postinkubation von 72 Stunden, wobei die jeweiligen mRNA-Spiegel in unbestrahlten Kontrollzellen (K) gleich 1 gesetzt wurden. (B) Relative FoxO-mRNA-Spiegel der Kontrollzellen ohne UVB-Bestrahlung, in denen FoxO1a-mRNA-Spiegel gleich 1 gesetzt wurden. (C) Relative FoxO-mRNA-Spiegel nach repetitiver UVB-Behandlung, je Tag  $100 \text{ J/m}^2$ , und anschließender Postinkubation von 72 Stunden, wobei FoxO1a-mRNA-Spiegel gleich 1 gesetzt wurden. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass repetitive UVB-Behandlung die mRNA-Spiegel aller FoxO-Isoformen deutlich reduzierte (Abb. 3.17A), wurden im Folgenden die SIRT-mRNA-Spiegel unter den gleichen Behandlungsbedingungen mittels Realtime-PCR-Analyse untersucht.

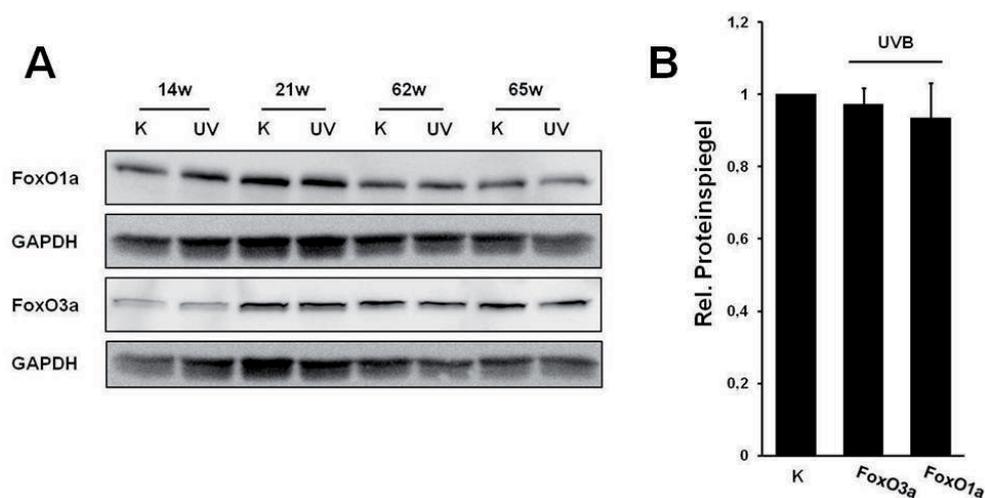
Eine einmalige UVB-Bestrahlung mit  $100 \text{ J/m}^2$  konnte keine Änderung der SIRT-mRNA-Spiegel induzieren (Abb. 3.7), wogegen Abb. 3.18 eine deutliche Reduzierung der relativen mRNA-Spiegel nach repetitiver UVB-Exposition zeigt. Ein Vergleich der SIRT-mRNA-Spiegel innerhalb der UVB-behandelten und unbehandelten Zellen, wobei SIRT1 gleich 1 gesetzt wurde, zeigt, dass SIRT2-mRNA-Spiegel höher sind als diejenigen von SIRT1. Weiterhin waren die mRNA-Spiegel von SIRT4 bis SIRT7 deutlich unterhalb jener von SIRT1. SIRT3-Spiegel waren etwa gleich zu jenen von SIRT1. Demzufolge verringern sich alle SIRT-mRNA-Spiegel nach repetitiver UVB-Bestrahlung, allerdings bleibt auch hier die Verteilung der sieben verschiedenen Sirtuine untereinander unverändert im Vergleich zu den basalen Bedingungen (Abb. 3.3)



**Abb. 3.18:** Vergleich der per Realtime-RT-PCR bestimmten und auf *hprt* normierten SIRT-mRNA-Spiegel in primären Hautfibroblasten. (A) Relative SIRT-mRNA-Spiegel nach repetitiver UVB-Behandlung, je Tag 100 J/m<sup>2</sup>, und anschließender Postinkubation von 72 Stunden, wobei die jeweiligen mRNA-Spiegel in unbestrahlten Kontrollzellen (K) gleich 1 gesetzt wurden. (B) Relative SIRT-mRNA-Spiegel der Kontrollzellen ohne UVB-Bestrahlung, in denen die SIRT1-mRNA-Spiegel gleich 1 gesetzt wurden. (C) Relative SIRT-mRNA-Spiegel nach repetitiver UVB-Behandlung, je Tag 100 J/m<sup>2</sup>, und anschließender Postinkubation von 72 Stunden, wobei die jeweiligen SIRT1-mRNA-Spiegel gleich 1 gesetzt wurden. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM.

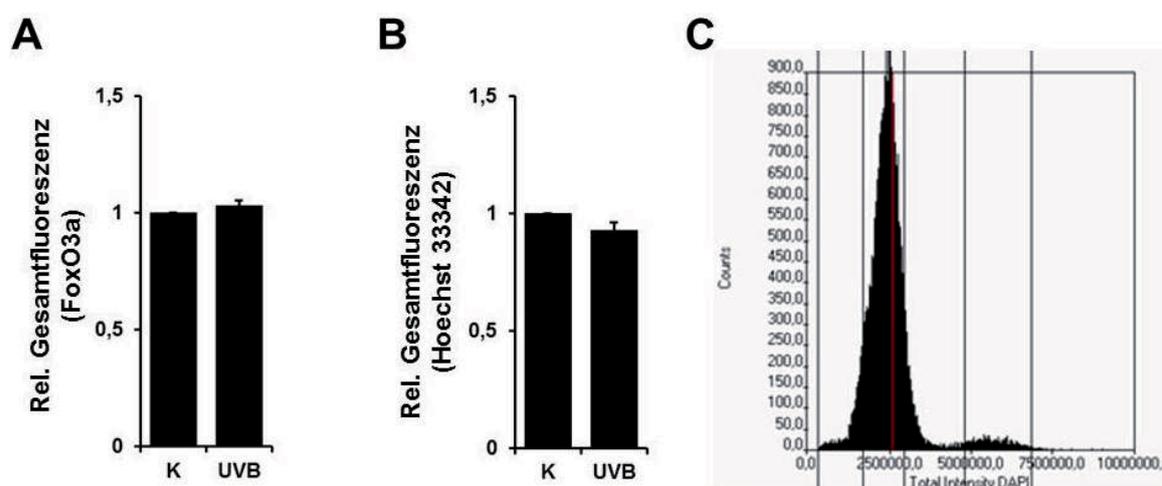
Es kann zusammenfassend festgehalten werden, dass repetitive UVB-Bestrahlungen mit einer anschließenden Postinkubationszeit von 72 Stunden zu einer Reduktion der FoxO- und SIRT-mRNA-Spiegeln führt. Dieser beobachtete Effekt ist aufgrund der anschließenden Inkubationszeit von 72 Stunden eine langfristige Regulation.

In Anlehnung an die Ergebnisse der Realtime-RT-PCR, nach denen die mRNA-Spiegel aller FoxO-Isoformen nach repetitiver UVB-Bestrahlung in primären Hautfibroblasten reduziert waren, sollte im Folgendem die Proteinspiegel für FoxO1a und FoxO3a mittels Western-Blot Analyse untersucht werden. Hierzu wurden primäre Hautfibroblasten sowohl junger als auch alter Spender nach demselben UVB-Behandlungsmuster untersucht. Abbildung 3.19 zeigt, dass die Proteinspiegel für FoxO1a und FoxO3a nach mehrfacher UVB-Behandlung sowohl in Fibroblasten alter als auch junger Spender unverändert sind. Die densitometrische Auswertung der Western-Blot Analyse verdeutlicht (Abb. 3.19B), dass die repetitive UVB-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle keine Auswirkung auf die Expression von FoxO-Proteinen hat. Zusätzlich kann eine alternsabhängige Stressantwort hinsichtlich der FoxO-Expression ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.19:** (A) Vergleich der FoxO1a- und FoxO3a-Proteinspiegeln in primären Fibroblasten nach fünfmaliger UVB-Behandlung (UV = 100 J/m<sup>2</sup> pro Tag) und anschließender Postinkubation von 72 Stunden, normiert auf GAPDH. (B) Densitometrische Auswertung der Western-Blot Analysen (n = 4), Mittelwerte aller Daten ± SEM und die Kontrolle (K) auf 1 gesetzt.

Nachdem gezeigt wurde, dass repetitive UVB-Behandlung keinen Einfluss auf die FoxO-Proteinmenge hat, sollte überprüft werden ob die Lokalisation von FoxO3a nach chronischer Stressbehandlung verändert ist. Des Weiteren wurde eine Zellzyklusanalyse vorgenommen, um zu testen, ob eine wiederholte UVB-Behandlung zu einer Verschiebung der Zellzyklusphasen führt.



**Abb. 3.20:** Vergleich der relativen Gesamtfluoreszenz von FoxO3a-Protein (A) und Hoechst 33342 (B) im Zellkern primärer Hautfibroblasten unterschiedlicher Spender. Die Zellen wurden fünf Mal mit 100 J/m<sup>2</sup> UVB pro Tag bestrahlt und nach 72 Stunden Postinkubationszeit fixiert. Die Fluoreszenzintensität im Zellkern wurde gegen die Anzahl der Objekte (Zellzahl) korreliert. (B) Vergleich der relativen Gesamtfluoreszenz in UVB-behandelten Zellen und der unbestrahlten Kontrolle (K), wobei die Kontrolle gleich 1 gesetzt wurde. (C) Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anzahl der Objekte (Zellzahl) korreliert. Die Daten sind Mittelwerte (n = 8) ± SEM.

Abbildung 3.20A zeigt den Vergleich der relativen Gesamtfluoreszenz von nukleärem FoxO3a-Protein in bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Nach wiederholter UVB-Behandlung und einer Postinkubationszeit von 72 Stunden war die Menge an FoxO3a-Protein im Zellkern sowohl bei den UVB-bestrahlten als auch Kontrollzellen gleich. Somit unterscheidet sich die einmalige von der fünffachen UVB-Behandlung in der Lokalisation von FoxO3a-Protein. Während eine einmalige Behandlung zur Verringerung von FoxO3a im Zellkern führte (Abb. 3.13), hat die chronische UVB-Bestrahlung im Vergleich zu den Kontrollbedingungen keinen Einfluss auf die Menge an nukleärem FoxO3a. Aufgrund des langen Behandlungs- und Kultivierungszeitraumes der primären Fibroblasten folgte eine Zellzyklusanalyse.

Diagramm B (Abb. 3.20) zeigt die relative Gesamtfluoreszenz von UVB-behandelten und unbehandelten Fibroblasten aus der G1-Phase. Aufgrund der Konfluenz der Kulturen zum Zeitpunkt der Analysen (und Zelllyse) und aufgrund der entsprechenden Kontaktinhibition der Zellen befanden sich alle Zellen in der Zellzyklusphase G1. Daher sind auch keine weiteren Zellzyklusphasen aufgeführt. Demnach proliferierten sowohl die UVB-bestrahlten als auch Kontrollzellen aufgrund der begrenzten Fläche nicht weiter.

