

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

Differentielle Genexpression durch den pro-diabetischen Transkriptionsfaktor FoxO1a (FKHR)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Peter Korsten

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Priv.-Doz. Dr. Barthel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Al-Hasani

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Leyendecker M*, **Korsten P***, Reinehr R, Speckmann B, Schmoll D, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A, Klotz LO. Ceruloplasmin Expression in Rat Liver Cells is Attenuated by Insulin: Role of FoxO Transcription Factors. **Horm Metab Res.** 2011 Feb 17

* gleichwertiger Beitrag beider Autoren

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Physiologie und Pathophysiologie des Typ 2-Diabetes mellitus	1
1.1.1	Die Signaltransduktion des Insulins unter physiologischen Bedingungen.....	1
1.1.2	Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz	3
1.2	Forkhead Box Transkriptionsfaktoren	6
1.3	Bekannte Funktionen von FoxO-Proteinen	8
1.4	Rolle von FoxO Proteinen bei oxidativem Stress.....	9
1.4.1	Reaktive Sauerstoffspezies als gemeinsamer Mechanismus pathophysiologischer Vorgänge beim Diabetes mellitus.....	9
1.4.2	Bedeutung von oxidativem Stress bei anderen Krankheiten – Beispiel Alzheimer Demenz.....	10
1.5	In der Arbeit näher zu charakterisierende Zielgene.....	11
1.6	Hintergrund zu verwendeten molekularbiologischen Methoden.....	12
1.6.1	DNA-Mikroarray	12
1.6.2	Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR)	12
1.7	Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	14
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Zellbiologische Methoden	16
2.1.1	Zelllinien	16
2.1.2	Zellkulturmedien.....	17
2.1.2	Subkultivierung.....	18
2.1.3	Zellen einfrieren / auftauen	19
2.1.4	Zellen selektionieren	19
2.1.5	Zellstimulation.....	20
2.2	Proteinchemische Methoden	20
2.2.1	Promoteraktivitätsbestimmung – Luziferase-Assay	20
2.2.2	Proteinbestimmung – BCA-Assay.....	21
2.3	Molekularbiologische Methoden	23

Inhaltsverzeichnis

2.3.1	Gesamt-RNA-Isolierung.....	23
2.3.2	Kontrolle der mRNA-Qualität.....	25
2.3.3	DNA-Mikroarray.....	28
2.3.4	cDNA-Synthese.....	28
2.3.5	Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR).....	29
2.4	Statistische Auswertung.....	31
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Konditionelle Aktivierbarkeit des FoxO1a-Konstrukts.....	33
3.2	Normierung der FoxO1a-Aktivität auf die Proteinmenge.....	34
3.3	Mikroarray.....	36
3.4	Bestimmung der Genexpression der Kandidatengene.....	38
3.4.1	Glukose-6-Phosphatase.....	38
3.4.2	Coeruloplasmin.....	41
3.4.3	Uridinphosphorylase 1.....	43
3.4.4	Proteinphosphatase 1, regulatorische Untereinheit.....	45
3.4.5	Serumparaaxonase 1 (Pon1).....	47
4	Diskussion.....	49
4.1	Methodische Anmerkungen.....	49
4.2	Bewertung der Ergebnisse.....	50
4.2.1	Glukose-6-Phosphatase (G6Pase).....	50
4.2.2	Coeruloplasmin (CP).....	51
4.2.3	Uridinphosphorylase 1 (Upp1).....	51
4.2.4	Proteinphosphatase 1, regulatorische Untereinheit 6 (PP1R6).....	52
4.2.5	Serumparaaxonase 1 (Pon1).....	53
5	Zusammenfassung der vorgelegten Daten und deren Interpretation.....	55
6	Anhang.....	57
7	Literaturverzeichnis.....	59
	Danksagung.....	62
	Lebenslauf.....	63
	Eidesstattliche Versicherung.....	66

Abkürzungsverzeichnis

A

AD	–	Alzheimer Demenz
ADA	–	American Diabetes Association
ADP	–	Adenosindiphosphat
AGE	–	<i>advanced glycation endproducts</i>
ANOVA	–	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APP	–	<i>amyloid precursor protein</i> , Amyloid Vorläuferprotein
AR	–	Adiponektinrezeptor
ATP	–	Adenosintriphosphat

B

BCA	–	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BSA	–	bovines Serumalbumin

C

cDNA	–	<i>complementary DNA</i>
CK	–	Caseinkinase
CP	–	Coeruloplasmin
CYP	–	Cytochrom P

D

DAG	–	Diacylglycerol
DDG	–	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DFS	–	Diabetisches Fußsyndrom
DM	–	Diabetes mellitus
DMEM	–	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	–	Dimethylsulfoxid
DN	–	Diabetische Nephropathie
DNA	–	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	–	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DYRK 1	–	<i>dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1</i>

E

EDTA	–	Ethylendiamintetraazetat
ER	–	<i>estrogen receptor</i> , Östrogenrezeptor
EtOH	–	Ethanol

F

5-FU	–	5-Fluorouracil
FCS	–	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FFS	–	freie Fettsäure
FKHR	–	<i>forkhead in rhabdomyosarcoma</i>
FoxO1a	–	<i>forkhead box "Other" 1a</i>
FRET	–	Fluoreszenz- Resonanzenergietransfer
FS	–	Fettsäure

G

G6P	–	Glukose-6-Phosphat
G6Pase	–	Glukose-6-Phosphatase
GAPDH	–	Glyzeroaldehydphosphat- Dehydrogenase
GLUT	–	Glukosetransportprotein
GS	–	Glykogensynthase
GSK	–	Glykogensynthasekinase

H

HDL	–	<i>high density lipoprotein</i>
Hepes	–	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl) ethansulfonsäure
Hsp	–	<i>heat shock protein</i> , Hitzeschockprotein

I

IGT	–	<i>impaired glucose tolerance</i> , gestörte Glukosetoleranz
Ins	–	Insulin
IR	–	Insulinrezeptor
IRes	–	Insulinresistenz
IRS	–	Insulinrezeptorsubstrat

J

JNK	–	c-Jun N-terminale Kinase
-----	---	--------------------------

K

KHK	–	Koronare Herzkrankheit
-----	---	------------------------

L

LAR	–	Luziferaseassay Reagenz
LDL	–	<i>low density lipoprotein</i>

M

MnSOD	–	<i>manganese superoxide dismutase</i> , Mangan Superoxiddismutase
MODY	–	<i>Maturity onset diabetes of the young</i>
MOPS	–	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	–	<i>messenger RNA</i> , "Boten-RNA"

N

NAFLD	–	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i> , Nicht-alkoholische Fettleber
NO	–	<i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid

P

PAI	–	<i>plasminogen activator inhibitor</i>
pAVK	–	periphere arterielle Verschlusskrankheit

Abkürzungsverzeichnis

PBS	–	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung	PDK	–	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PEPCK	–	Phosphoenolpyruvat- Carboxykinase	PDX-1	–	<i>pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PI 3-K	–	Phosphatidylinositol 3-Kinase	SFM	–	Serumfreies Medium
PK (B, C)	–	Proteinkinase (B, C)	SeP	–	Selenoprotein P
PLB	–	<i>passive lysis buffer</i> , passiver Lysepuffer	SGK	–	<i>serum- and glucocorticoid inducible kinase</i>
Pon	–	Serumparaoxonase	T		
PP1	–	Proteinphosphatase 1	Taq	–	<i>Thermus aquaticus</i>
PTEN	–	Phosphatase und Tensin Homolog	TGF	–	<i>Transforming growth factor</i>
PTP	–	Proteintyrosinphosphatase	TNF	–	Tumornekrosefaktor
R			tRNA	–	Transfer-RNA
RBP 4	–	<i>retinol binding protein 4</i> , Retinol- bindendes Protein 4	Tx	–	4-Hydroxytamoxifen
RLU	–	<i>relative light unit</i> , relative Lichteinheit	U		
RNA	–	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure	Upp	–	Uridinphosphorylase
ROS	–	<i>reactive oxygen species</i> , reactive Sauerstoffspezies	UV	–	ultraviolett
rRNA	–	ribosomale RNA	V		
RT	–	reverse Transkription	V	–	Volt
RTQ-PCR	–	real-time quantitative PCR	Vaspin	–	<i>visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor</i>
S			W		
SD	–	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung	WHO	–	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
SEM	–	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler der Mittelwerte	Wnt	–	<i>wingless proteins</i>

1 Einleitung

1.1 Physiologie und Pathophysiologie des Typ 2-Diabetes mellitus

1.1.1 Die Signaltransduktion des Insulins unter physiologischen Bedingungen

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) spielt bei der Glukose-Homöostase eine besondere Rolle, in dem sie als Reaktion auf ein vermehrtes Angebot an Glukose und anderen Nahrungsbestandteilen Insulin zu produzieren vermag. Dies geschieht in einem bestimmten Zelltyp des Pankreas, den Beta-Zellen. Glukose ist der wichtigste Regulator der Insulinsekretion, obwohl auch andere Nährstoffe und Hormone die Freisetzung von Insulin beeinflussen können. Durch Aufnahme von Glukose über so genannte GLUT2-Transporter in die Beta-Zellen steigt der Gradient des Energiehaushalts in Form von bei der Glykolyse vermehrt produziertem Adenosintriphosphat (ATP) an. Dies wird ausgedrückt durch das Verhältnis von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP): ATP/ADP. Steigt diese Ratio an, kommt es zum Verschluss von Kaliumkanälen, folgender Depolarisierung (Änderung der Spannung über der Zellmembran) und es öffnen sich spannungsabhängig regulierte Kalzium-Kanäle. Die nun gesteigerte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt zur Aktivierung von Proteinkinasen. Diese interagieren mit dem Mikrotubulus-Apparat, die zur Exozytose insulinhaltiger Granula beitragen. Der genannte Mechanismus führt gleichzeitig zu negativer Rückkopplung des Signals durch Wiedereröffnung der oben erwähnten Kalium-Kanäle und Repolarisation. Vor einigen Jahren wurden jedoch auch von diesem Mechanismus unabhängige Signalwege beschrieben, die durch Entstehung intermediärer Stoffwechselprodukte aktiviert werden und zur Exozytose insulinhaltiger Granula führen (1-2). Im Folgenden werden die periphere Wirkung des Insulins und die weitere Insulinsignalkaskade am Beispiel des Skelettmuskels bzw. Fettgewebes näher erläutert.