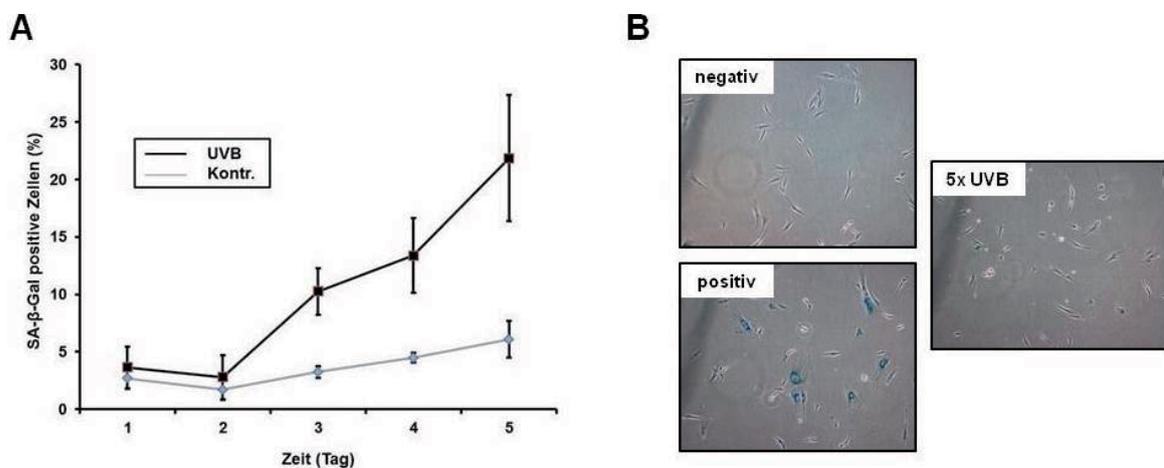
Eine Überprüfung der FoxO-Aktivität mittels Reportergenanalyse, wie sie bereits bei der einfachen UVB-Behandlung durchgeführt wurde, war bei der repetitiven Bestrahlung nicht möglich: Zum einen könnte über den langen Zeitraum, in dem die Zellen weiterhin proliferieren, das transfizierte Konstrukt verloren gehen bzw. ausdünnen und zum anderen war die Transfektion mit den verwendeten FoxO-responsiven Konstrukten nach 48 Stunden für primäre Hautfibroblasten toxisch.

Es kann zusammenfassend festgehalten werden, dass eine einmalige UVB-Bestrahlung keine Auswirkung auf Zellzyklus und DNA-Replikation hatte und die Transkription von FoxO-Transkriptionsfaktoren und SIRT-Deacetylasen unverändert blieb. Es wurde jedoch eine deutliche Aktivitätsänderung nach 100 J/m<sup>2</sup> UVB-Bestrahlung festgestellt, die eine Abnahme der FoxO-abhängigen Luziferaseaktivität in Reportergen-Analysen zur Folge hatte. Des Weiteren wurde eine verminderte Menge an FoxO3a-Protein im Zellkern behandelter Fibroblasten beobachtet. Der Vergleich zu den mehrfach UVB-bestrahlten Fibroblasten zeigt, dass eine signifikante Abnahme der FoxO- und SIRT-mRNA-Spiegel nach repetitiver UVB-Exposition zu messen war, allerdings keine Änderung der FoxO-Proteinmenge und Lokalisation von FoxO3a.

### 3.5 Repetitive UVB-Bestrahlung und zelluläre Seneszenz

Repetitive Stressinduktionen können Alterungsprozesse in Zellen beschleunigen und wurden als *in vitro* Alterungsmodell (SIPS – *stress-induced premature senescence*) diskutiert (Brack et al., 2000). Im nächsten Schritt wurde deshalb überprüft, ob die fünfmalige UVB-Bestrahlung mit je 100 J/m<sup>2</sup> und einer Postinkubationszeit von 72 Stunden verfrühte Alterung in primären Hautfibroblasten induziert. Hierzu wurde die SA (*senescence-associated*)- $\beta$ -Galaktosidase Färbung verwendet, die als anerkannter Marker für Alterung angesehen ist (Dimri et al., 1995).

Die Färbung auf SA- $\beta$ -Gal als Seneszenzmarker ergab, dass nach repetitiver UVB-Bestrahlung von Fibroblasten über fünf Tage (je 100 J/m<sup>2</sup>) eine Anreicherung SA- $\beta$ -Gal-positiver Zellen in der Kultur erfolgte, die in den jeweiligen Kontrollen nicht aufzufinden war (Abb. 3.21). Nach fünfmaliger Bestrahlung war der Anteil positiver Zellen mit 22 % etwa dreimal höher als in Kontrollkulturen. Repetitive UVB-Bestrahlung hatte somit zur erhöhten Expression eines klassischen Seneszenzmarkers in Fibroblastenkulturen geführt.



**Abb. 3.21:** (A) Vergleich der seneszenzabhängigen (SA)  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung nach UVB-Behandlung (100 J/m<sup>2</sup> pro Tag) in humanen Hautfibroblasten. Hierbei handelt es sich um Daten aus drei unabhängigen Versuchen, bei denen je drei Gesichtsfelder bzw. mindestens 150 Objekte ausgezählt wurden und deren Mittelwerte  $\pm$  SEM gebildet worden sind. (B) Lichtmikroskopische Aufnahmen von SA- $\beta$ -Gal negativ (pH 6,0) und positiv (pH 4,0) gefärbten Fibroblasten.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass repetitive UVB-Bestrahlungen in primären Hautfibroblasten Alterung induziert und sowohl FoxO- als auch SIRT-mRNA-Spiegel um

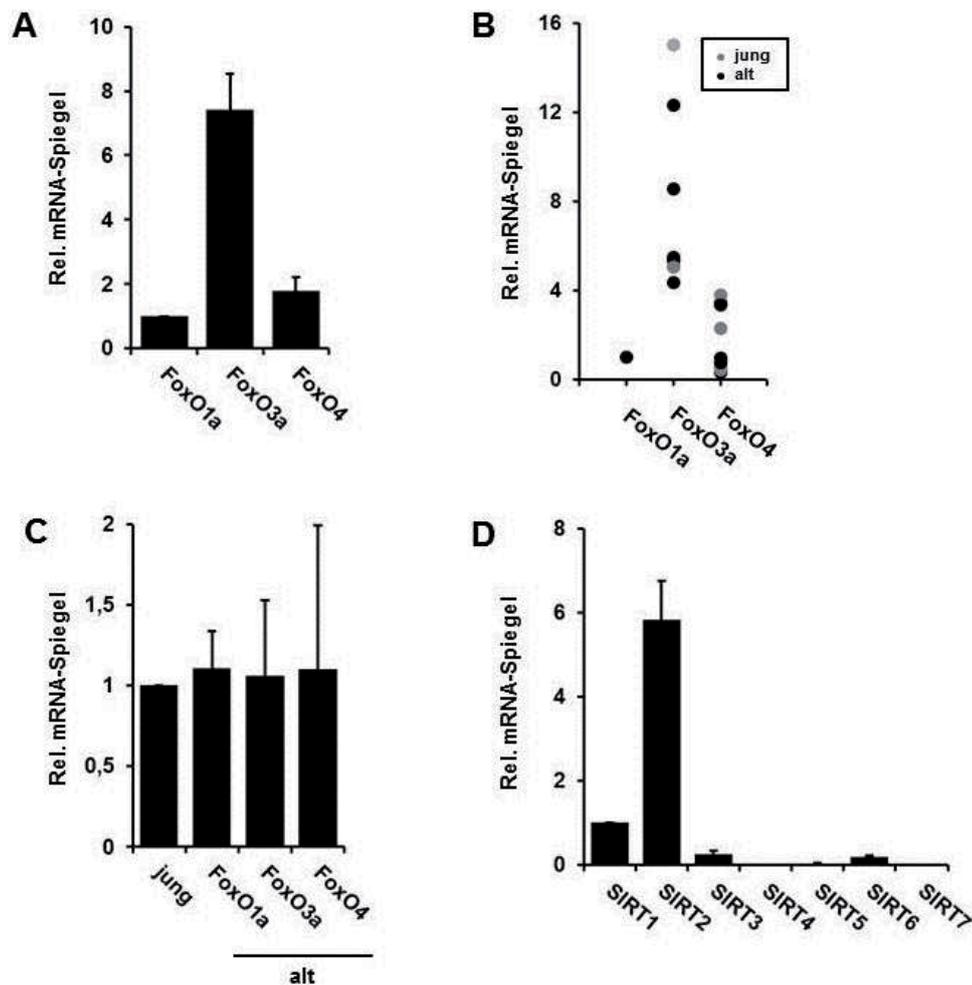
ca. 50 % verringert waren, wurden weitere Alterungsmodelle hinzugezogen, um die Rolle von FoxO-Transkriptionsfaktoren zu untersuchen.

Zunächst wurden die mRNA-Spiegel aus isolierten Hautfibroblasten von Spendern unterschiedlichen Alters (jung  $\leq 35$  Jahre, alt  $\geq 62$  Jahre) betrachtet. Die per Realtime-RT-PCR analysierten FoxO-mRNA-Spiegel (FoxO1a, -3a, -4) ergaben, dass die Spiegel für FoxO3a-mRNA im Schnitt mehr als siebenmal höher waren als jene von FoxO1a (Abb. 3.22A). FoxO4-mRNA Spiegel liegen tendenziell über jenen von FoxO1a. Vergleicht man die zusammengefassten Daten der relativen FoxO-mRNA-Spiegel mit jenen der basalen Bedingungen (Abbildung 3.2A), so ähnelt sich die Verteilung der mRNA-Spiegel unter den drei verschiedenen FoxO-Isoformen.

Schlüsselt man wie in Diagramm B dargestellt die einzelnen mRNA-Spiegel der unterschiedlichen Probanden auf (jung in grau und alt in schwarz), so existierten starke interindividuelle Unterschiede. Allerdings war keine Korrelation zwischen Alter der Zelldonoren und einzelner mRNA-Spiegel festzustellen.

Fasst man die mRNA-Spiegel aller jungen Spender zusammen und setzt sie gleich 1, so sind die relativen mRNA-Spiegel aller drei FoxO-Transkriptionsfaktoren in alten Spendern etwa gleich jenen von jungen. Die hohen Standardabweichungen sind auf die großen interindividuellen Unterschiede zurückzuführen, wie sie bereits Diagramm B widerspiegelt. Demnach scheint sich das SIPS-Modell deutlich von den isolierten Hautfibroblasten unterschiedlich alter Spender hinsichtlich der mRNA-Spiegel zu unterscheiden. Während im SIPS-Modell FoxO-mRNA-Spiegel nach repetitiver UVB-Behandlung verringert waren, konnte im Vergleich zwischen Fibroblasten alter und junger Spender kein Unterschied in der Expression der FoxO-Transkriptionsfaktoren beobachtet werden.

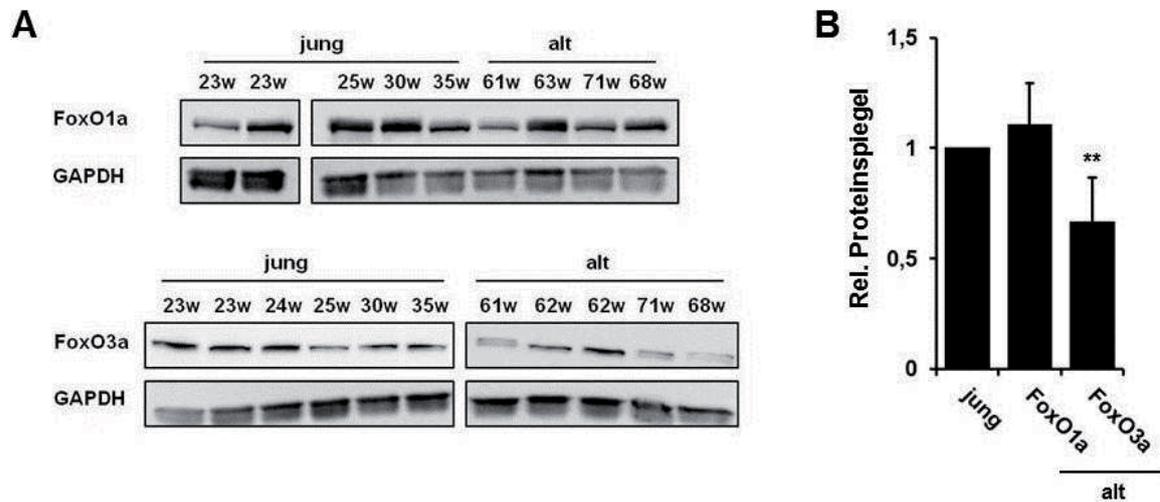
In Diagramm D wurden für alle mRNA-Spiegel die Mittelwerte aus jungen und alten Spender zusammengefasst. Die SIRT-mRNA-Spiegel der Isoformen 1 bis 7 unterschieden sich stark voneinander. Die Expression von SIRT2 ist viermal höher als SIRT1, während SIRT3 und SIRT1-mRNA Spiegel einander gleichen sowie SIRT4, SIRT5, SIRT6 und SIRT7 verhältnismäßig geringe mRNA-Spiegel aufzeigten. Die zusammengefassten SIRT-mRNA-Spiegel zeigen keine Unterschiede im Expressionsmuster von Zellen alter und junger Spender. Somit können sowohl FoxO- als auch SIRT-mRNA-Spiegel in isolierten Zellen aus unterschiedlichen Probanden verschiedenen Alters als altersunabhängig bezeichnet werden.



**Abb. 3.22:** Vergleich der per Realtime-RT-PCR bestimmten und auf HPRT normierten FoxO- und SIRT- mRNA-Spiegel in Patientenfibroblasten unterschiedlichen Alters. (A) FoxO-mRNA-Spiegel aus 9 verschiedenen Zelldonoren unterschiedlichen Alters (FoxO1a gleich 1 gesetzt). (B) Darstellung der einzelnen relativen FoxO-mRNA-Spiegel (jung = grau; alt = schwarz). (C) Vergleich der mRNA-Spiegel aus Fibroblasten alter Spender ins Verhältnis gesetzt zu denen von jungen Donoren (jung  $\leq 35$  Jahre, alt  $\geq 62$  Jahre). (D) SIRT-mRNA-Spiegel aus 9 verschiedenen Zellspendern unterschiedlichen Alters (SIRT1 auf 1 gesetzt). Die Daten sind Mittelwerte ( $n = 9$ )  $\pm$  SEM. In (C): Mittelwerte aus 4 alten und 4 jungen Spendern (jung auf 1 gesetzt)  $\pm$  SEM.

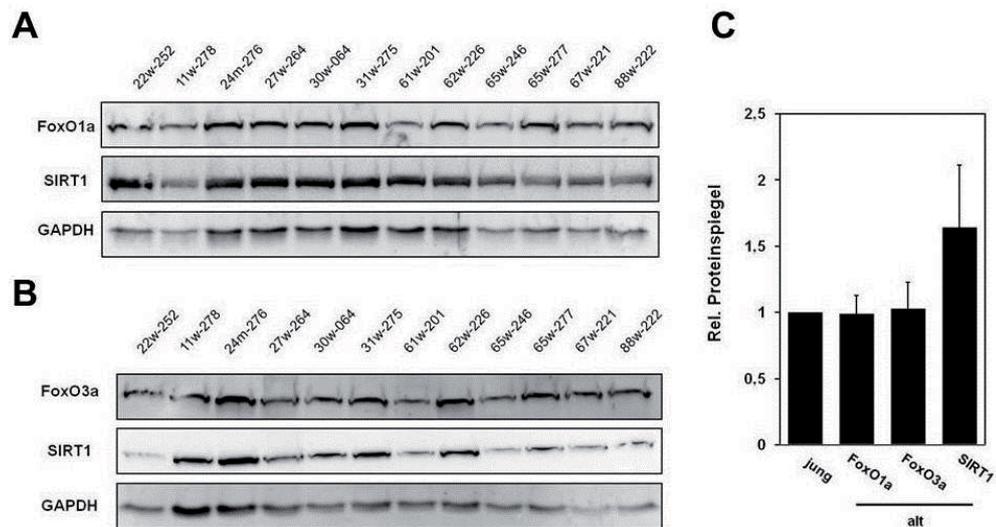
Nachdem keine altersabhängigen Unterschiede für FoxO-mRNA in Patientenfibroblasten festzustellen waren, wurden im nächsten Schritt die Proteinspiegel für FoxO1a und FoxO3a mittels Western-Blot Analyse untersucht. Abbildung 3.23 zeigt die Ergebnisse der Proteinanalytik der beiden FoxO-Transkriptionsfaktoren, wobei es keinen altersabhängigen Unterschied, ausschließlich interindividuelle Schwankungen, in der FoxO1a-Proteinmenge gab (A). Dagegen ist die Menge an FoxO3a-Protein in Fibroblasten älterer Spender um ca. 40 % geringer als in denen junger Spender (B). Somit zeigt die densitometrische Auswertung keinen Unterschied in der FoxO1a-Proteinmenge, sondern nur eine geringere FoxO3a-Proteinmenge in Fibroblasten älterer Spender. Zu-

sammenfassend spiegeln sich auch in diesem Alterungsmodell die Ergebnisse aus den vorangegangenen Realtime-RT-PCR Analysen nicht in der Proteinmenge wider.



**Abb. 3.23:** (A) Vergleich von FoxO1a- und (B) FoxO3a-Proteinspiegeln in primären Fibroblasten, isoliert aus Proben von Patienten unterschiedlichen Alters, normiert auf GAPDH. (C) Densitometrische Auswertung der Western Blot-Analysen von FoxO1a (jung n = 6, alt n = 4) und FoxO3a (jung n = 5, alt n = 5): Mittelwert aller Daten  $\pm$  SEM, Kontrolle auf 1 gesetzt. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen T-Tests errechnet (\*\* $P < 0,01$ ).

In Analogie zur Western-Blot Analyse der Proteinspiegel in Patientenfibroblasten wurden ergänzend isolierte primäre Keratinozyten aus alten und jungen Patienten hinsichtlich der FoxO1a- und FoxO3a-Proteinspiegel hinzugezogen. Abbildung 3.24 zeigt, dass keine altersabhängigen Unterschiede in der Proteinmenge von FoxO1a (A) und FoxO3a (B) nachzuweisen sind. Zusätzlich war die SIRT1-Proteinmenge in primären Keratinozyten von jungen und alten Donoren ebenfalls unverändert. Die densitometrische Auswertung (C) fasst die Daten aller ausgewerteten Banden zusammen und wurden zu den „jungen“ Keratinozyten ins Verhältnis gesetzt.



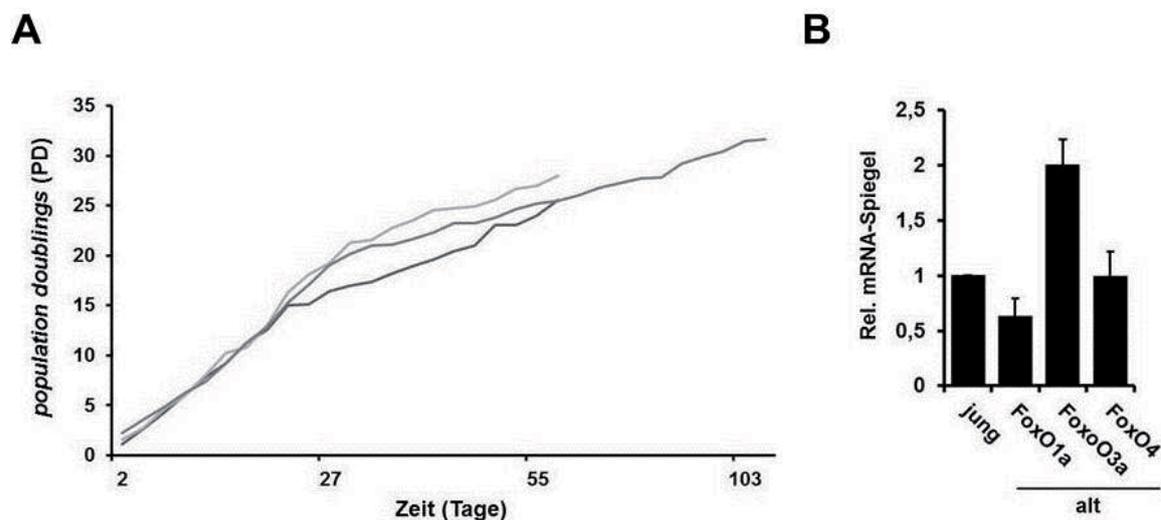
**Abb. 3.24:** Vergleich von SIRT1-, FoxO1a- (A) und FoxO3a-Proteinspiegeln (B) in primären Keratinozyten, isoliert aus Patienten unterschiedlichen Alters, normiert auf GAPDH. (C) Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen: Mittelwert aller Daten (N = 12) +/- SEM, jung auf 1 gesetzt.

Zusammengefasst mit den vorherigen Realtime-PCR Analysen (Abb. 3.22) wurden keine Unterschiede in den mRNA-Spiegel, weder für FoxO-Transkriptionsfaktoren noch Sirt-Deacetylasen, zwischen alten und jungen Spendern festgestellt. Dieser Trend setzte sich auch in den Proteinspiegeln für FoxO1a in Fibroblasten und FoxO1a, 3a und SIRT1 in primären Keratinozyten fort. Ausschließlich die Proteinmenge von FoxO3a war in isolierten Fibroblasten aus älteren Spendern verringert.

Bereits Anfang der 60er Jahre wurde beobachtet, dass diploide Zellen nur über einen bestimmten Zeitraum *in vitro* proliferieren können (Hayflick, Moorhead, 1961) und es unter anderem durch Telomerverkürzungen zu einem Zellzyklusstopp kommt (Allsopp et al., 1992). Diese Form der replikativen Seneszenz ist ein weiteres Alterungsmodell und wurde hingehend auf FoxO-mRNA-Spiegeln untersucht.

Um *in vitro* gealterte Zellen zu generieren, wurden primäre Fibroblasten dreier unterschiedlicher Spender (F103, F104, F118) in einem gleichmäßigen Verhältnis (1:3) bei stets gleicher Konfluenz bis zum Stillstand der Zellteilung, dem sogenannten *Hayflick-Limit*, passagiert und währenddessen die Zellzahl bestimmt. In Abbildung 3.21 wurden die berechneten Zellteilungsraten (*population doublings*) gegen den Zeitverlauf aufgeführt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich bei allen drei Spendern nach ca. 55 Tagen eine Stagnierung der Zellteilungsrate einstellte. Somit wurden Fibroblasten der Passage

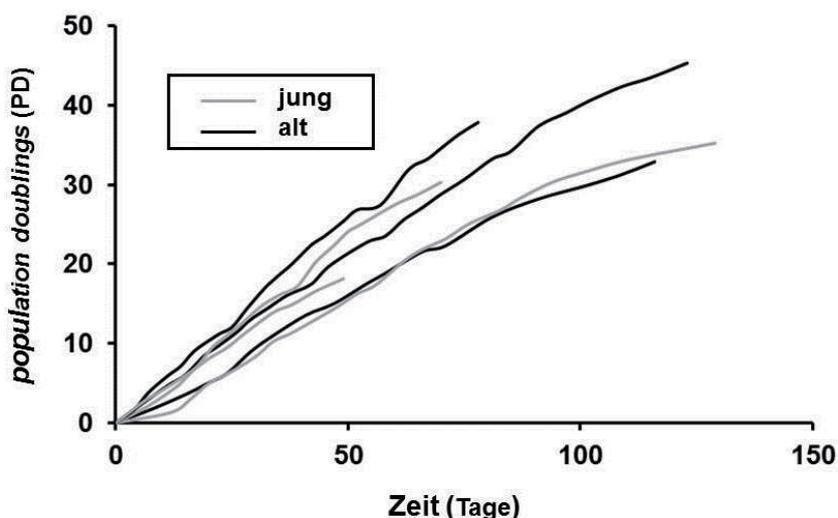
12 oder geringer als jung und Zellen ab Passage 28 als alt eingestuft. Schließlich wurden replikativ gealterte Fibroblasten sowie junge Zellen hinsichtlich der Expression der FoxO-Isoformen mittels Realtime-PCR-Analysen untersucht und sodann gefragt, ob sich etwaige Unterschiede wie im SIPS-Modell auch in replikativ gealterten Zellen wiederfinden ließen. Wiederholbare, in allen drei untersuchten Fibroblastenlinien festzustellende Veränderungen der FoxO-mRNA Spiegel nach replikativer Alterung existieren im Falle von FoxO1a und FoxO3a, während der FoxO4-mRNA Spiegel sich nicht signifikant von der Situation in jungen Zellen unterscheidet (Abb. 3.25 B). Auch in repetitiv behandelten Fibroblasten des SIPS-Modelles war ein gegenüber den Kontrollzellen geringerer FoxO1a-mRNA Spiegel festzustellen. Im Unterschied zur replikativen Seneszenz hingegen waren die mRNA-Spiegel für FoxO3a nicht erhöht.