Das freigesetzte Insulin gelangt über die Blutgefäße an seine Zielorgane und bindet dort an den membranständigen Insulinrezeptor. Der Insulinrezeptor (IR) besteht aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten. Durch die Bindung wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, was zunächst dazu führt, dass der Insulinrezeptor sich selbst phosphoryliert. Diesen Vorgang bezeichnet man als Autophosphorylierung des Insulinrezeptors.

Einleitung

Dies aktiviert weitere an der Kaskade beteiligte Moleküle, z. B. das Insulinrezeptorsubstrat (IRS), was zur Interaktion mit der Phosphatidylinositol 3-Kinase¹ (PI3-K) und Ausbildung von Proteinkomplexen an der Zellmembran führt. Diese kann ihrerseits entweder Isoformen der Proteinkinase C (PKC) oder die Proteinkinase B (PKB) durch Phosphorylierung (vermittelt durch die *phosphoinositide-dependent kinase* (PDK)) aktivieren. Von der Proteinkinase B sind bis zum jetzigen Zeitpunkt drei Isoformen bekannt (α , β , γ). Phosphorylierung der Proteinkinase C führt zur Translokation des Glukose-Transporters 4 (GLUT-4) vom vesikulären Pool in die Plasmamembran, was eine weitere Aufnahme von Glukose in die Muskel- bzw. Fettzelle begünstigt. Stimulierung der PKB durch Insulin führt zu deren Translokation an die Plasmamembran und Interaktion mit weiteren Proteinen. Phosphorylierung und Aktivierung der PKB geschieht durch Kollokalisierung mit der PDK. Daraufhin löst sich die PKB von der Plasmamembran und beeinflusst im Zytoplasma Prozesse wie Glykogensynthese und Glukosetransport. Durch nur unvollständig bekannte Mechanismen wird ein Teil der aktivierten PKB in den Zellkern transloziert und steigert dort die Expression bestimmter Gene. Überexpressionsstudien mit PKB-Konstrukten konnten eine gesteigerte GLUT-4-vermittelte Glukoseaufnahme zeigen. Direkte Ziele der PKB sind die Glykogensynthasekinase 3 (GSK-3) und der Transkriptionsfaktor FoxO1a (FKHR) (3). Dieser gehört zur Familie der so genannten „forkhead box“ Transkriptionsfaktoren.

Das „O“ steht in diesem Fall für „Other“, was sich auf Unterschiede in der Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors bezieht. Genaue Erläuterungen dazu finden sich in **Abschnitt 1.2**. Phosphorylierung von FoxO1a führt zu dessen Inaktivierung und Ausschluss aus dem Zellkern. Zu den bislang bekannten Funktionen von FoxO1a gehören unter anderem die Regulierung der beiden Schlüsselenzyme der Glukoneogenese, Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) und Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) (4). Auf weitere wichtige Funktionen von FoxO1a wird in den folgenden Abschnitten noch näher eingegangen.

Die wesentlichen Schritte der Signaltransduktion des Insulins werden in **Abb. 1.1** zusammengefasst.

¹ Kinasen im Allgemeinen haben die Eigenschaft, ihre Zielmoleküle zu phosphorylieren. Dies sagt jedoch noch nichts über den biologischen Effekt aus. Hier kommt es darauf an, ob das Zielmolekül der Kinase in phosphoryliertem Zustand aktiviert oder inaktiviert vorliegt.

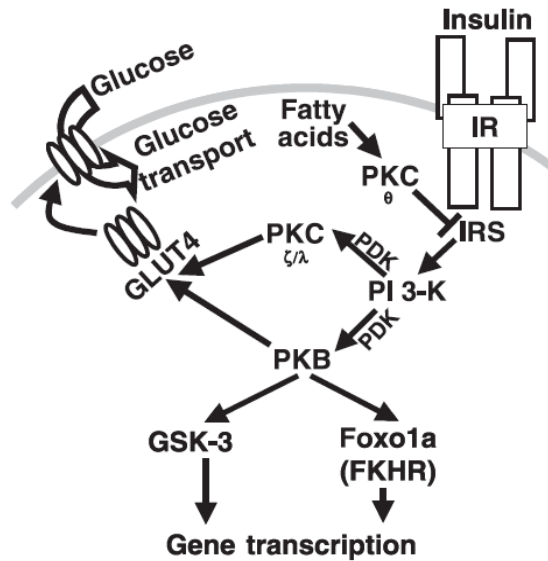


Abb. 1.1 Signalltransduktion des Insulinrezeptors (aus (3)). FoxO1a Forkhead box „Other“ Transkriptionsfaktor 1a, GLUT4 Glukose-Transporter 4, GSK-3 Glykogensynthase-Kinase-3, IR Insulinrezeptor, IRS Insulinrezeptorsubstrat, PDK Phosphoinositid-dependent kinase PI 3-K Phosphatidylinositol-3-Kinase, PKB Protein kinase B, PKC Protein kinase C

1.1.2 Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz

Der Typ-2-Diabetes ist eine multifaktorielle Erkrankung mit zu Grunde liegenden genetischen und umweltbedingten Faktoren, die zu Störungen in der Insulinsekretion, sowie zu einer Insulinresistenz führen. Hierunter versteht man die verminderte Wirkung von Insulin am Zielgewebe trotz ausreichend hoher Insulinspiegel im Blut. Dies führt zu erhöhten Blutglukosespiegeln, da einerseits die postprandiale Glukoseaufnahme in die Zellen des Muskel- und Fettgewebes vermindert ist, andererseits die Glukoseproduktion durch die Leber ungehemmt weiter stattfindet.

Im Wesentlichen sind Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe von der Insulinresistenz betroffen. Die Insulinresistenz wird zu Beginn der Erkrankung durch eine vermehrte Sekretion der pankreatischen Beta-Zellen zum Teil kompensiert (Phase der Hyperinsulinämie). Im weiteren Verlauf kann die kompensatorische Mehrsekretion nicht mehr aufrecht erhalten werden. Dieser Zustand entspricht zunächst einer gestörten Glukosetoleranz (*impaired glucose tolerance, IGT*), was sich klinisch dann vor allem als postprandiale Hyperglykämie bemerkbar machen kann, von den Patienten meistens jedoch lange unbemerkt bleibt.

Schreitet die Erkrankung fort, entwickelt sich ein so genannter *circulus vitiosus* bestehend aus (Nüchtern-)Hyperglykämie, verminderter Insulinsekretion und Insulinresistenz. Die exakten Mechanismen der pathophysiologischen Veränderungen, insbesondere des primär auslösenden Ereignisses, bleiben weiterhin ungeklärt, mittlerweile existiert jedoch ein besseres Verständnis der involvierten Signalwege und Moleküle, die zur Pathogenese des Diabetes mellitus beitragen.

Persönliche Verhaltensweisen sind in der Krankheitsentstehung ebenfalls von Bedeutung. Bewegungsmangel und eine fett- und kohlenhydratreiche Ernährung tragen zur Entwicklung des so genannten metabolischen Syndroms (Syndrom X) bei. Dieses besteht aus der Kombination von Fettleibigkeit (Adipositas), Bluthochdruck (arterieller Hypertonie), Fettstoffwechselstörungen (Dyslipidämien) und im Gefolge auftretender gestörter Glukosetoleranz bzw. manifestem Diabetes mellitus.

Auf molekularer Ebene kommt es dadurch zu zahlreichen, mittlerweile gut charakterisierten Veränderungen (3):

Durch Insulinmangel und –resistenz wird die Insulin-Signalkaskade via PI3-K und PKB nicht mehr ausreichend aktiviert. Dies führt zu Disinhibition von FoxO1a und der GSK-3 (Details zum Mechanismus finden sich in **Abschnitt 1.2**). In der Leber führt das zu einer gesteigerten Expression der FoxO1a-abhängig regulierten Glukoneogenese-Enzyme PEPCK und G6Pase. Insgesamt führt dies zu einer gesteigerten hepatischen Glukoseproduktion und verminderten Glukoseutilisation. **Abb. 1.2** gibt einen schematischen Überblick über die involvierten Mechanismen.

In neueren Publikationen ist gezeigt worden, dass neben den schon länger bekannten so genannten Adipokinen, d. h. im Fettgewebe gebildeten und von diesem freigesetzten Hormonen (Adiponektin, Leptin, Resistin und TNF-alpha), und freien Fettsäuren (FFA, *free fatty acids*), zudem die erst kürzlich entdeckten Adipokine „*retinol binding protein 4* (RBP 4)“ (5), „visfatin“ (6) und „vaspin“ (*visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor*) (7) auf den Insulinsignalweg und die Insulinresistenz Einfluss nehmen. Adiponektin wirkt über den Muskel-Typ Adiponektinrezeptor 1 (AR-1) und den Glukose-Transporter 4 (GLUT-4). Dies steigert Glukoseumsatz und Fettsäure(FA)-Oxidation in der Skelettmuskulatur. In der Leber wird die FA-Oxidation durch Aktivierung des Leber-Typ Adiponektinrezeptors 2 (AR-2) gesteigert.