**Abb. 3.25:** (A) Vergleich der Zellverdopplungen (*population doublings*) in dermalen Fibroblasten dreier verschiedener Spender (F103, F104, F118) (B) Vergleich der per Realtime-RT-PCR bestimmten FoxO-mRNA-Spiegel von jungen (niedrige Passage) und alten (hohe Passage) Fibroblasten. Daten sind Mittelwerte ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM.

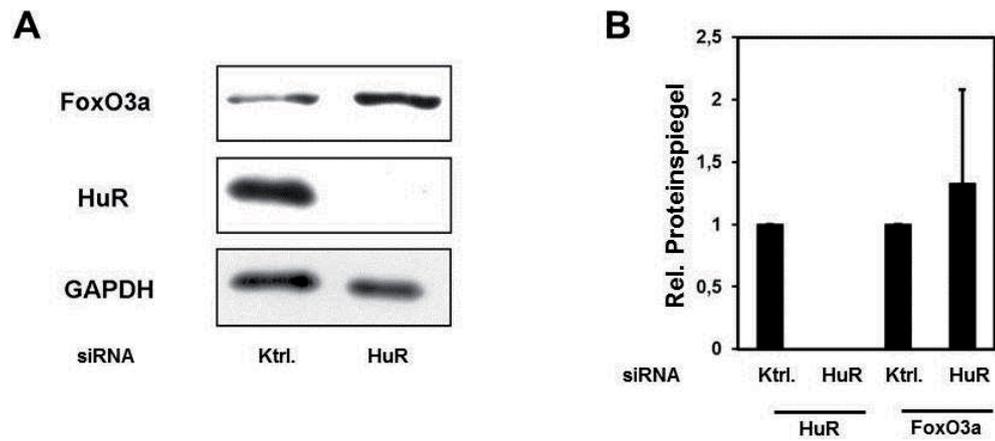
Abschließend stellte sich die Frage, inwieweit die unterschiedlichen Zellkulturmodelle für die Untersuchung der Alterung von primären Fibroblasten ausreichend physiologisch sind. Hierzu wurden ebenfalls Patientenfibroblasten unterschiedlichen Alters gleichmäßig passagiert und die Zellteilungsraten zwischen jungen und alten Spendern miteinander verglichen. Im Vorfeld wurde angenommen, dass isolierte Fibroblasten aus älteren Spendern sich weniger häufig teilen und somit eine verfrühtes *Hayflick-Limit* auftritt.

In Abbildung 3.26 sind die Verdopplungsraten der von jungen (grau) und alten (schwarz) Patienten stammenden Fibroblasten aufgeführt. Nach ca. 50 Tagen wurde keine Abnahme der Zellverdopplungsraten bei Fibroblasten älterer Spender beobachtet. Auch nach Weiterführen der Zellverdopplungsraten einiger Spenderfibroblasten zeichnete sich kein Unterschied zwischen den jungen und alten Donoren ab. Allerdings könnte man bei den weitergeführten Fibroblasten eine leichte Abnahme der Teilungsrate erkennen.



**Abb. 3.26:** Vergleich der Zellverdopplung (*population doublings*) verschiedener Patientenfibroblasten unterschiedlichen Alters (jung = grau; alt = schwarz).

Es wurde die Hypothese formuliert, dass eine Diskrepanz zwischen FoxO3a-mRNA- und Proteinspiegel im SIPS-Modell (Abb. 3.19) möglicherweise auf RNA-stabilisierende Proteine zurückzuführen sei. Daher wurden HaCaT-Zellen mit siRNA für HuR (Hu-Antigen R), ein bekannterweise mRNA-stabilisierendes Protein (Wang, 2000), transfiziert und auf Änderung der FoxO3a-Proteinspiegel untersucht. 48 Stunden nach der Transfektion der HuR-siRNA war keinerlei HuR-Protein mehr nachweisbar (B), allerdings konnte zeitgleich keine Abnahme der FoxO3a-Proteinmenge festgestellt werden. In der densitometrischen Auswertung (Abb. 3.27B) ist zu erkennen, dass sich die FoxO3a-Spiegel nach HuR-Depletion im Vergleich zur Kontroll-siRNA unverändert waren.



**Abb. 3.23:** (A) Vergleich der FoxO3a- und HuR-Proteinspiegel in HaCaT-Zellen 48 h nach transienter Transfektion von HuR- und entsprechender Kontroll-siRNA, normiert auf GAPDH. B) Densitometrische Auswertung der drei voneinander unabhängigen Versuche. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM

## 4. Diskussion

### 4.1 UVB reguliert FoxO-Aktivität

Die basale Expression der verschiedenen FoxO- und SIRT-Isoformen in dermalen Fibroblasten und Keratinozyten war bisher nicht beschrieben worden, daher sollte dies zuerst im Rahmen dieser Arbeit mittels Realtime-PCR-Analyse untersucht werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die basalen mRNA-Spiegel, sowohl der unterschiedlichen FoxO- als auch SIRT-Isoformen, sich stark voneinander unterscheiden. So wurde in primären Fibroblasten und HaCaT-Zellen ein ca. dreifach höherer mRNA-Spiegel für FoxO3a als für FoxO1a gemessen (Abb. 3.2A, B). Demnach könnte auch mehr FoxO3a- als FoxO1a-Protein innerhalb der Zelle vorliegen und die Regulation der antioxidativen Abwehr, Zellzyklus und Apoptose überwiegend über FoxO3a als FoxO1a verlaufen. Unterschiedliche FoxO-Proteinspiegel innerhalb eines Zell- oder Gewebetyps sind nicht bekannt, allerdings wurde durch einen Knock-out von FoxO1a und FoxO3a in Mäusen schwere Schäden in der embryonalen Entwicklung hervorgerufen, was wiederum FoxO4<sup>-/-</sup>-Mutanten nicht zu beobachten war (Hosaka et al., 2004; Furuyama et al., 2004) Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass unterschiedliche Isoformen verschiedene Funktionen übernehmen und möglicherweise in dermalen Zellen FoxO3a eine führende Rolle, z. B. in der antioxidativen Abwehr, einnimmt. Außerdem konnte anhand von Untersuchungen in Hundertjährigen gezeigt werden, dass SNPs im foxo3a-Gen mit vermindertem Auftreten von altersabhängigen Erkrankungen in Zusammenhang stehen (Flachsbart et al., 2009), allerdings nicht für foxo1a, foxo4 und foxo6 (Kleindrop et al., 2011).

Weitere Realtime-PCR-Analysen haben gezeigt, dass die mRNA-Spiegel der FoxO-Transkriptionsfaktoren in dermalen Fibroblasten doppelt so hoch waren wie in HaCaT-Zellen (Abb. 3.2C, D). Eine geringere mRNA-Menge würde im Allgemeinen auch auf eine geringere Verfügbarkeit von FoxO-Proteinen in Keratinozyten hindeuten. Dies könnte wiederum zur Folge haben, dass FoxO-Faktoren eine weitaus geringere Rolle in der Epidermis als in der darunterliegenden Dermis einnehmen. Da primäre Keratinozyten eine relativ kurze Lebensdauer von 28 Tagen haben und durch ihre physiologische Lokalisation exogenen Noxen deutlich stärker ausgesetzt sind, wäre eine vergleichbare oder vielleicht sogar höhere FoxO-Proteinmenge von Nachteil. So könnte zum Beispiel durch Bildung von ROS, wie es *in vitro* mit Behandlung von Schwermetallionen gezeigt wurde

(Eckers & Klotz, 2009), zu einer Translokation und Aktivitätsabnahme führen, was unter anderem zu einer verringerten Expression antioxidativer Enzyme (MnSOD) zur Folge hätte.

Letzten Endes kann in dieser Arbeit die Differenz der unterschiedlichen FoxO-Expression und funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Hautzelltypen nicht hinreichend geklärt werden.

Bei der Untersuchung der Expressionsmuster der Sirtuine (Abb. 3.3) in primären Hautfibroblasten wurde deutlich, dass SIRT2-mRNA-Spiegel im Vergleich zu SIRT1 mehr als doppelt so hoch waren und diejenigen von SIRT4-5 deutlich darunter lagen. Eine Ursache für diese Beobachtung könnte die Verteilung der einzelnen Isoformen in den Zellkompartimenten sein. So sind SIRT3-5 ausschließlich mitochondriell lokalisiert, SIRT1 und 2 sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär. SIRT6 und 7 wurden als hauptsächlich kernlokalisiert beschrieben (Michan & Sinclair, 2007; North & Verdin, 2007; Tanno et al., 2007). Da der Massenanteil der Mitochondrien in Relation zu den anderen Kompartimenten in Fibroblasten deutlich geringer einzuschätzen ist, könnte auch eine geringere Proteinmenge, und damit die beobachtete geringere Expression zumindest für SIRT4 und 5, teilweise erklärt werden. Ein Vergleich der relativen mRNA-Spiegel in verschiedenen Geweben, wobei die mRNA-Spiegel aus dem Gehirn gleich 1 gesetzt wurden, deutet auf eine höhere Expression von SIRT3-5 als SIRT1 im Herzen hin (Michishita et al., 2005). Zellen mit einem hohen ATP-Bedarf, insbesondere Muskel-, Leber und Gehirnzellen, besitzen eine höhere Mitochondrienmasse und -aktivität, wodurch die höheren mRNA-Spiegel mitochondrialer Sirtuine zu erklären wären. Dies würde die Hypothese stützen, dass die unterschiedlichen mRNA-Spiegel der verschiedenen Isoformen auf die Zellkompartimente zurückzuführen wäre.

Nachdem Unterschiede der Expressionsspiegel zwischen (i) den einzelnen FoxO-Isoformen (ii) SIRT-Isoformen und (iii) zwischen unterschiedlichen Zelltypen dermalen humanen Gewebes nachgewiesen werden konnten, wurde untersucht, ob sich Veränderungen der SIRT-Proteine und der FoxO-Faktoren auf transkriptioneller und/oder posttranslatiionaler Ebene durch UVB-Stimulus nachweisen lassen.

Die Daten der Realtime-PCR-Analysen zu den mRNA-Spiegeln konnten weder eine Änderung der Expression von FoxO- (Abb. 3.6A) noch SIRT-Isoformen (Abb. 3.7) nach UVB-Bestrahlung aufzeigen. Auch Proliferation und Replikation waren durch UVB nicht

beeinflusst, wodurch auch keine Änderung der mRNA-Spiegel zu erklären wäre. Ein Zellzyklusstopp für UVB-behandelte Zellen hätte zu einem Replikationsstopp und verminderten FoxO- bzw. SIRT-Expression zur Folge haben können.

Ungeachtet der unveränderten FoxO-Expression, wurde eine Regulation der FoxO-abhängigen Reporterantwort (Abb. 3.9A) und eine Abnahme von nukleärem FoxO3a-Protein (Abb. 3.13) nachgewiesen. UVB wird in biologischen Systemen von aromatischen Aminosäuren und Nukleinsäuren absorbiert, wodurch in den UVB-bestrahlten Fibroblasten z. B. Tryptophan oder die DNA selber angeregt wurde und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induziert haben könnte. Ähnliche Beobachtungen wurden anhand von unterschiedlichen UVA-Bestrahlungsmethoden in verschiedenen Zellkulturmedien gezeigt, wobei auch hier die  $H_2O_2$ -Konzentration angestiegen war (Mahns et al., 2003). Daher wurden dermale Fibroblasten mit  $H_2O_2$  behandelt, um eine UVB-Behandlung zu simulieren, und es konnte ebenfalls eine Abnahme der FoxO-abhängigen Luziferaseaktivität beobachtet werden. Somit konnte gezeigt werden, dass ROS zu einer negativen Regulierung der FoxO-Aktivität führt und durch UVB induziert werden kann.

Im nächsten Schritt dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie UVB die Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren beeinflussen kann. Hierzu wurde zunächst die FoxO3a-Phosphorylierung in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung betrachtet. Eine Phosphorylierung von T32 führt in der Regel zu einer Translokation von FoxO3a ins Zytoplasma und konnte mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Somit induziert UVB als exogener Stressfaktor eine erhöhte FoxO3a-Phosphorylierung in HaCaT-Zellen, allerdings konnte dieser Effekt in primären Fibroblasten nicht gezeigt werden (Abb. 3.12). Aufgrund vorheriger Arbeiten mit HaCaT-Zellen und UVB-Behandlung (AG Prof. Klotz) wurde 24 Stunden vor der Behandlung das Zellkulturmedium durch serumfreies Medium ersetzt. Bei der Kultivierung der dermalen Fibroblasten wurde vor und nach der UVB-Behandlung grundsätzlich Medium mit 10 % FCS verwendet, damit sich die Bedingungen zwischen einmaliger und der späteren fünffachen UVB-Behandlung nicht unterscheiden und im Anschluss auch miteinander vergleichbar sind. Allerdings sind Wachstumsfaktoren in der Lage über Stimulierung von Rezeptortyrosinkinasen, Akt- und FoxO-Phosphorylierung zu bewirken (Wang et al., 2000). Demnach konnte vermutlich eine UVB-Bestrahlung in Fibroblasten, aufgrund der hohen basalen Phosphorylierung, keine vermehrte FoxO3a-Phosphorylierung wie in HaCaT-Zellen hervorrufen. Seltenerweise hatte dies keinen Einfluss auf die FoxO3a-Proteinmenge in der

immunzytochemischen Analyse und es wurde eine Abnahme von nukleärem FoxO3a nachgewiesen (Abb. 3.9B). Andererseits wurde anhand einer Mutation in der nukleären Exportsequenz (NES) von FoxO-Faktoren bereits gezeigt, dass ein über PI3K/Akt-vermittelter Export nicht zwingend notwendig ist, um sich auf die FoxO-Aktivität auszuwirken (Tsai et al., 2003). In Folge dessen wäre es vorstellbar, dass die starke FoxO-Phosphorylierung in primären Fibroblasten nicht zwangsläufig zu einer Translokation führen muss. Die Daten der FoxO-abhängigen Luziferaseaktivität können aufgrund der transienten Transfektion in serumfreien Medium nicht zur Unterstützung dieser Hypothese herangezogen werden. Allerdings deuten die immunzytochemischen Analysen darauf hin, dass es trotz der hohen FCS-Konzentration und der daraus resultierenden starken Akt- und FoxO-Phosphorylierung es zu einer Abnahme von nukleärem FoxO3a kommt.

Darüber hinaus wurde eine Zunahme der JNK-Phosphorylierung nach UVB-Bestrahlung in dermalen Fibroblasten beobachtet (Abb. 3.12). Da UVB die Aktivität durch Phosphorylierung von JNK induziert und dies über die Bildung von ROS geschieht (Adler et al., 1996), wird noch einmal die Hypothese gestützt, dass UVB-Strahlung ROS-Bildung in dermalen Fibroblasten induziert und somit Auswirkung auf die Regulation von FoxO-Faktoren nehmen kann. In diesem Fall würde eine erhöhte JNK-Phosphorylierung in Bezug auf FoxO3a bedeuten, dass eine erhöhte Kernlokalisierung auftritt, wie sie für FoxO4 bereits gezeigt wurde, und/oder den 14-3-3-vermittelten Export verhindern (Essers et al., 2004; Oh et al., 2005). Dies konnte weder in der FoxO-responsiven Reportergenanalyse noch in der immunzytochemischen Färbung in UVB-behandelte Fibroblasten belegt werden. Daher kann man davon ausgehen, dass UVB wie erwartet eine erhöhte JNK-Phosphorylierung hervorruft, die aber keinen Einfluss auf die FoxO-Aktivität in dermalen Fibroblasten nimmt.

Somit ist die Stimulierung mit UVB-Bestrahlung in primären Hautfibroblasten und die dadurch entstandene Modulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren vergleichbar zu bereits untersuchten Stressfaktoren in anderen Zelltypen. So wurde wie bereits erwähnt durch Behandlung mit Schwermetallionen in Leberzellen der Export von GFP-gekoppeltem FoxO1a-Protein aus dem Nukleus ins Zytoplasma beobachtet (Eckers et al., 2009). Die Überexpression von Katalase, einem Enzym das Wasserstoffperoxid abbaut, führte in Muskelzellen zu einer Erhöhung FoxO-abhängiger Reporteraktivität und kann auf die verringerte Menge an ROS zurückgeführt werden (Dodd et al., 2010).

Nachdem die Aktivität des FoxO-responsiven Promoterkonstruktes durch UVB-Bestrahlung herabgesetzt wurde und nukleäres FoxO3a abnahm, sollte im Folgenden die Regulation von FoxO-Faktoren über den PI3K/Akt-Signalweg nachgewiesen werden. In den Western-Blot-Analysen wurde keine erhöhte Akt-Phosphorylierung (S473) nach UVB-Bestrahlung nachgewiesen, was, wie oben bereits diskutiert wurde, auf die hohe FCS-Konzentration zurückgeführt werden kann (Abb. 3.12). Allerdings wurde durch Inhibierung der PI3K sowohl eine Abnahme der Akt-, FoxO- und JNK-Phosphorylierung beobachtet, als auch die UVB-vermittelte Reduktion der FoxO-responsiven Promotoraktivität antagonisiert (Abb. 3.11). Somit konnte gezeigt werden, dass UVB über die Bildung von ROS den Signalweg unterhalb von PI3K reguliert.

In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass UVB zu einer negativen Regulation der FoxO-Aktivität führt und zusätzlich die nukleäre FoxO3a-Proteinmenge reduziert.

2011 wurde eine gegensätzliche Hypothese veröffentlicht, in der durch UV-Strahlung in MCF-7 Brustkrebszellen GFP-gekoppeltes FoxO3a vom Zytoplasma in den Zellkern transferiert. Auch eine Vorbehandlung mit Wortmannin konnte keine Änderung der FoxO-Translokation bewirken (Wang et al., 2011). Zum einen wurde in der Publikation nicht auf die UV-Art eingegangen, was für die Absorption im biologischen System entscheidend ist und erst dadurch eine Relevanz für die Zelle aufkommt. Zum anderen handelt es sich hierbei um Brustkrebs- und Lungenkrebszellen, die möglicherweise Mutationen an FoxO-Transkriptionsfaktoren tragen könnten, wodurch eine Phosphorylierung an spezifischen Aminosäuren und der damit verbundene Export nicht mehr möglich wäre. Des Weiteren könnten auch andere wichtige Signalproteine in der FoxO-Regulation betroffen sein. Bei einem Funktionsverlust der PI3K würde eine mögliche UV-vermittelte Aktivierung von Akt ausbleiben, was ebenfalls Auswirkungen auf die Lokalisation der FoxO-Faktoren hätte.

Abschließend konnte zu den FoxO-abhängigen Reporteranalysen gezeigt werden, dass Resveratrol zu einer gesteigerten Promotoraktivität in dermalen Fibroblasten führt. In Rattenleberzellen wurde ein ähnlicher Effekt durch Resveratrol und der daraus resultierenden FoxO1a-abhängige Steigerung der Glukoneogenese beschrieben (Frescas et al., 2005). Allerdings wurde in dermalen Fibroblasten keine Zunahme von nukleärem

FoxO3a beobachtet (Abb. 3.13). Resveratrol gilt als potenter Aktivator für SIRT1 und wird mit Langlebigkeit (Howitz et al., 2003) und Tumorsuppression (Woo et al., 2004) in Zusammenhang gebracht. Daher könnte man schlussfolgern, dass Resveratrol in dermalen Fibroblasten die SIRT-Aktivität steigert und möglicherweise FoxO-Proteine deacetyliert. Dies hätte wiederum eine Aktivitätssteigerung der FoxO-Transkriptionsfaktoren zur Folge und würde die erhöhte Luziferaseaktivität erklären. Da keine Zunahme von kernlokalisiertem FoxO3a nachgewiesen werden konnte, kann man davon ausgehen, dass es entweder nur zu einer Aktivitätssteigerung der FoxO-Faktoren im Zellkern kommt oder FoxO1a anstatt FoxO3a durch die Resveratrol-Behandlung stimuliert wird. Dessen ungeachtet kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gesteigerte FoxO-abhängige Luziferaseaktivität auch über andere Signalwege verläuft. So wurde in humanen Tumorzellen gezeigt, dass Resveratrol auch die Phosphorylierung von p38 MAPK und JNK inhibiert (Woo et al., 2004). Demnach könnte eine Modulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Resveratrol auch über JNK anstatt SIRT verlaufen.

Darüber hinaus wird diskutiert, ob SIRT1 Einfluss auf die Akt-Phosphorylierung nimmt. So wurde in 3T3-L1 Adipozyten nach Überexpression von SIRT1 keine Änderung der Akt-Phosphorylierung beobachtet (Yoshizaki et al., 2009). Dagegen nahm die insulinstimulierte PKB-Phosphorylierung in Muskelzellen und adurch eine Behandlung mit Resveratrol und SIRT1 Inhibierung mittels RNAi (RNA-Interferenz) ab. Dies wurde allerdings aufgrund der unterschiedlichen Zelltypen begründet. Zusätzlich konnte eine Induktion Akt durch SIRT in *C. elegans* gezeigt werden (Fröjdö et al., 2011).

Darüber hinaus wurde vor kurzem in Tumorzellen des Pankreas gezeigt, dass Resveratrol über Akt und ERK die FoxO-Aktivität steigert und somit Tumorwachstum aufhebt (Roy et al., 2011).

#### 4.2 Einfluss von repetitiver UVB-Strahlung in primären Fibroblasten

Im zweiten Teil der Arbeit sollte geklärt werden, wie sich eine wiederholte UVB-Behandlung, wie es bei sonnenexponierter Haut üblich ist, auf die FoxO- und SIRT-Expression auswirkt.

In den vorherigen Realtime-PCR-Analysen konnte keine Änderung der FoxO- und SIRT-mRNA-Spiegel nach einmaliger UVB-Bestrahlung gezeigt werden, allerdings verursachte repetitive UVB-Behandlung eine Abnahme der FoxO- und SIRT-mRNA-Spiegel um ca.