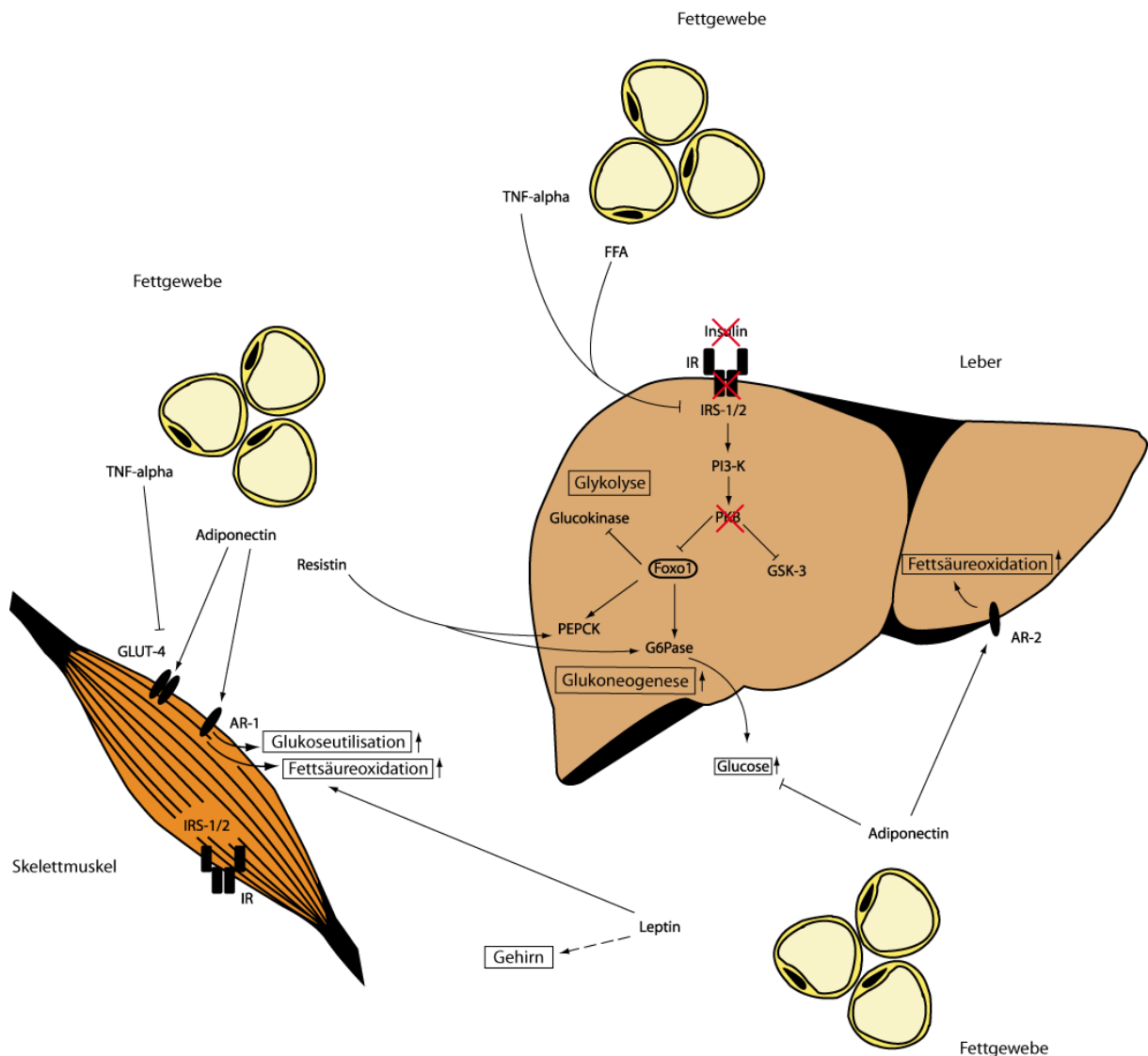


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen der Insulinresistenz. Erläuterungen siehe Text. AR-1 Adiponektinrezeptor 1 (Muskel-Typ), AR-2 Adiponektinrezeptor 2 (Leber-Typ), FoxO1a forkhead box „Other“ transcription factor 1a, FFA freie Fettsäuren (*free fatty acids*), G6Pase Glukose-6-Phosphatase, GLUT-4 Glukose-Transporter 4, GSK-3 Glykogensynthase-Kinase 3, IRS-1/2 Insulinrezeptorsubstrate 1 und 2, PDK Pyruvatdehydrogenase-Kinase, PEPCCK Phosphoenolcarboxy-Kinase, TNF-alpha Tumornekrosefaktor α .

Das pro-inflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) vermindert die GLUT-4 Expression in der Muskulatur und unterbricht, zusammen mit freien Fettsäuren (FFA), die Aktivierung der Insulinrezeptor-Substrate 1 und 2 (IRS-1/2). Die Rolle von Resistin beim Menschen ist unklar, in Tiermodellen wurde gezeigt, dass es die Expression von PEPCCK und G6Pase steigert. Leptin übt eine Vielzahl von endokrinen und energieregulierenden Funktionen hauptsächlich über den Hypothalamus aus (8). Ein peripherer Effekt ist die Steigerung der FA-Oxidation im Skelettmuskel. RBP 4 steigert die Expression der PEPCCK in der Leber und unterbricht den Insulin-Signalweg im Skelettmuskel via IRS-1/2 (5). Visfatin

aktiviert den Insulinrezeptor durch direkte Bindung am Rezeptor und scheint auch die hepatische Glukoseproduktion zu vermindern (6). Die genauen Wirkmechanismen der erst vor kurzem entdeckten Adipokine RBP 4, Visfatin und Vaspin sind noch nicht gänzlich geklärt, unterstreichen jedoch die Rolle des Fettgewebes als endokrines Organ.

Wie in **Abb. 1.2** dargestellt ist, spielt der Transkriptionsfaktor FoxO1a eine zentrale Rolle für die Regulation verschiedener, insulinabhängiger Signalwege in der Leber. Es folgt daher an dieser Stelle eine genauere Betrachtung der Transkriptionsfaktoren aus der *Forkhead Box* Familie.

1.2 Forkhead Box Transkriptionsfaktoren

Forkhead Box-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die alle eine spezielle, aus 100 Aminosäuren bestehende DNA-bindende Domäne enthalten. Die dreidimensionale Ultrastruktur zeigt das so genannte „winged helix“ oder „*Forkhead Box*“ Motiv (s. **Abbildung 1.3**). Die Klassifikation der *Forkhead*-Transkriptionsfaktoren beruht auf der Homologie, d. h. Übereinstimmung, mit dieser Sequenz (9-10).

Die *Forkhead Box* „Other“ (FoxO)-Proteine unterscheiden sich von den anderen Transkriptionsfaktoren dieses Typs dahingehend, dass deren DNA-bindende Domäne (die α -Helix 3) einen Einschub von 5 Aminosäuren enthält. Zudem zeigt die Konsensussequenz eine andersartige Abfolge von Basen, nämlich [(T/C)(G/A)AAACAA]. Dadurch wird eine präferentielle Interaktion mit bestimmten Zielsequenzen im Genom ermöglicht. Bis dato sind bei Säugetieren vier verschiedene *Forkhead Box* „Other“-Proteine beschrieben worden, deren Nomenklatur sich in den vergangenen Jahren geändert hat: FoxO1a (vormals FKHR), FoxO3a (vormals FKHR-L1), FoxO4 (vormals AFX) und FoxO6 (11).

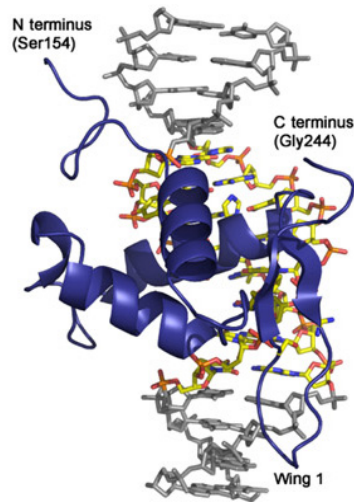


Abb. 1.3 Darstellung der dreidimensionalen Struktur von FoxO1a Das „winged helix“ Motiv besteht aus 3 α – Helices und 2 Schleifen (12).

Wie bereits in **Abschnitt 1.1** erwähnt, wird FoxO1a von der insulinabhängigen Aktivierung der PKB reguliert. Die PKB inhibiert FoxO1a durch Bindung an drei spezifischen Phosphorylierungs-Stellen (s. **Abb. 1.4**), Thr24, Ser256 und Ser319. Ser256 fungiert dabei als eine Art *gatekeeper*, was bedeutet, dass die Phosphorylierung von Ser256 notwendig ist für die folgende Phosphorylierung von Thr24 und Ser319 (13-14).

Die Inaktivierung von Ser319 wiederum ist notwendig für die schrittweise Inaktivierung von Ser322 und Ser325 durch die Casein Kinase (CK).

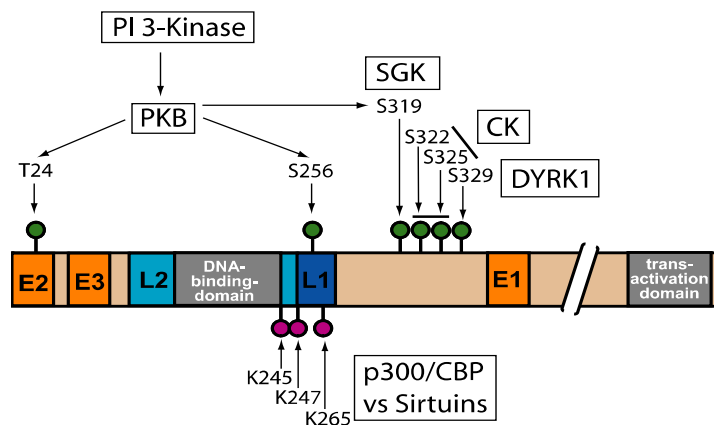


Abb. 1.4 Schematische Darstellung von Struktur und Bindungsstellen für regulatorische Proteine von FoxO-Proteinen (modifiziert nach (15)). Grün dargestellt mögliche Phosphorylierungsstellen der PKB und anderer Kinasen, wie der *serum- and glucocorticoid inducible kinase* (SGK) und der *dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1* (DYRK 1). Violett dargestellt mögliche Acetylierungsstellen in der c-terminalen Region der DNA-bindenden Domäne. FoxO Proteine enthalten zwei nukleäre Lokalisationssequenzen (L1, blau und L2, hellblau dargestellt) und drei nukleäre Exportsequenzen (E1, E2 und E3, orange).

1.3 Bekannte Funktionen von FoxO-Proteinen

Im Folgenden sollen wesentliche Aspekte zur Funktion der FoxO-Proteine kurz zusammengefasst werden:

Auf zellulärer Ebene können FoxO-Proteine die Zellproliferation hemmen, Apoptose (den programmierten Zelltod) induzieren und Resistenz gegenüber oxidativem Stress durch die Induktion bestimmter Enzyme vermitteln. Zu diesen Enzymen gehören die Mangan-Superoxid-Dismutase (16) und die Katalase (17). Kürzlich konnte festgestellt werden, dass FoxO1a zudem Selenoprotein P auf transkriptioneller Ebene induziert, ein wichtiges Transportprotein für Selen und damit Induktor für weitere selenhaltige, antioxidativ wirkende Enzyme wie Glutathionperoxidasen (18).

Weiterhin werden, außer den bereits genannten, andere metabolische Vorgänge durch FoxO1a reguliert. Im Fettgewebe wird die Induktion von Apolipoprotein CIII gefördert, was zu einer Hypertriglyceridämie bei Zuständen von Insulinresistenz beitragen könnte. Im Pankreas wird die Funktion der Beta-Zellen gestört durch Hemmung des *pancreatic duodenal homeobox-1* Gens (PDX-1), das wichtig für die Differenzierung der Beta-Zellen ist.

In der Muskulatur können FoxO-Proteine die Differenzierung induzieren, sowie im Fastenzustand von der Kohlenhydratutilisation zum vermehrten Umsatz von Fettsäuren führen. Dies geschieht durch die Induktion der Pyruvatdehydrogenasekinase 4 (PDK 4) und der Lipoproteinlipase.