50 %. (Abb. 3.17A, Abb. 3.18). Ein Vergleich der FoxO-Isoformen untereinander, sowohl für die Kontrollzellen als auch die UVB-behandelten hat gezeigt, dass die Isoform-Expressionsmuster der mRNA-Spiegel denen der basalen entspricht. Somit wurde durch UVB die mRNA-Spiegel simultan reduziert und wirkte sich nicht selektiv auf eine spezielle Isoform oder Proteinfamilie aus. Es konnte in Fibroblasten (CS1AN - *Cockayne Syndrome Group B*) gezeigt werden, dass UV-Behandlung die RNA-Synthese reduzierte und wurde mit einer verminderten Aktivität der RNA-Polymerase II (RNAPII) begründet (Rockx et al., 2000). Somit könnte auch hier die gleichmäßige Abnahme der mRNA-Spiegel zu erklären sein, allerdings müsste sich dies ebenfalls auf das *housekeeping*-Gen *hprt* auswirken. Demnach wäre dann kein Unterschied zwischen UVB-bestrahlten und unbehandelten Fibroblasten in den mRNA-Spiegeln zu erkennen. Für FoxO-Transkriptionsfaktoren konnte gezeigt werden, dass die Synthese für FoxO-Protein innerhalb von 9 Stunden erfolgt und der RNA-Abbau etwas über 9 Stunden liegt. Die Halbwertszeit des Proteins ist schwierig zu definieren, da durch induzierte Ubiquitinierung der FoxO-Abbau deutlich schneller erfolgen kann (Smith & Shanley, 2010). Durch die lange Postinkubationszeit von 72 Stunden könnte bereits ausreichend neues FoxO-Protein synthetisiert worden sein und somit die unveränderten FoxO-Proteinspiegel in der Western-Blot-Analyse zwischen Kontrolle und UVB-behandelten Zellen erklären (Abb. 3.19). Zum anderen sollten die stark reduzierten mRNA-Spiegel, die sich langfristig eingestellt hatten, auch auf Proteinebene wiederfinden lassen. So wurde in HEK293T-Zellen gezeigt, dass HA(Hämagglutinin)-markiertes FoxO3a- und FoxO4-Protein nach 20 Stunden um ca. 80 % verringert war (van der Horst et al., 2006). Demzufolge können die unveränderten FoxO-Proteinspiegel nicht auf die Halbwertszeit zurückzuführen sein, sondern können nur mit der mRNA-Stabilität oder Translationseffizienz zusammenhängen. Es könnte eine erhöhte Translationsrate durch eine gesteigerte Aktivität von eIF-2, einem Translationsinitiator, die reduzierten mRNA-Spiegel kompensieren. Durch Behandlung mit unterschiedlichen FCS-Konzentrationen und PDGF konnte in 3T3-Fibroblasten die eIF-2 Proteinmenge erhöht werden. Allerdings ist dies auch ein Indikator der Tumorentwicklung (Rosenwald et al., 1993). Wahrscheinlicher ist, dass nach 72 Stunden die FoxO-Proteinspiegel den basalen Grundspiegeln wieder angeglichen haben.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob HuR, ein mRNA-stabilisierendes Protein, die FoxO3a-Proteinmenge regulieren könnte. Nach vollständiger HuR-Depletion war die FoxO3a-Proteinmenge völlig unverändert. Somit konnte gezeigt werden, dass HuR keine Rolle in

der Regulation der FoxO3a-Expression einnimmt und weiterhin die Frage ungeklärt bleibt, was die Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinmenge hervorruft.

Anlehnend an die Western-Blot-Analyse wurde in einer immunzytochemischen Färbung keine Änderung für nukleäres FoxO3a gemessen (Abb. 3.20A). Somit ist die Menge an kernlokalisiertem FoxO3a-Protein sowohl in UVB-behandelten als auch unbehandelten Fibroblasten gleich. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse und bestätigt, dass nach repetitiver UVB-Behandlung die FoxO3a-Proteinmenge unverändert bleibt. Demnach unterscheidet sich die einmalige von der fünffachen UVB-Behandlung in der Lokalisation von FoxO3a-Protein. Während eine einfache UVB-Behandlung zu einer Abnahme des Proteins im Zellkern führte, zeigt die repetitive UVB-Behandlung keinen Effekt in der Lokalisation. Angesichts der 72-stündigen Postinkubationszeit könnte neues FoxO3a-Protein aus dem Zytoplasma in den Zellkern transferiert sein. Des Weiteren könnte es durch die chronische Stressstimulierung ein Effekt der Hormesis auftreten, wodurch die Zelle nach regelmäßiger subtoxischer Stressreizung antioxidative Enzyme exprimiert hat und die UVB-induzierte Bildung von ROS nicht mehr zum Tragen käme.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine repetitive UVB-Behandlung eine Reduktion der FoxO- und SIRT-mRNA-Spiegel zur Folge hat. Darüber hinaus entstand eine Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinspiegel, die nicht abschließend in dieser Arbeit geklärt werden konnte.

#### 4.3 SIPS im Vergleich zu weiteren *in vitro*-Alterungsmodellen

Repetitive Stressinduktionen können Alterungsprozesse in Zellen beschleunigen und dienen als Alterungsmodell (Brack et al., 2000). Die SA- $\beta$ -Galaktosidase Färbung ist ein bekannter Seneszenzmarker (Dimri et al., 1995) und wurde nach repetitiver UVB-Behandlung eingesetzt. Die Auswertung der Analyse zeigt, dass repetitiver UVB-Bestrahlung vorzeitige Alterung in primären Hautfibroblasten induziert und einem SIPS-Modell entspricht (Abb. 3.21).

Die Daten der Realtime-PCR-Analyse in isolierten Fibroblasten aus Hautbiopsien unterschiedlicher Spender zeigen, dass keine Altersabhängigkeit, sondern nur interindividuelle Schwankungen in der Expression der FoxO- und SIRT-Isoformen zu beobachten war (Abb. 3.22B, C, D). Demnach unterscheidet sich das SIPS-Modell von den „*in vivo*“ geal-

terten humanen Hautfibroblasten. Während im SIPS-Modell sowohl die FoxO- als auch SIRT-mRNA-Spiegel in stressgealterten Zellen reduziert waren, sind hier keine Änderungen der mRNA-Spiegel zu beobachten.

Da bei den repetitiv UVB-behandelten Fibroblasten eine Diskrepanz zwischen mRNA-Spiegel und Proteinmenge auftrat, sollten im Folgenden auch die FoxO1a- und 3a-Proteinspiegel mittels Western-Blot-Analyse untersucht werden. Die Ergebnisse der Proteinanalytik zeigen, dass es keine Unterschiede in der FoxO1a-Proteinmenge zwischen jungen alten Spendern gibt. Ausschließlich FoxO3a ist Zellen alter Spender um ca. 40 % verringert im Vergleich zu den jungen Spendern (Abb. 3.23). Somit entsteht auch hier eine Diskrepanz zwischen mRNA- und den Proteinspiegel, allerdings nur für FoxO3a. Hierbei könnte es zum Beispiel in alten Spendern zu einer erhöhten Ubiquitinierung des FoxO3a-Proteins kommen und dadurch zu einem verfrühten Abbau führen. Weiterhin könnte auch die Translation der FoxO3a-mRNA beeinträchtigt sein und geringere FoxO3a-Proteinmengen bewirken. Somit unterscheidet sich das SIPS-Modell von den isolierten Zellen unterschiedlicher Spender, sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene.

Es stellte sich die die Frage, ob die isolierten Fibroblasten überhaupt einen jung-alt-Unterschied erkennen lassen. Demnach müsste die Zellteilungsrate von Zellen alter Spender vorzeitig stagnieren im Vergleich zu den jungen Spendern. Allerdings zeigt die Abb. 3.26, dass es keinen Unterschied zwischen der Zellteilungsrate alter und junger Spender existiert. Des Weiteren konnte eine SA- $\beta$ -Galaktosidase Färbung keinen Unterschied in der Anzahl von positiv-gefärbten Zellen nachweisen (Daten nicht aufgeführt). Damit ist fraglich, ob die isolierten Fibroblasten tatsächlich alt sind oder aufgrund der Isolierungsmethode nur die vitalsten und somit auch teilungsfähigsten Zellen aus der Biopsie hervorgehen.

Die Daten der Realtime-PCR-Analyse in replikativ gealterte Zellen zeigen, dass FoxO3a-mRNA-Spiegel im Alter doppelt so hoch sind wie in denen von jungen Zellen. Dagegen war der mRNA-Spiegel von FoxO1a in alten Zellen verringert.

## 5. Zusammenfassung

FoxO-Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation von Proliferation und Apoptose, des Energiestoffwechsels sowie der Stressantwort und oxidativen Abwehr beteiligt. Zwar ist bekannt, dass FoxO-Faktoren durch exogene Stressfaktoren, wie z. B. Schwermetallionen, moduliert werden, jedoch sind die Auswirkungen von ultravioletter (insbesondere UVB) Strahlung auf Expression und Aktivität von FoxO-Proteinen in humanen Hautzellen unbekannt. Ähnliches gilt für die Deacetylasen der SIRT-Familie (Sirtuine), die zu den Regulatoren von FoxO-Faktoren gehören. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst basale FoxO- und SIRT-mRNA-Spiegel analysiert und sowohl die Isoform-Expressionsmuster als auch Unterschiede zwischen kultivierten menschlichen dermalen Fibroblasten und HaCaT-Keratinocyten beschrieben. Eine subtoxische UVB-Bestrahlung (100 J/m<sup>2</sup>) in dermalen Fibroblasten hatte keinen Einfluss auf die Spiegel der FoxO-Faktoren und Sirtuine, allerdings führte UVB-Bestrahlung zu einer Abnahme der kernlokalisierten FoxO3a-Proteine und zu einer Abnahme der FoxO-responsiven Promotoraktivität. Des Weiteren wurde durch Hemmung der Phosphoinositid 3-Kinase die Minderung der FoxO-abhängigen Promotoraktivität in UVB-behandelten Hautfibroblasten verhindert und infolgedessen eine UVB-vermittelte Regulation der FoxO-Faktoren über PI3K nachgewiesen. Wasserstoffperoxid-Zugabe imitierte den UVB-induzierten Effekt in Zellen. Repetitive UVB-Bestrahlung, die der physiologischen Situation ähnelt, führte zwar zu einer verminderten mRNA-Expression aller FoxO- und SIRT-Isoformen, jedoch blieben die Isoform-Expressionsmuster unbeeinflusst, und die Behandlung hatte keine Änderung der Proteinmenge zur Folge. Repetitive Bestrahlung führte jedoch zu einer erhöhten Aktivität der seneszenzabhängigen  $\beta$ -Galaktosidase in UVB-behandelten Fibroblasten. Das Modell der mehrfachen UVB-Bestrahlung ist demnach als SIPS (*stress-induced premature senescence*)-Alterungsmodell geeignet. Abschließend wurde das SIPS-Modell mit zwei weiteren *in vitro*-Alterungsmodelle verglichen. Die FoxO-/SIRT-mRNA-Spiegel in Fibroblasten, isoliert aus Hautbiopsien unterschiedlich alter Spender, waren nicht altersabhängig verändert, hingegen war die FoxO3a-Proteinmenge in Zellen älterer Spender reduziert. In replikativ gealterten Fibroblasten war der FoxO3a-mRNA-Spiegel zweifach erhöht, wogegen jener von FoxO1a vermindert war.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass UVB-Strahlung die Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren in humanen Hautzellen mittels Phosphoinositid 3-Kinase beeinflusst. Die Expression dieser Faktoren selbst sowie der Sirtuine war weder durch UVB noch durch Alterung in *in vitro* Modellen signifikant und konsistent verändert.

### Summary

FoxO (forkhead box, class O) transcription factors are crucial regulators of proliferation, apoptosis, fuel metabolism as well as oxidative defense. Although FoxO-factors are known to be modulated by exogenous stressful stimuli, such as heavy metal ions, the effects of ultraviolet radiation (specifically UVB) on FoxO expression and activity in human skin cells are still unknown. Similarly, effects of UVB on the expression of potential regulators of FoxO proteins, the SIRT family deacetylases (sirtuins) have not been described to date.

Steady state levels of FoxO- and SIRT-mRNA were analyzed and the isoform expression patterns as well as differences between cultured human dermal fibroblasts and HaCaT keratinocytes described. In dermal fibroblasts, exposure to subtoxic doses of UVB (100 J/m<sup>2</sup>) did not affect the expression of FoxO factors and sirtuins, while at the same time stimulating a loss of nuclear FoxO3a and of FoxO-responsive promoter activity. Furthermore, an inhibition of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) attenuated the effect on FoxO-dependent promoter activity, thus implying PI3K in UVB-induced modulation of FoxO proteins. Exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> simulated the effect of UVB irradiation. In contrast, repetitive UVB irradiation, a treatment regimen closer to the physiological situation, led to decreased mRNA levels of all FoxO and SIRT isoforms, leaving the respective mRNA isoform level patterns and protein levels unaltered. Repetitive radiation enhanced the activity of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase in UVB-exposed fibroblasts and was found to be suitable as an *in vitro* model of stress-induced premature senescence (SIPS). Finally the SIPS model was compared to two additional *in vitro* aging models. Relative FoxO and SIRT mRNA-levels in dermal fibroblasts isolated from donors of different ages did not change with donor age, whereas FoxO3a protein levels were decreased in cells of old donors. In a fibroblast model of replicative senescence, FoxO3a mRNA levels were increased twofold, whereas those of FoxO1a were decreased.

In summary, it was demonstrated here that UVB radiation modulates the activity of FoxO transcription factors via PI3K in human skin cells. The expression of these factors as well as of sirtuins, however, was not altered by UVB radiation or during *in vitro* aging.

**Literaturverzeichnis:**

**Adler V, Schaffer A, Kim J, Dolan L, Ronai Z (1996)** UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways. *J Biol Chem.* 1995 Nov 3;270(44):26071-7.

**Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996)** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 1996 Dec 2;15(23):6541-51.

**Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M (1997)** 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol.* 1997 Oct 1;7(10):776-89.

**Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992)** Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 1;89(21):10114-8.

**Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Morret R, Zbinden I (1991)** The balance between Cu, Zn-superoxid dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry.* 1991 Sep 24;30(38):9305-13.

**Arden KC (2008)** FoxO animal models reveal a variety of diverse roles for FoxO transcription factors. *Oncogene.* 2008 Apr 7;27(16):2345-50.

**Athar M, Mukhtar H, Elmetts CA, Zaim MT, Llyod JR, Bickers DR (1989)** In situ evidence for the involvement of superoxide anions in cutaneous porphyrin photosensitization. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 Mar 30;151(3):1054-9.

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

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

**Bogoyevitch MA, Kobe B (2006)** Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006 Dec;70(4):1061-95

**Brack C, Lithgow G, Osiewacz H and Toussaint O (2000)** Molecular and cellular gerontology. *EMBO J.* 2000 May 2;19(9):1929-34.

**Briganti S, Picardo M (2003)** Antioxidant activity lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003 Nov;17(6):663-9.

**Brunet A, Bonni A, Zigmund 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.* 1999 Mar 19;96(6):857-68.

**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.* 2004 Mar 26;303(5666):2011-5.

**Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ (2009)** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transkriptionfaktor. *Cell.* 1999 Mar 19;96(6):857-68.

**Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998)** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998 Nov 13;282(5392):1318-21.

**Carracedo A, Pandolfi PP (2008)** The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene.* 2008 Sep 18;27(41):5527-41.

**Cassada RC, Russell RL (1975)** The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 1975 Oct;46(2):326-42.

**Cao C, Lu S, Kivlin R, Wallin B, Card E, Bagdasarian A, Tamakloe T, Wang WJ, Song X, Chu WM, Kouttab N, Xu A, Wan Y (2009)** SIRT1 confers protection against UVB- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death via modulation of p53 and JNK in cultured skin keratinocytes. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep;13(9B):3632-43.

**Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BM, Serrano M, Lam EW (2000)** Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *Biol Chem.* 2000 Jul 21;275(29):21960-8.

**Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, Nakajima T, Fukamizu A (2004)** Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 6;101(27):10042-7.

**Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999)** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999 Nov 15;13(22):2905-27.

**De Gruijl FR (1999)** Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer.* 1999 Dec;35(14):2003-9.

**Dhar A, Young MR, Colbrun NH (2002)** The role of AP-1, NF-kappaB and ROS/NOS in skin carcinogenesis: the JB6 model is predictive. *Mol Cell Biochem.* 2002 May-Jun;234-235(1-2):185-93.

**Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, Coffe PJ (2002)** FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol.* 2002 Feb 4;156(3):531-42.

**Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995)** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 26;92(20):9363-7.

**Dodd SL, Gagnon BJ, Senf SM, Hain BA, Judge AR (2010)** Ros-mediated activation of NF-kappaB and Foxo during muscle disuse. *Muscle Nerve.* 2010 Jan;41(1):110-3.

**Donahue BA, Yin S, Taylor JS, Reines D, Hanawalt PC (1994)** Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *PNAS* August 30, 1994 vol. 91 no. 18 8502-8506.

**Eckers A, Klotz LO (2009)** Heavy metal ion-induced insulin-mimetic signaling. *Redox Rep.* 2009;14(4):141-6.

**Essaghir A, Dif N, Marbehant CY, Coffe PJ, Demoulin JB (2009)** The Transcription of FoxO Genes Is Stimulated by FoxO3 and Repressed by Growth Factors. *J Biol Chem* 2009 April 17; 284(16): 10334–10342.

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

**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.* 2005 May 20;308(5725):1181-4.

**Fernau NS, Fugmann D, Leyendecker M, Reimann K, Grether-Beck S, Galban S, Ale-Agha N, Krutmann J, Klotz LO (2010)** Role of HuR and p38-MAP kinase in ultraviolet B-induced posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 expression in the human keratinocyte cell line HaCaT. *J Biol Chem.* 2010 Feb 5;285(6):3896-904.

**Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanché H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A (2009)** Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 24;106(8):2700-5.

**Frescas D, Valenti L, Accili D (2005)** Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem.* 2005 May 27;280(21):20589-95.

**Fridovich L (1978)** The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978 Sep 8;201(4359):875-80

**Fröjdö S, Durand C, Molin L, Carey AL, El-Osta A, Kingwell BA, Febbraio MA, Solari F, Vidal H, Pirola L (2011)** Phosphoinositide 3-kinase as a novel functional target for the regulation of the insulin signaling pathway by SIRT1. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Mar 30;335(2):166-76. Epub 2011 Jan 15.

**Fuchs J, Packer L (1989)** Investigations of anthralin free radicals in model systems and in skin of hairless mice. *J Invest Dermatol.* 1989 May;92(5):677-82.

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

**Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N (2000)** Identification of the differential distribution patterns of mRNA and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J.* 2000 Jul 15;349(Pt 2):629-34.

**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.* 2004 Aug 13;279(33):34741-9.

**Goldstein BJ, Bittner-Kowalczyk A, White MF, Harbeck M (2000)** Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J Biol Chem.* 2000 Feb 11;275(6):4283-9.

**Greer EL, Brunet A (2005)** FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* 2005 Nov 14;24(50):7410-25.

**Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T (1999)** Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem.* 1999 Jun 11;274(24):17184-92.

**Haigis MC, Guarente LP (2006)** Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* 2006 Nov 1;20(21):2913-21

**Hayflick L, Morhead PS (1961)** The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961 Dec;25:585-621.

**Hosaka T, Biggs III WH, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK, Arden KC (2004)** Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2975-80

**Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003)** Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 2003 Sep 11;425(6954):191-6.

**Huang H, Tindall DJ (2007)** Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci.* 2007 Aug 1;120(Pt 15):2479-87.

**Hwangbo DS, Gershman B, Tu MP, Palmer M, Tatar M (2005)** Drosophila dFOXO controls lifespan and regulates insulin signaling in brain and fat body. *Nature* 2004 Jun 3;429(6991):562-6.

**Jung EG, Moll I (2005)** *Dermatologie* Vol. 6, Thieme. 3-4

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

**Kenner KA, Anyanwu E, Olefsky JM, Kusari J (1996)** Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling. *J Biol Chem.* 1996 Aug 16;271(33):19810-6.

**Kim AL, Labasai JM, Zhu Y, Tang X, McClure K, Gabel CA (2005)** Role of p38 MAPK in UVB-induced inflammatory responses in the skin of SKH-1 hairless mice. *J Invest Dermatol.* 2005 Jun;124(6):1318-25.

**Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Yamasaki Y (2005)** Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Aug;37(8):1595-608.

**Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang G (1993)** A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993 Dec 2;366(6454):461-4.

**Kleindorp R, Flachsbart F, Puca AA, Malovini A, Schreiber S, Nebel A (2011)** Candidate gene study of FOXO1, FOXO4, and FOXO6 reveals no association with human longevity in Germans. *Aging Cell.* 2011 Aug;10(4):622-8.

**Laemmli, UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

**Lee RY, Hench J, Ruvkun G (2001)** Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the *daf-2* insulin-like signaling pathway. *Curr Biol.* 2001 Dec 11;11(24):1950-7.

**Leslie NR (2006)** The redox regulation of PI 3-kinase-dependent signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Sep-Oct;8(9-10):1765-74.

**Lopez-Torres M, Shindo Y, Packer L (1994)** Effect of age on antioxidants and molecular markers of oxidative damage in murine epidermis and dermis. *J Invest Dermatol.* 1994 Apr;102(4):476-80.

**Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall RJ (1951)** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.

**Mahns A, Wolber R, Stäb F, Klotz LO, Sies H (2004)** Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 Mar;3(3):257-62.

**Moné MJ, Volker M, Nikaido O, Mullenders LHF, van Zeeland AA, Verschure PJ, Manders EMM, van Driel R (2001)** Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition. *EMBO Rep.* 2001 Nov;2(11):1013-7.

**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 U S A.* 2003 Sep 30;100(20):11285-90.

**Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A (2005)** Acetylation of FoxO1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 9;102(32):11278-83.

**Maziere C, Floret S, Santus R, Morliere P, Marcheux V, Maziere JC (2003)** Impairment of the EGF signaling pathway by the oxidative stress generated with UVA. *Free Radic Biol Med.* 2003 Mar 15;34(6):629-36.

**McCay CM, Crowell, M., Maynard, L. (1935)** The effect of retarded growth upon the length of life and upon ultimate size. *Nutrition.* 1935 May-Jun;5(3):155-71; discussion 172.

**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*. 2000 Apr 13;404(6779):782-7.

**Meredith P, Riesz J (2004)** Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem Photobiol*. 2004 Feb;79(2):211-6.

**Michan S, Sinclair D (2007)** Sirtuins in mammals: insight into their biological function. *Biochem J*. 2007 May 15;404(1):1-13.

**Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I (2005)** Evolutionarily Conserved and Nonconserved Cellular Localizations and Functions of Human SIRT Proteins. *Mol Biol Cell*. 2005 Oct;16(10):4623-35.

**Moné MJ, Volker M, Nikaido O, Mullenders LH, van Zeeland AA, Verschure PJ, Manders EM, van Driel R (2001)** Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition. *EMBO Rep*. 2001 Nov;2(11):1013-7.

**Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L (2004)** Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*. 2004 Feb 20;116(4):551-63.

**Murata H, Ihara Y, Nakamura H, Yodoi J, Sumikawa K, Kondo T (2003)** Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J J Biol Chem*. 2003 Dec 12;278(50):50226-33.