In komplexen Organismen wie *Caenorhabditis elegans*, dem Fadenwurm, können FoxO-Proteine durch Induktion bestimmter Gene Alterungsprozesse beeinflussen. Bei Säugetieren konnten durch Versuche an transgenen Mäusen zusammenfassend pro-diabetische Funktionen aufgezeigt werden (15).

Einige der Funktionen von FoxO1a im Stoffwechsel der Leber sind schon in kurz in **Abschnitt 11** erläutert worden. Eine herausragende Bedeutung hat FoxO1a für die hepatische Glukoneogenese, d. h. der Produktion von Glukose aus Vorläufersubstraten wie Glyzerol, Laktat und der Aminosäure Alanin. Neben der Induktion der Schlüsselenzyme der Glukoneogenese (PEPCK und G6Pase) trägt FoxO1a auch zur vermehrten Aufnahme von Substraten für die Glukoneogenese bei, zum Beispiel durch die Induktion der Expression von Aquaporin 9, dem Transporter für Glyzerol in der Leber (19).

1.4 Rolle von FoxO Proteinen bei oxidativem Stress

Als reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) werden alle schädlichen Formen des Sauerstoffes bezeichnet, umgangssprachlich allgemein als „freie Radikale“ bekannt. Zu ihnen gehören einerseits, chemisch genauer, freie Radikale wie das Hyperoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ($OH\cdot$), das Peroxyl-Radikal ($ROO\cdot$) und das Alkoxy-Radikal ($RO\cdot$). Andererseits gehören dazu so genannte stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroperoxid ($ROOH$), Ozon (O_3), sowie das Hypochlorit-Anion (OCl^-) und angeregte Sauerstoffmoleküle (Singulett-Sauerstoff 1O_2).

1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies als gemeinsamer Mechanismus pathophysiologischer Vorgänge beim Diabetes mellitus

Reaktive Sauerstoffspezies sind maßgeblich an der Entwicklung diabetischer Komplikationen und Folgeerkrankungen beteiligt. Dies geschieht prinzipiell durch vier verschiedene Mechanismen (Details, s. (20)): Über eine Sättigung der Proteine der mitochondrialen Elektronentransportkette durch vermehrten Anfall von Glukose kommt es zur gesteigerten Produktion von Hyperoxid: Hyperoxid kann durch Verminderung der Konzentration an Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) alle vier beteiligten Prozesse aktivieren (s. **Abb. 1.5**).

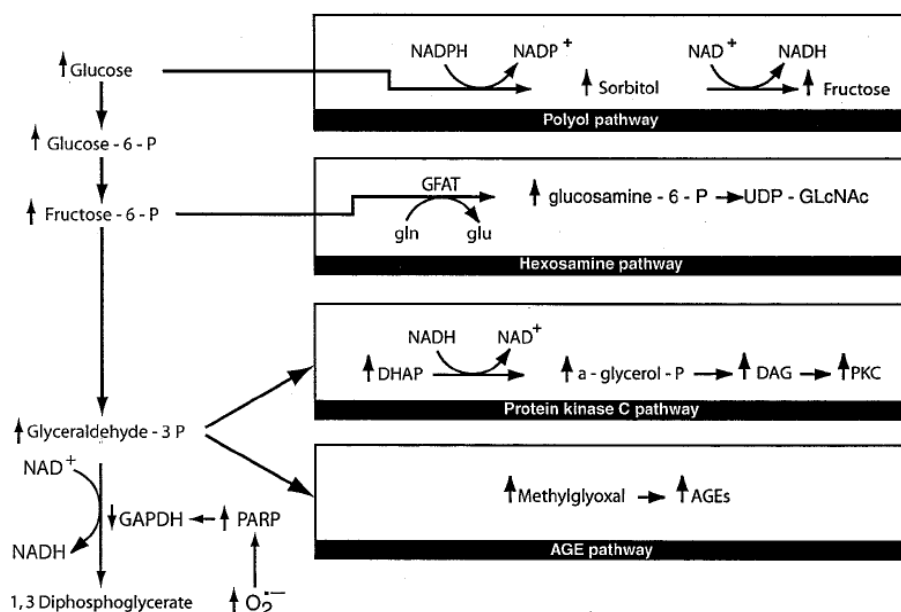


Abb. 1.5 Mitochondriale Überproduktion von Hyperoxid aktiviert durch Inhibition von GAPDH die vier Hauptsignalwege, die zu Zellschädigung durch Hyperglykämie führen (nach (20)). GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase

Die genannten Mechanismen sind jedoch nicht in allen Zellen aktiv, sondern nur in Zellen, die eine verminderte Eliminationskapazität für gesteigerte Glukosekonzentrationen haben. Dies sind vor allem retinale Endothelzellen, renale Mesangiumzellen sowie Neuronen und Schwann-Zellen der peripheren Nerven. Diese Zellselektivität erklärt auf molekularer Ebene, warum bestimmte Gewebe häufiger von diabetischen Komplikationen betroffen werden.

Bei der Entstehung von makrovaskulären Komplikationen sind ebenfalls ROS beteiligt, diese entstehen jedoch nicht durch die genannten Mechanismen, sondern durch den vermehrten Anfall freier Fettsäuren und Entstehung von ROS durch Fettsäureoxidation in den Mitochondrien.

1.4.2 Bedeutung von oxidativem Stress bei anderen Krankheiten – Beispiel Alzheimer Demenz

FoxO1a wird als mögliches verbindendes Element gemeinsamer Pathomechanismen bei der Insulinresistenz (IR) und der Alzheimer Demenz diskutiert (21). Ein Zusammenhang beider Krankheitszustände konnte durch epidemiologische Studien gezeigt werden (22-23). In der Pathogenese der Alzheimer Demenz spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle. Histologisch lassen sich bei Patienten mit AD vermehrt so genannte beta amyloid Plaques nachweisen. Diese entstehen durch Abspaltung aus einem Amyloid-Vorläuferprotein (*amyloid precursor protein*, APP). Die Spaltung erfordert die Aktivität zweier Sekretasen, beta und gamma. Die beta amyloid Plaques führen durch Induktion von Apoptose in bestimmten Zellen des Gehirns zu den neurodegenerativen Veränderungen bei der AD (24).

FoxO Proteine sind an der intrazellulären Reaktion von Neuronen gegenüber oxidativem Stress beteiligt. Sie induzieren antioxidativ wirkende Enzyme wie Mangan-Superoxiddismutase und Katalase (16-17), FoxO1a konnte zudem als Induktor von Selenoprotein P, einem Enzym mit antioxidativen Eigenschaften identifiziert werden (11). Die Funktion von FoxO1a ist dual und recht komplex: Zum Einen kann FoxO1a durch Aktivierung pro-diabetischer und pro-apoptotischer Gene negative Auswirkungen haben, bei oxidativem Stress jedoch auch die Transkription antioxidativ wirkender Enzyme bewirken. Dies scheint mit der Dauer der Aktivierung zusammen zu hängen.

1.5 In der Arbeit näher zu charakterisierende Zielgene

1. Coeruloplasmin (CP): CP kann bei Menschen mit Diabetes vermehrt im Serum nachgewiesen werden. Das Enzym hat antioxidative Eigenschaften, kann jedoch bei gewissen Zuständen auch als vaskulopathischer Faktor wirken. Als Akute-Phase-Protein wird es bei inflammatorischen Zuständen, also auch bei Typ-2-Diabetes mellitus, vermehrt exprimiert. Die Bedeutung der Regulation von CP durch FoxO1a ist nicht klar.
2. Uridinphosphorylase 1: Dass FoxO1a bei malignen Erkrankungen eine Rolle spielt, ist seit der Entdeckung bekannt. Vormalig hieß FoxO1a FKHR (Forkhead in *rhabdomyosarcoma*). Die Uridinphosphorylase 1 ist bei der Reaktion auf bestimmte Chemotherapeutika von Bedeutung und ist ein Enzym des *salvage pathways* der Pyrimidine. Die gezielte Beeinflussung von FoxO1a könnte möglicherweise einen Nutzen bringen in Hinblick auf das individuelle Ansprechen bestimmter Chemotherapeutika. Zudem wird über den Abbau von Uridin zu Uracil und Ribose-1-phosphat NADP⁺ gewonnen, welches als Kofaktor für antioxidativ wirkende Enzyme wie die Glutathionperoxidase zur Verfügung steht.
3. Proteinphosphatase 1, reg. Untereinheit (PP1R6): Die Funktion dieser Untereinheit ist nicht genau bekannt, interessant wären weitere Untersuchungen dahingehend, ob sie inhibierend oder aktivierend auf die PP1 wirkt, ob sie also protektiv wirken kann bei Diabetes mellitus oder die negativen (pro-diabetischen) Wirkungen im Glukosestoffwechsel noch verstärkt (25-26).
4. Serumparaaxonase 1 (Pon1): Die Serumparaaxonase 1 (Pon1) weist verschiedene Funktionen auf. Sie katalysiert beispielsweise die Hydrolyse und damit Inaktivierung von Organophosphaten wie Sarin und Soman, zweier Nervengifte. Weiterhin konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass das Enzym eine Rolle bei der Metabolisierung von Medikamenten spielt und eine protektive Wirkung gegenüber der Atherosklerose ausübt. Dies geschieht einerseits durch Verminderung der Lipidperoxidation in LDL-Lipoproteinen durch seine Phospholipase A2-Aktivität sowie durch die Hydrolyse (und damit Inaktivierung) von Homocysteinthiolacton, einem Risikofaktor bei der Entstehung der Atherosklerose (27-28).

1.6 Hintergrund zu verwendeten molekularbiologischen Methoden

1.6.1 DNA-Mikroarray

Ein DNA-Mikroarray, auch bekannt als „DNA-Chip“, ist eine in den neunziger Jahren entstandene Methode, um simultan die Expression einer großen Zahl von Genen zu analysieren.

Der Mikroarray besteht üblicherweise aus einem mikroskopischen Glasträger, kann jedoch auch aus einem Silikonchip oder einer Nylonmembran bestehen, auf dem DNA-Sequenzen in einer genau festgelegten Ordnung positioniert sind. Als Probenmaterial benötigt man die isolierte mRNA, die in cDNA (mittels reverser Transkription) umgeschrieben wird. Die cDNA wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf den DNA-Chip gebracht.

Da sich nur komplementäre DNA-Stränge an die auf dem Glasträger befindlichen Sequenzen binden (dieser Vorgang wird „Hybridisierung“ genannt), kann man feststellen, welche Gensequenzen in der Probe exprimiert werden.