**Nishi J, Ogura R, Sugiyama M, Hidaka T, Kohno M (1991)** Involvement of Active Oxygen in Lipid Peroxide Radical Reaction of Epidermal Homogenate Following Ultraviolet Light Exposure. *J Invest Dermatol*. 1991 Jul;97(1):115-9.

**North BJ, Verdin E (2007)** Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PLoS One*. 2007 Aug 29;2(8):e784.

**Obsilova V, Vecer J, Herman P, et al. (2005)** 14-3-3 protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry*. 2005 Aug 30;44(34):11608-17.

**Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA (2005)** JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 22;102(12):4494-9.

**Olmos Y, Valle I, Borniquel S, Tierrez A, Soria E, Lamas S, Monsalve M (2009)** Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1alpha in the induction of oxidative stress genes. *J Biol Chem*. 2009 May 22;284(21):14476-84.

**Olmos Y, Brosens JJ, Lam EW (2010)** Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer. *Drug Resist Updat*. 2011 Feb;14(1):35-44.

**Ozes, ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB (1999)** NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999 Sep 2;401(6748):82-5.

**Plas DR, Thompson CB (2003)** Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem*. 2003 Apr 4;278(14):12361-6.

**Pearce D (2003)** SGK1 regulation of epithelial sodium transport. *Cell Physiol Biochem*. 2003;13(1):13-20.

**Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991)** Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991 Aug 1;288(2):481-7.

**Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991a)** Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*. 1991 Mar 5;266(7):4244-50

**Ravichandran LV, Chen H, Li Y, Quon MJ (2001)** Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol Endocrinol*. 2001 Oct;15(10):1768-80.

**Rhein LD, Fluhr JW (2010)** *Aging Skin: Current and Further Therapeutic Strategies*. Allured Business Media

**Rockx DAP, Mason R, van Hoffen A, Barton MC, Citterio E, Bregman DB, van Zeeland AA, Vrieling H, Mullenders LHF (2000)** UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 12;97(19):10503-8.

**Rosenwald IB, Rhoads DB, Callanan LD, Isselbacher KJ, Schmidt EV (1993)** Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jul 1;90(13):6175-8.

**Roy SK, Chen Q, Fu J, Shankar S, Srivastava RK (2011)** Resveratrol Inhibits Growth of Orthotopic Pancreatic Tumors through Activation of FOXO Transcription Factors. *PLoS One*. 2011;6(9):e25166.

**Rudd MD, Johnston DA, Kazianis S, Butler AP (2003)** Cloning and analysis of a FoxO transcription factor from *Xiphophorus*. *Gene*. 2003 Jan 2;302(1-2):31-41

**Sauve AA, Wolfberger C, Schramm VL, Boeke JD (2006):** The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:435-65.

**Schieke SM, von Montfort C, Buchczyk DP, Timmer A, Grether-Beck S, Krutmann J, Holbrook NJ, Klotz LO (2004)** Singlet oxygen-induced attenuation of growth factor signaling: possible role of ceramides. *Free Radic Res*. 2004 Jul;38(7):729-37.

**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*. 2000 Nov 17;275(46):36324-33.

**Serri F, Bartoli GM, Seccia A, Borrello S, Galeotti T (1979)** Age-related mitochondrial lipoperoxidation in human skin. *J Invest Dermatol*. 1979 Jul;73(1):123-5.

**Siegel TN, Hekstra Cross GA (2008)** Analysis of the *Trypanosoma brucei* cell cycle by quantitative DAPI imaging. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Aug;160(2):171-4.

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

**Sies H (1997)** Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997 Mar;82(2):291-5.

**Smith GR, Shanley DP (2010)** Modelling the Response of FOXO Transcription Factors to Multiple Post-Translational Modifications Made by Ageing-Related Signalling Pathways. *PLoS One.* 2010 Jun 14;5(6):e11092.

**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.* 2008 Dec;48(6):1998-2006.

**Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998)** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* 1998 Oct 2;95(1):29-39.

**Stocker H, Andjelkovic M, Oldham S, Laffargue M, Wymann MP, Hemmings BA, Hafen E (2002)** Living with lethal PIP3 levels: viability of flies lacking PTEN restored by a PH domain mutation in Akt/PKB. *Science.* 2002 Mar 15;295(5562):2088-91.

**St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM (2006)** Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 2006 Oct 20;127(2):397-408.

**Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y (2005)** JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J Cell Biol.* 2005 Jul 18;170(2):295-304.

**Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y (2007)** Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem.* 2007 Mar 2;282(9):6823-32.

**Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegue E, DePinho RA, Gilliland DG (2007)** FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell.* 2007 Jan 26;128(2):325-3.

**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*. 2002 Apr 19;296(5567):530-4.

**Tsai WC, Bhattacharyya N, Han LY et al. (2003)** Insulin inhibition of transcription stimulated by the forkhead protein FoxO1 is not solely due to nuclear exclusion. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5615-22.

**Tyrrell RM (1991)** UVA (320–380 nm) radiation as an oxidative stress, In: Sies, H., ed. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants* (Academic Press, San Diego), pp. 57–83.

**Trautinger F (2001)** Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol*. 2001 Oct;26(7):573-7.

**Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M (2005)** PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2005 Jun 1;66(3):562-73. Epub 2005 Feb 25.

**van der Armando H, Burgering BM (2007)** Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jun;8(6):440-50.

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

**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*. 2006 Oct;8(10):1064-73.

**Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR (1999)** Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1999 Apr;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*. 2006 Oct 15;454(2):107-13.

**Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC (1999)** Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*. 1999 Apr 9;284(5412):339-43.

**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*. 2000 May 12;275(19):14624-31.

**Wang W, Furneaux H, Cheng H, Caldwell MC, Hutter D, Liu Y, Holbrook N, Gorospe M (2006)** HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol*. 2000 Feb;20(3):760-9.

**Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H (1989)** The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell*. 1989 May 19;57(4):645-58.

**Weindruch, R, Walford, R (1988)** The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield, IL: Thomas.

**Wilk A, Urbanska K, Yang S, Wang JY, Amini S, Del Valle L, Peruzzi F, Meggs L, Reiss K (2011)** Insulin-Like Growth Factor-I–Forkhead Box O Transcription Factor 3a Counteracts High Glucose/Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Mediated Neuronal Damage: Implications for Human Immunodeficiency Virus Encephalitis. *J Neurosci Res*. 2011 Feb;89(2):183-98.

**Willcox BJ, Donlon TA, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, Masaki KH, Willcox DC, Rodriguez B, Curb JD (2008)** FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 September 16; 105(37): 13987–13992.

**Woo JH, Lim JH, Kim YH, Suh SI, Min DS, Chang JS, Lee YH, Park JW, Kwon TK (2004)** Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction. *Oncogene*. 2004 Mar 11;23(10):1845-53.

**Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y (1993)** Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J Biol Chem*. 1993 Dec 5;268(34):25846-56.

**Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, Schenk S, Sonoda N, Babendure JL, Lu JC, Smith JJ, Jirousek MR, Olefsky JM (2009)** SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol.* 2009 Mar;29(5):1363-74.

**Zhao X, Gan L, Pan H, Kan D, Majeski M, Adam SA, Unterman TG (2004)** Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *Biochem J.* 2004 Mar 15;378(Pt 3):839-49.

**Zheng WH, Kar S, Quirion R (2000)** Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHRL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. *J Biol Chem.* 2000 Dec 15;275(50):39152-8.

## Publikationen und Tagungsbeiträge

### Publikationen

Knobloch J, Reimann K, Klotz LO, Rütter U: Thalidomide Resistance Is Based on the Capacity of the Glutathione-Dependent Antioxidant Defense. Mol Pharm. 2008 Nov-Dec;5(6):1138-44.

Eckers A, Reimann K, Klotz LO: Nickel and copper ion-induced stress signaling in human hepatoma cells: Analysis of phosphoinositide 3'-kinase/Akt signaling. Biometals. 2009 Apr;22(2):307-16.

Fernau NS, Fugmann D, Leyendecker M, Reimann K, Grether-Beck S, Galban S, Ale-Agha N, Krutmann J, Klotz LO: Role of HuR and p38-MAP kinase in ultraviolet B-induced posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 expression in the human keratinocyte cell line HaCaT. J Biol Chem. 2010 Feb 5;285(6):3896-904.

### Tagungsbeiträge

13<sup>th</sup> Joint Meeting Signal Transduction - Receptors, Mediators and Genes, Weimar, October 29 - 31, 2009 - Poster presentation: **FoxO isoform expression patterns in human skin fibroblasts undergoing replicative or stress-induced senescence.**

Society for Free Radical Research (SFRR), Rome, August 26 - 29, 2009 - Poster presentation: **FoxO isoform expression patterns in human skin fibroblasts undergoing replicative or stress-induced senescence.**

15<sup>th</sup> International Congress on Photobiology, Düsseldorf, June 18 - 23, 2009: - Poster presentation: **FoxO isoform expression patterns in human skin fibroblasts undergoing replicative or stress-induced senescence.**

Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, March 10 - 12, 2009 - Oral presentation: **Thalidomid-Resistenz basiert auf der glutathionabhängigen antioxidativen Abwehr.**

SFRR-Europe Free Radical Summer School 2008, Spetses, Greece, August 30 - September 5, 2008 - Poster presentation: **The molecular basis of thalidomide resistance in murine embryonic cells.** Participation and travel expenses are financed by a grant from the FEBS Youth Travel Fund (YTF).

SFRR-Europe Meeting 2008, Free Radicals und Nutrition: Basic Mechanisms and Clinical Application, Berlin, July 5 - 9, 2008 - Poster presentation: **The molecular basis of thalidomide resistance in murine embryonic cells.**

4<sup>th</sup> Annual Meeting of the GRK 1033, Schloss Mickeln, Düsseldorf, November 22 - 23, 2007 - Oral presentation: **Stressinduzierte Seneszenz.**

Tagung „Tissue aging: from molecular biology to clinical perspectives“, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, September 28 - 30, 2007 - Oral presentation: **Modulation of senescence-related signaling in mammalian cells and C. elegans by stressful stimuli.**

## Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Johannes H. Hegemann danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Dr. Thomas Blatt und Frau Dr. Gesa-Meike Muhr bedanke ich mich für die wissenschaftliche Unterstützung und herzliche Aufnahme bei der Firma Beiersdorf in Hamburg.

Frau Dr. Anna Eckers (*my room mate*) gilt mein besonderer Dank für ihre inspirierende Diskussionen zum Thema der FoxO-Transkriptionsfaktoren, kreative Zusammenarbeit und tierische Unterstützung in turbulenten Zeiten.

Dr. André Bartholome möchte ich für die EGCG-Aufgüsse, sprudelnden Spurenelementen und seinem positiven Einfluss, sowohl im Büro als auch an der Laborbank danken.

Ich bedanke mich bei allen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der AG Klotz und der gesamten Altersforschung am IUF in Düsseldorf, die mich in den ersten Jahren begleitet und aufgefangen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Jörn-Hendrik Reuter für sein kämpferisches Engagement und Vertrauen.

Allen Mitgliedern von Skin Aging danke ich für das angenehme Arbeitsklima, dass sie mich in so kurzer Zeit in ihrer Gemeinschaft aufgenommen haben und stets hinter mir standen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Anke von Malsen und Marlis Riedel bedanken, dass sie mich stets motiviert und weitergezogen haben, Maria Reichenbach, die mit mir Rü-

cken an Rücken gearbeitet hat, und Tina Hamann, die mir neue objektive Blickwinkel aufgezeigt hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund René. Ich danke ihm für seine liebevolle Geduld und die Bereitschaft mit mir nach Hamburg zu gehen.

Ich danke meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihre Liebe.

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

Düsseldorf, den

---

(Kerstin Reimann)