Dies geschieht unter Verwendung eines Lasers mit rot-grün Farbspektrum, der die fluoreszenzmarkierten Proben anregt. Die Fluoreszenz wird von einer speziellen Kamera detektiert und die Daten, ausgedrückt als Rot-Grün-Fluoreszenz-Ratio, digital umgewandelt und an einen angeschlossenen Computer weitergeleitet.

Im Endergebnis erhält man somit die Relation der Expression einer Vielzahl von Genen, die entweder induziert oder reprimiert sein kann (29).

Mikroarray-Daten müssen aus verschiedenen Gründen mit einer anderen Methode bestätigt werden: Erstens gibt es qualitative Unterschiede zwischen den Arrays einzelner Anbieter, die Mikroarrays durchführen, zweitens kann es sich bei den erhaltenen Fluoreszenzsignalen auch um schwache Signale benachbarter Oligonukleotidsequenzen auf einem benachbarten *spot* des DNA-Chips handeln und drittens will man durch Anwendung eines weiteren Verfahrens unspezifische signalgebende Hybridisierungen ausschließen.

1.6.2 Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hat sich in den letzten Jahren zu einem der molekularbiologischen Standardverfahren entwickelt. Im Prinzip dient sie der Vervielfältigung bestimmter Abschnitte der DNA unter Verwendung eines Enzyms, das in der Lage ist, die DNA-Stränge zu verdoppeln, der so genannten Polymerase.

Die PCR beinhaltet 25 bis 50 Zyklen, wobei jeder Zyklus die folgenden Schritte umfasst:

1. Denaturierung (sog. *melting*): Zunächst wird die DNA auf Temperaturen von 94-96 °C erhitzt um die beiden Stränge voneinander zu trennen. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden Stränge verbinden, aufgebrochen.
2. Primerhybridisierung (sog. *annealing*): *Primer* sind kurze Oligoneukleotide, die notwendig sind, damit sich die Polymerase an die DNA anlagern kann. Sie legen den Startpunkt der DNA-Synthese fest. Beim so genannten *annealing* wird die Temperatur wieder gesenkt, so dass sich die *primer* an die DNA anlagern können. Das Temperaturoptimum hängt hierbei vom jeweiligen *primer* ab.
3. Elongation (Polymerisation oder Amplifikation): Nach Anlagerung der *primer* füllt die Polymerase die beiden Einzelstränge komplementär mit freien Nukleotiden zu DNA-Doppelsträngen auf.

Die Variante dieses Prinzips, die hier benutzt wurde, nennt sich *real-time* quantitative PCR („Echtzeit-PCR“, RTQ-PCR). Sie dient der in diesem Fall relativen Quantifizierung eines zu untersuchenden Gens im Vergleich zu einer endogenen Kontrolle, d. h. einem Gen, das konstant in der Zelle exprimiert wird. Anhand dieses Verhältnisses kann die Expression eines Gens unter verschiedenen Messbedingungen untersucht werden. Die Quantifizierung kann im Prinzip zu jedem Zeitpunkt vorgenommen werden („*real time*“).

Bei der RTQ-PCR wird eine sog. Sonde verwendet, an die am 5'-Ende ein Reporterfarbstoff (z.B. 6-FAM-phosphoramidit) kovalent und ein sog. *Quencher* am 3'-Ende gebunden sind. Die Taq-Polymerase (DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) löst mit ihrer 5'-Exonukleaseaktivität den Reporterfarbstoff ab, der dann ein Fluoreszenzsignal abgibt. Wird dagegen die intakte Sonde abgespalten, wird die Fluoreszenz durch den *Quencher* unterdrückt. Die Fluoreszenz entsteht durch Ausnutzung des so genannten FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). Die bei der RTQ-PCR entstehende Fluoreszenz ist proportional zur Menge des PCR-Produkts.

Üblicherweise werden als endogene Kontrolle (sog. *housekeeping gene*) entweder die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder β -Aktin verwendet. Die GAPDH ist ein Enzym des Pentosephosphat-Metabolismus und daher insulinabhängig. Da die Regulation von FoxO1a ebenfalls insulinabhängig reguliert wird (s. o.), wurde β -Aktin

verwendet, um eine mögliche Beeinflussung der Expression der endogenen Kontrolle zu vermeiden.

Als Ergebnis liefert die Anwendungssoftware des Geräts den Ct-Wert (*threshold cycle*). Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus während der PCR, in dem die gemessene Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über der gemessenen Fluoreszenz der „no template control“ liegt. In den darauffolgenden Zyklen der real-time PCR ist mit einem exponentiellem Anstieg der Fluoreszenz für amplifizierte Gene zu rechnen.

Über die Ct-Vergleichsrechnung („Comparative Ct Method“; $\Delta\Delta Ct$) lässt sich der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen berechnen. Mit der arithmetischen Formel, $f(x)=2^{-\Delta\Delta Ct}$, werden Ziel- und Referenzgen in ein relatives Verhältnis gesetzt, der sog. Ratio.

Dazu wird erst der ΔCt -Wert aus der Differenz von Ct-Wert des Zielgens und Ct-Wert des Referenzgens berechnet ($\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$).

Anschließend wird der $\Delta\Delta Ct$ -Wert berechnet. Hierbei wird vom ΔCt -Wert der zu untersuchenden Probe der ΔCt -Wert der unbehandelten Kontrollprobe subtrahiert ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Probe} - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$). Abschließend errechnet man mit $2^{-\Delta\Delta Ct}$ der zu untersuchenden Probe den relativen Expressionsunterschied zwischen zu untersuchender Probe und der unbehandelten Kontrolle aus: die Ratio (30).

1.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Der Transkriptionsfaktor FoxO1a übt, wie in den vorangehenden Abschnitten dargestellt, zahlreiche Funktionen in verschiedenen Bereichen des Stoffwechsels aus. Die Leber ist als Organ des Glukosestoffwechsels in der Pathogenese des Diabetes mellitus von zentraler Bedeutung. Durch Unterbrechung der Insulinsignalkaskade kommen die dargestellten FoxO1a-Wirkungen, wie die Steigerung der Glukoneogenese durch eine erhöhte Expression glukoneogenetischer Enzyme, erst zum Tragen.

Die regulatorische Funktion von FoxO1a ist komplex und noch unvollständig verstanden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Frage, welche weiteren Gene durch FoxO1a reguliert werden und inwieweit diese eine Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus (oder anderen Krankheitszuständen) spielen.

Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Interessanterweise induziert FoxO1a nicht nur im Metabolismus beteiligte Gene, sondern auch Gene, die zur Resistenz gegenüber oxidativem Stress beitragen können. Oxidativer Stress ist als gemeinsamer Pathomechanismus bei der Entstehung diabetischer Komplikationen beschrieben worden (20).

Ein tiefer gehendes Verständnis der von FoxO1a regulierten Gene könnte einerseits zur Aufklärung der Pathophysiologie des Diabetes mellitus beitragen, andererseits auch der Entwicklung neuer, wirksamer Medikamente zur Behandlung des Diabetes mellitus dienen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, durch FoxO1a regulierte Gene zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden für die Experimente verwendet:

1. H4IIEC3: bei diesen Zellen handelt es sich um hoch differenzierte und insulinresistente Hepatom-Zellen, die von Ratten der Spezies *Rattus norvegicus* stammen. Diese Zelllinie wurde in den Experimenten als Kontrolle verwendet.
2. FoxO1a-ER-CC (FKHR-ER-CC): bei diesen Zellen handelt es sich um H4IIEC3-Zellen, die ein durch 4-Hydroxytamoxifen (im Folgenden kurz: Tx) konditionell aktivierbares Reporter-Gen-Konstrukt enthalten (s. **Abb. 2.1**). Sie stellen ein Modell dar, das es erlaubt, die Funktion des Transkriptionsfaktors FoxO1a auf einfache Weise zu untersuchen. Die Herstellung der Zelllinie ist bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben worden (31). 4-Hydroxytamoxifen entsteht durch Metabolismus in der Leber durch das Cytochrom P-System (CYP2D6, CYP3A4) aus Tamoxifen. Tamoxifen selbst hat eine zehnfach geringere Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor (ER), Hydroxytamoxifen eine 30 bis 100-fach höhere.

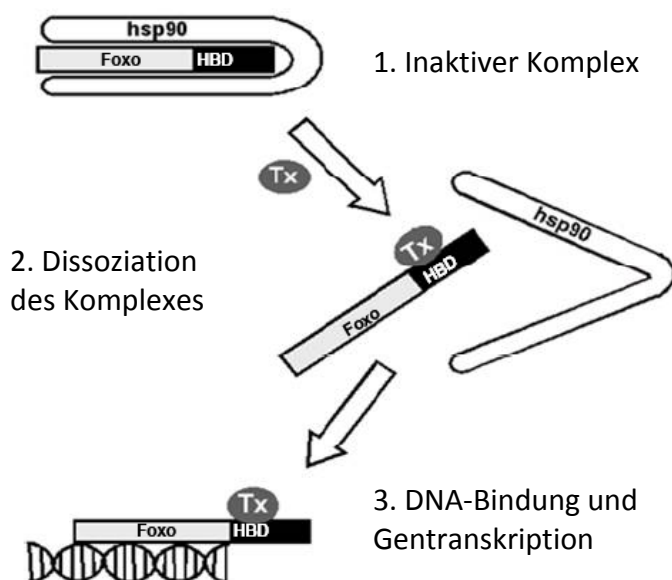


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Reporter-Gen-Konstrukts (nach (31)). Der inaktive Komplex wird durch Hinzugabe von Tx nach Abdissoziation des Heatshock-Proteins 90 aktiviert. Anschließend bindet FoxO1a an die DNA und startet die Transkription abhängig regulierter Gene.

Die Zellen wurden entweder in Kulturflaschen oder auf Kulturplatten der Firma Nunc (Nunc GmbH & Co. KG, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) kultiviert (Flasche mit Nunclon™ Δ -Kulturoberfläche 80-175 cm², Kulturplatte mit Nunclon™ Δ -Kulturoberfläche 21,5 cm²). Für alle mit den Zellproben durchgeführten Experimente wurden, sofern nicht anders beschrieben, 6-well-Zellkulturplatten (Nunclon™ Δ -Kulturoberfläche, 9,6 cm² Kulturoberfläche je Vertiefung) verwendet. Alle Zellen wurden in einem Inkubator mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre, bei 37 °C und 5,0 % CO₂, kultiviert.

2.1.2 Zellkulturmedien

a) Serumhaltiges Medium

Materialien:

500 ml DMEM High Glucose (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

50 ml FCS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

5 ml Penicillin (Endkonzentration: 100 U/ml)/ Streptomycin (Endkonzentration: 100 mg/l als 100-faches Konzentrat (Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe)

1 Filtersystem (Falcon™, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)

1 Duran®-Flasche, steril, 500 ml (Schott AG, Mainz)

Prozedere:

Die Materialien wurden unter sterilen Kautelen unter der Zellkulturbank miteinander vermengt und anschließend sterilfiltriert.

b) Serumfreies Medium

Materialien:

485 ml DMEM High Glucose (PAA Laboratories, Linz, Österreich)

5 ml Penicillin (Endkonzentration: 100 U/ml) / Streptomycin (Endkonzentration: 100 mg/l als 100-faches Konzentrat (Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe)

5 ml HEPES 2 M (Endkonzentration 10 mM); pH 7,5

BSA (Endkonzentration: 0,01 mg/ml) (Calbiochem, La Jolla, USA)

1 Filtersystem (Falcon™, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)

1 Duran[®]-Flasche, steril, 500 ml (Schott AG, Mainz)

Prozedere:

Unter Verwendung der angegebenen Inhaltsstoffe analog zum serumhaltigen Medium.

2.1.2 Subkultivierung

Material:

10 ml PBS

3 ml Trypsinlösung (Gibco[®], Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Serumhaltiges Medium

Sterile Zentrifugationsröhrchen

Prozedere:

Bei einer lichtmikroskopisch beobachteten Konfluenz der Zellen von etwa 70-80 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und mit etwa 10 ml PBS gewaschen, um eventuelle Reste des Mediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml einer 0.05 %igen vorgewärmten Trypsinlösung vom Zellkulturgefäß abgelöst. Um das Temperaturoptimum von 37 °C des Trypsins zu erreichen, wurden die behandelten Zellkulturgefäße für einige Minuten in den Inkubator gestellt. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Ablösung wurde das Trypsin mit 10 ml frischem, serumhaltigen Medium deaktiviert. Die Zellsuspension wurde für 5 min. bei 23 °C und 410 x *g* zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml serumhaltigem Medium resuspendiert und im entsprechend gewünschten Verhältnis (z.B. 1:10) auf neue Kulturgefäße verteilt.

2.1.3 Zellen einfrieren / auftauen

Zum längerfristigen Einlagern nicht verwendeter Zellen.

Materialien:

Zellkultur

Trypsin (Gibco®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Kryoröhrchen (Nunc GmbH & Co. KG, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold)

D-PBS ohne Ca^{2+} & Mg^{2+}

DMSO

FCS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

Prozedere:

Die Zellen wurden wie unter **Abschnitt 2.1.2** beschrieben mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst, in PBS aufgenommen und 2 min. bei 23 °C und 410 x *g* zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 800-1000 µl Einfriermedium (bestehend aus FCS mit DMSO, 10 %) aufgenommen und in Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden in Papier gewickelt um ein langsames Abkühlen zu gewährleisten. Zunächst wurden die Zellen für etwa 24 h auf –20 °C gekühlt, erst danach auf –80 °C. Beim Einfrieren der Zellen wurde besonders auf zügiges Arbeiten geachtet, da das Trypsin erst durch Zugabe des Einfriermediums inaktiviert wird. Zur Reaktivierung der Zellen wurden sie bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in serumhaltigem Medium suspendiert, pelletiert und in Kulturmedium ausgesät.

2.1.4 Zellen selektionieren

Da es sich bei den FoxO1a-ER-CC-Zellen um transfizierte Zellen handelt, wurde dem Medium das Antibiotikum Blasticidin in einer Konzentration von 2 µg/ml hinzugegeben um einen konstanten Selektionsdruck aufrecht zu erhalten.

Zur Überprüfung der Selektion wurden parallel die H4IIEC3-Zellen ebenfalls mit Blasticidin behandelt. Bei Absterben dieser Zellen konnte die Selektion als abgeschlossen betrachtet werden.

2.1.5 Zellstimulation

Materialien:

6-Well Zellkultur-Testplatten (Nunclon™ Δ -Kulturoberfläche, 9,6 cm² Kulturoberfläche je Vertiefung)

D-PBS ohne Ca²⁺ & Mg²⁺

Serumfreies Medium

Prozedere:

Die Medien wurden vom 6-Well entfernt, dieses anschließend 3-mal mit vorgewärmtem DPBS gespült und daraufhin das Versuchsmedium zugegeben.

Vor einer Stimulation wurden die Zellen 12 Stunden in je 2 ml/Well mit serumfreiem Medium behandelt, um die durch im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren verursachte basale Phosphorylierung der an der Signaltransduktion beteiligten Proteine möglichst gering zu halten.

Das serumfreie Nährmedium wurde entfernt und anschließend Stimulationsmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden dabei wie folgt stimuliert:

H4IIE-Zellen wurden unbehandelt, sowie für 4 und 12 Stunden mit Tamoxifen behandelt, jeweils in Doppelbestimmungen untersucht.

Die FoxO1a-ER-CC Zellen wurden unbehandelt verwendet sowie für je 4 und 12 Stunden mit Ethanol behandelt. Hydroxytamoxifen wurde jeweils für 4 und 12 Stunden hinzugefügt, in weitere Proben wurde Hydroxytamoxifen zusammen mit Insulin hinzugegeben. Eine Übersicht der Versuchsbedingungen ist in **Tabelle 2.2** zu sehen.

2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.1 Promoteraktivitätsbestimmung – Luziferase-Assay

Es handelt sich hierbei um einen Reporteragen-Assay, d. h. in den zu untersuchenden Zellen ist der Promotorregion eines spezifischen Gens die Sequenz des Luziferase-Gens nachgeschaltet, so dass das Enzym Luziferase bei Aktivierung der Promotorregion ebenfalls aktiviert wird. Der Luziferase-Assay beruht auf dem Prinzip der Chemilumineszenz, d. h. chemische Energie wird enzymatisch in Lichtenergie umgewandelt. Dies geschieht im Falle

der Luziferase durch Oxidation des Luziferins zu Oxyluziferin (s. **Abb. 2.2**). Dieser Prozess wird durch das Enzym Luziferase katalysiert, welches ATP und Mg^{2+} als Kosubstrate benötigt. Das dabei entstehende Licht wird anschließend mit Hilfe des Luminometers gemessen.

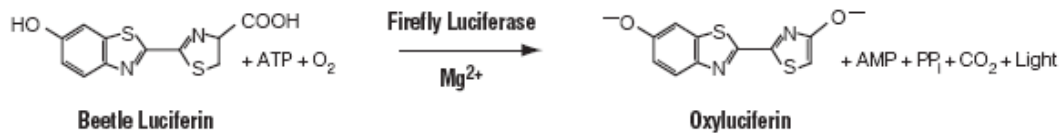


Abb. 2.2 Reaktionsmechanismus des Luziferase-Assays (aus (32))

Materialien:

Zellproben

Passiver Lysepuffer 5x (Promega, Madison, USA)

Luziferase-Assay Reagenz (Promega GmbH, Mannheim)

Luminometer Berthold MiniLuminat LB 9605 (Berthold Technologies, Bad Wildbad)

Luminometertube 3,5 ml 55x12mm (Sarstedt, Nümbrecht)

1,0 ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Prozedere:

Die Zellen wurden zunächst mit jeweils 250 µl des im Verhältnis 1:5 verdünnten passiven Lysepuffers (PLB) von der 6-well Kulturschale abgelöst und in Reaktionsgefäße eines Volumens von 1000 µl überführt. Anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugierung mit 12000 x g für 15 sec. Für die Messung im Luminometer wurden 5 µl des Zelllysates und 25 µl des Luziferase-Assay Reagenz (LAR) in ein Luminometertube überführt und der entsprechende Wert am Display des Gerätes abgelesen.

Detaillierte Information zum System und Reaktionsprotokoll finden sich bei Promega im Technical Bulletin No. 281, zum freien Download verfügbar auf www.promega.com/tbs.

2.2.2 Proteinbestimmung – BCA-Assay

Der *bicinchoninic acid* (BCA) – Assay (dt.: Bicinchoninsäure) dient der kolorimetrischen Detektion und quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Er beruht auf einer Kombination aus der Biuret-Reaktion (der Oxidation von zweiwertigen Kupferkationen (Cu^{2+}) zu einwertigen Kupferkationen (Cu^{1+}) durch Proteine) und der Komplexbildung von zwei

Molekülen BCA mit einem Kupferkation. Dieser Komplex verfärbt sich violett und kann bei einer Wellenlänge von 562 nm mit Hilfe eines Mikroplatten-Lesegeräts detektiert werden. Die Extinktion verhält sich annähernd linear zur Proteinkonzentration.

Materialien:

Mikroplatten-Lesegerät Infinite® F500 (Tecan Group Ltd. Männedorf, Schweiz)

96-well Mikrotiterplatte

Aqua destillata

BSA

Lösung A (Pierce, Rockford, USA): BCA-Lösung

Lösung B (Pierce, Rockford, USA): Kupfersulfat-Lösung

Passiver Lysepuffer (PLB) 5X

Zell-Lysate

Prozedere:

Zur Proteinbestimmung der zu messenden Proben wird die Reaktionslösung aus Lösung A und B hergestellt:

5 ml Lösung A + 100 µl Lösung B

Das jeweilige Probenvolumen von 5 µl wird mit 95 µl der Reaktionslösung zu einem Gesamtvolumen von 100 µl ergänzt.

Um in den aus den Zellen gewonnenen Proben die Proteinkonzentration messen zu können, muss zunächst eine Eichkurve erstellt werden (s. **Tabelle 2.1**). Dazu werden verschiedene Konzentrationen aus einer BSA-Stocklösung (Konzentration 100 mg/ml) wie folgt hergestellt:

1:100 → 1 µl BSA + 99 µl PLB 1X

1:10 → 10 µl BSA + 90 µl PLB 1X

Tabelle 2.1 Pipettierschema für die Eichkurve

Proteinkonz. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Puffer (μl)	Protein (BSA μl)	Verdünnung BSA
0	5	0	1 : 100
0,2	4	1	
0,4	3	2	
1	0	5	
2	4	1	1 : 10
4	3	2	
10	0	5	
	Je 5 μl Probenvolumen		

Die zu untersuchenden Zellproben werden mit jeweils 250 μl des PLB (1:5 verdünnt) lysiert und kurz zentrifugiert.

Analog zu den Volumina in der verwendeten Eichkurve wurden nun jeweils 5 μl der Probe mit der Reaktionslösung zu 100 μl Gesamtvolumen ergänzt und in einer Dreifach-Bestimmung auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 min. bei 37 °C im Heizofen inkubiert und anschließend die Absorption der Proben bei 562 nm im Mikroplatten-Lesegerät bestimmt. Über die erhaltene Geradengleichung kann nun die Proteinkonzentration bestimmt werden, die sich annähernd proportional zur Absorption der Proben verhält.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Gesamt-RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Zell-RNA wurde das RNEasy[®] Kit der Firma Qiagen verwendet. Das RNEasy[®] Verfahren stellt ein gut etabliertes Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von RNA dar. Es verbindet die selektive Bindungskapazität einer silikatischen Membran mit der Geschwindigkeit der Zentrifugation. Ein spezielles salzhaltiges Puffersystem ermöglicht die Bindung von bis zu 100 μg RNA einer Länge von mehr als 200 Basen an die silikatische Membran. Proben werden zunächst lysiert und unter Anwesenheit eines stark denaturierenden Guanidin-Thiocyanat-haltigen Puffers homogenisiert. Dies inaktiviert sofort

RNasen und stellt somit die Aufreinigung intakter RNA sicher. Zudem wird Ethanol hinzugefügt um entsprechende Bindungsverhältnisse zu ermöglichen. Anschließend wird die Probe in das Zentrifugationsröhrchen gegeben, in dem die Gesamt-RNA an die Membran bindet und Fremdstoffe durch Ultrazentrifugation entfernt werden. Die verbleibende RNA wird dann mit 30-100 µl Aqua dest. eluiert.

Mit dieser Methode lassen sich RNA-Moleküle mit einer Länge von mehr als 200 Nukleotiden aufreinigen. Außerdem wird durch dieses Verfahren mRNA angereichert, da die meisten RNA-Nukleotide mit weniger als 200 Nukleotiden (5.8S rRNA, 5S rRNA, und tRNAs, die zusammen etwa 15-20 % der Gesamt-RNA ausmachen) selektiv eliminiert werden (33). mRNA hingegen macht lediglich etwa 4 % der Gesamt-RNA aus.

Materialien:

Zellproben

Aqua destillata

RNEasy® Kit (Qiagen, Hilden)

QIAshredder® (Qiagen, Hilden)

β-Mercaptoethanol

100 %iges Ethanol

70 %iges Ethanol

Sterile, RNase/DNase-freie Pipettenspitzen und 1,5 ml Reaktionsgefäße

Prozedere:

Die benötigten Puffer „Buffer RLT“ und „Buffer RPE“ wurden vor Beginn der RNA-Isolierung nach den Anweisungen des Herstellers angesetzt (33).

H4IIE-Zellen und FoxO1a-Zellen wurden in 6-Wells ausplattiert und jeweils für 4 Stunden mit Agenzien stimuliert. Nach Stimulationsende wurden sie 3-mal mit gekühltem D-PBS gespült. Die restlichen Isolierungsschritte wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Die erhaltene RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.2 Kontrolle der mRNA-Qualität

Um die Qualität der isolierten mRNA zu kontrollieren, wurde der Extinktionskoeffizient der RNA bei 260 nm zu 280 nm im Spektrophotometer bestimmt und das Verhältnis der Extinktionen berechnet. Es wurden nur Proben mit einem Wert $\geq 1,6$ weiterverwendet, da ein kleineres Verhältnis auf Verunreinigungen mit Proteinen und Salzrückständen hinweist. Dies würde die reverse Transkription in cDNA und die Real-time PCRs stören.

Die anschließende Formamid-Gelelektrophorese diente zur Überprüfung der Intaktheit der isolierten RNA. Das Prinzip der Gelelektrophorese besteht in der Auftrennung von RNA oder DNA nach ihrer Größe. Die negativ geladenen Nukleinsäurestränge wandern dabei von der Kathode (-) in Richtung Anode (+). Kleine Stränge laufen dabei schneller als große Stränge. Im vorliegenden Fall wurde RNA überprüft. Intakte, reine Gesamt-RNA weist scharfe 28S und 18S rRNA-Banden im Verhältnis 2:1 auf. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von Ethidiumbromid auf einem UV-Leuchttisch über die Fluoreszenz der Komplexe aus Nukleinsäure und Ethidiumbromid nachgewiesen.

2.3.2.1 UV-Messung der RNA

Materialien:

RNA-Proben

RNAse freies Wasser

UV-Küvetten UVette® (Eppendorf, Hamburg)

UV Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)

Sterile, RNAse/DNAse freie Pipettenspitzen

Spektrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg)

Man pipettiert unter sterilen Bedingungen 5 μ l der zu untersuchenden RNA-Probe und fügt weitere 95 μ l RNAse freies Wasser hinzu. Man beachte, dass man vorher am UV-Meter die richtigen Messvolumina einstellen muss. Anschließend erfolgen die Messung bei 260 nm und 280 nm und die Ermittlung des Extinktionsverhältnisses am Spektrophotometer.

Tabelle 2.2: Spektrophotometrische Messung der RNA-Proben

Probe	RNA (ng/ μ l)	A260 nm	A 280 nm	Q 260/280
H4IIE leer	603,1	0,635	0,335	1,90
H4IIE 4h Tx	611,2	0,665	0,336	1,98
H4IIE 12h Tx	568,5	0,612	0,302	2,03
FKHR-ER leer	1329,3	1,567	0,812	1,93
FKHR-ER 4h EtOH	1286,8	1,511	0,779	1,94
FKHR-ER 12h EtOH	438,5	0,444	0,213	2,08
FKHR-ER 4h Tx	917,9	1,049	0,548	1,91
FKHR-ER 4h Tx+Ins	856,1	0,942	0,506	1,86
FKHR-ER 12h Tx	840,6	0,952	0,5	1,90
FKHR-ER 12h Tx + Ins	1046,3	1,269	0,635	2,00

2.3.2.2 Formamid- Gelelektrophorese

Materialien:

Isolierte RNA (Konzentration: 2 μ g/5 μ l)

Formamid (37 %)

Ethidiumbromid (1 mg/ml)

Agarose

Bromphenolblau

MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure),

0,05 M Natriumazetat, 0,01 M EDTA

Man vermischt 41,9 g MOPS, 6,8 g Natriumazetat und 3,8 g Dinatrium EDTA und füllt dieses Gemisch mit Wasser auf einen Liter auf, so dass man einen 10 x MOPS-Puffer erhält. Der endgültige pH-Wert dieses Puffers sollte zwischen 5,5 und 7 liegen.

Loading buffer: 0,8 ml 10 x MOPS-Puffer, 0,4 ml 80 % Glycerol, 0,4 ml Bromphenolblau

(gesättigte Lösung), 1,4 ml Formamid (37 %), 4,0 ml Formamid

Horizontale Gelelektrophorese-Kammer

Prozedere:

Für ein 20 x 20 x 0,6 cm Agarosegel werden 3 g Agarose (für ein 1 %iges Gel) mit 262 ml Wasser vermischt. Anschließend wird die Agarose in einer Mikrowelle erhitzt bis eine homogene Lösung entsteht. Hierbei ist zu beachten, dass sich keine Schlieren bilden, die die Visualisierung der Proben auf dem Gel beeinträchtigen könnten. Die flüssige Agarose lässt man nun auf 50 °C abkühlen. Unter einem Abzug werden nun Ethidiumbromid (8 µg/100 ml), 37 %iges Formamid (5,4 ml) und MOPS-Puffer (30 ml) hinzugegeben.

Nun gibt man die vorbereitete Lösung in eine Gelelektrophorese-Kammer geeigneter Größe und steckt einen Kamm hinein, um die Taschen für die Proben zu formen. Nach Abkühlung und Auspolymerisierung der Agarose wird diese fest und der Kamm kann aus dem nun entstandenen Gel entfernt werden.

Nach Zugabe des verdünnten MOPS-Puffers (1 x, d.h. Verdünnung von 1:10) wurden jeweils 5 µl der RNA-Proben zusammen mit 5 µl des *loading buffers* (Gesamtvolumen der Proben: 10 µl) in die vorbereiteten Probentaschen pipettiert. Anschließend wurde eine Spannung von 4-6 V/cm (d. h. für etwa 15 cm: ca. 60-90 V) angelegt und die Elektrophorese gestartet bis etwa $\frac{3}{4}$ des gesamten Gels zurück gelegt wurden.

Anschließend wurde das Gel aus der Elektrophorese-Kammer entfernt und unter dem UV-Transilluminator betrachtet und die Qualität der RNA anhand der Integrität der 18 und 28S-RNA beurteilt (s. **Abb 2.3**).

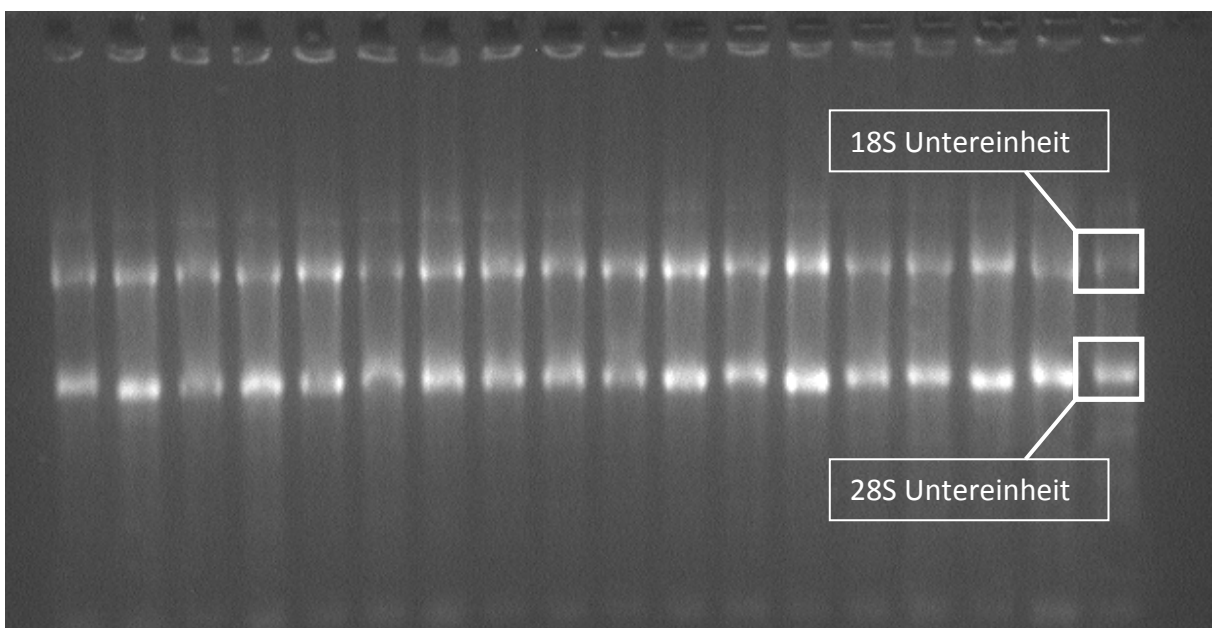


Abb. 2.3 Die Gelelektrophorese zeigt die Untereinheiten 18 und 28S der rRNA

2.3.3 DNA-Mikroarray

Zur Durchführung des Mikroarray wurden dieselben Proben, die bereits für die vorangegangenen Experimente verwendet wurden, weiter benutzt, um konsistente Ergebnisse zu erhalten. Hierzu wurde, wie in **Abschnitt 2.3.1** beschrieben, die Gesamt-RNA aus den Proben isoliert und an die Firma Genesys Laboratory (Münster) versendet. Aus Kostengründen wurde der Mikroarray nur einmalig durchgeführt.

Der Mikroarray beinhaltete ein *set* aus 1244 Genen, die verschiedensten biologischen Prozessen zuzuordnen waren, u. a. Signaltransduktion, Glukosestoffwechsel, Lipidstoffwechsel, Oxidoreduktasen und Genen, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt waren.

Nach Erhalt der Ergebnisse wurden die ausgewählten Kandidatengene mittels Literaturrecherche für eine weitergehende Analyse ausgewählt. Erschienen die Gene für biochemische Prozesse oder auf Grund der ihr zugeordneten Funktion als Rezeptorprotein besonders interessant, so wurden die entsprechenden *primer* erstellt und eine Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) durchgeführt.

Es wurden für die Analyse in der RTQ-PCR diejenigen Kandidatengene ausgewählt, die eine deutliche (d. h. mindestens um Faktor 2) Induktion im Mikroarray gezeigt hatten. Gene, die reprimiert wurden, wurden nicht bearbeitet, da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich nach Kandidatengen gesucht wurde, durch Foxo1a induziert werden.

2.3.4 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde unter Verwendung des *High-capacity cDNA Archive Kits* (Applied Biosystems, Foster City, USA) in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Eine dazu verwendete RNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet *Random Hexamer Primer* und Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) um die gesamte RNA in cDNA zu transkribieren. Mit der dadurch erhaltenen cDNA wurden anschließend PCR und Real-time PCR durchgeführt.

Materialien:

High Capacity cDNA reverse transkriptase kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

RNA aus H4IIE- und FoxO1a-ER-CC-Zellen

Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient)

Sterile, RNase/DNase freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße

Prozedere:

Es wurden je Probe 5 µl RNA mit 5 µl RNase freiem Wasser vermischt und mit 10 µl Master Mix zur cDNA-Synthese verwendet.

Der Master Mix setzte sich folgendermaßen zusammen:

2 µl 10 x RT Buffer;

0,8 µl 25 x dNTP Mix;

2 µl 10 x RT Random Hexamer Primer;

4,2 µl Nuclease freiem H₂O;

1 µl Reverse Transkriptase (50 Units/µl)

Master Mix, RNA und Wasser wurden gut vermischt und im Thermocycler zur Reaktion gebracht. Das Programm umfasste:

Schritt 1: 25 °C 10 min.

Schritt 2: 37 °C 120 min.

Schritt 3: 85 °C 5 sec.

Schritt 4: 4 °C hold

Die cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt. (34)

2.3.5 Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RTQ-PCR)

Die *primer* der zu untersuchenden Zielgene wurden anhand der auf dem Mikroarray verwendeten Gensequenzen gesucht. Auf dem Mikroarray ist jede Position durch eine so genannte „Celera Gene ID“, also eine Identifikationsnummer, definiert.

Alle verwendeten *primer* wurden anhand ihrer Identifikationsnummer auf der Internetseite des Anbieters gesucht und von dort bezogen. Der Weblink findet sich unter (35). **Tab. 2.3** gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer wieder.

Material und Methoden

Materialien:

Real-time Cycler ABI Prism 7700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, USA) mit Anwendungssoftware (*7700 Sequence Detection System*, version 1.6 software)

20X TaqMan Gene Expression Assays

2X TaqMan Gene Expression Master Mix

cDNA-Proben

RNAse/DNAse freies Wasser

Sterile RNAse/DNAse freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße

MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, N8010560)

MicroAmp™ Optical Film Compression Pad (Applied Biosystems, 4312639)

Tabelle 2.3 Verwendete primer mit den jeweiligen Identifikationsnummern für die entsprechenden Kandidatengene

Untersuchtes Zielgen	Celera Gene ID	TaqMan Gene Expression Assay
Proteinphosphatase 1, regulatory subunit	rCG63346	Rn02100178_s1
Mig-10	rCG22523	Rn01452218_m1
Retinoid X Receptor	rCG46067	Rn01483466_m1
Rab 30	rCG39991.1	Rn01754888_m1
Proteinphosphatase 1, regulatory (inhib.) subunit 1A	rCG50630	Rn00575374_m1
G-protein coupled receptor 1	rCG22237.1	Rn00564179_s1
Proto-oncogene Src (B lymphoid kinase)	rCG52180.1	Rn01762914_g1
Pancreatitis-associated protein	rCG56558	Rn00583920_m1
Rho/Rac	rCG55999	Rn01420828_g1
Sphingosin-1-phosphate lyase 1	rCG22105	Rn00597481_m1
CYP450, subfamily 2	rCG43399	Rn01529594_m1
Solute carrier family 27 (fatty acid transporter) , member 32	rCG27058	Rn01514000_m1
Uridine phosphorylase	rCG24466	Rn01401213_m1
FOXP1	rCG56237	Rn01425274_g1
Probasin	rCG36423	Rn00569425_m1
Carnitinepalmitoyltransferase 1, liver	rCG48591	Rn00580702_m1
Serum paraoxonase	rCG28036	Rn01455909_m1
ADP-ribosylation factor-related	rCG44824	Rn01494252_m1
Map Kinase Kinase 6	rCG34806	Rn00586764_m1
Isocitrate dehydrogenase 1	rCG22450	Rn00580421_m1
Glucose-6-phosphatase, catalytic	rCG34259	Rn00565347_m1
Ceruloplasmin	rCG4145	Rn00680436_m1

Prozedere:

Zuvor hergestellte 20 µl cDNA wurden mit 40 µl Wasser für die Molekularbiologie verdünnt. Anschließend wurde der *TaqMan® Gene Expression Master Mix* aus 12,5 µl Mastermix und 1,25 µl *Gene Expression Assay* je Probe hergestellt. Zu den 13,75 µl *TaqMan® Gene Expression Master Mix* wurden 11,25 µl der zu untersuchenden cDNA hinzugegeben. Die entstandenen 25 µl wurden in ein *MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate* gegeben, mit einer Folie versiegelt und mit einem *MicroAmp™ Optical Film Compression Pad* bedeckt. Als „no template control“ wurde ein Well mit 13,75 µl *TaqMan® Gene Expression Master Mix* und 11,25 µl H₂O beladen (36).

Die real-time PCR lief nach folgendem Programm:

Schritt 1: 50 °C 2 min.

Schritt 2: 95 °C 10 min.

Schritt 3: 95 °C 15 sec.

Schritt 4: 60 °C 1 min.

Schritt 5: GOTO 3 REP 40

Schritt 6: 4 °C hold

2.4 Statistische Auswertung

Zur Berechnung der Statistik wurde das Programm *Sigma Plot 11* (Fa. Systat Software, Inc.) verwendet.

In der deskriptiven Statistik wurden die Ergebnisse der Experimente als Mittelwerte (arithmetisches Mittel) mit Standardabweichung (SD, *standard deviation*) angegeben. Die jeweiligen Standardabweichungen wurden in den Diagrammen als Fehlerindikatoren dargestellt.

Die Ergebnisse aus dem Mikroarray wurden lediglich als Einzelwerte angegeben, da er nur einmal durchgeführt wurde.

Zur statistischen Auswertung der ermittelten experimentellen Daten wurde zunächst eine Varianzanalyse in Form eines *one-way ANOVA* durchgeführt. Liegt hierbei ein signifikanter Unterschied vor, lässt sich jedoch noch nicht sagen, welche Gruppen (und damit

experimentelle Variablen) sich voneinander unterscheiden. Man stellt lediglich fest, *dass* ein signifikanter Unterschied besteht.

Um zu überprüfen, welche Gruppen sich voneinander signifikant unterscheiden, schließt sich ein *multiple comparison*-Test als post-hoc Analyse an. Hierzu eignen sich prinzipiell der Bonferroni t Test, der Holm t Test (Holm-Sidak-Test) und der Dunnett Test (37). In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode nach Holm-Sidak angewendet. Diese hat eine etwas höhere Teststärke bei gleicher Praktikabilität. Es gibt jedoch letztlich keinen Konsens, welche Methode bevorzugt werden soll (37), alle Methoden führen zu vergleichbaren Ergebnissen. Für hierdurch errechnete p-Werte wurde als maximale Irrtumswahrscheinlichkeit ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt. p-Werte von $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant zu Niveau α angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Konditionelle Aktivierbarkeit des FoxO1a-Konstrukts

Zunächst wurde die durch 4-Hydroxytamoxifen (im Folgenden mit „Tx“ abgekürzt) induzierte Aktivierbarkeit des in **Abschnitt 2.1** beschriebenen FoxO1a-Konstrukts mittels Luziferase-Assay bestimmt. Dies dient zur Überprüfung des Konstrukts, dessen Intaktheit Grundvoraussetzung ist für die Durchführung der weiteren Experimente.

Die einzelnen Zellproben wurden wie folgt behandelt: Zum einen wurde die Zelllinie H4IIE verwendet, mit Tx für jeweils vier und zwölf Stunden behandelt und die relativen Lichteinheiten (*Relative light units = RLU*) gemessen. Da es sich bei dieser Zelllinie um native Hepatomzellen handelt, werden diese Zellen als Kontrolle verwendet und im Folgenden auch so bezeichnet.

Parallel dazu wurde die transfizierte Zelllinie FoxO1a-ER-CC mit verschiedenen Substanzen behandelt: Eine Doppelbestimmung erfolgte ohne Stimulation, zwei weitere Proben wurden für jeweils vier und zwölf Stunden mit Ethanol als Lösungsmittelkontrolle behandelt, da Tx in Ethanol gelöster Form vorliegt. Um die Induzierbarkeit zu ermitteln, wurden die transfizierten Zellen für 4 und 12 Stunden mit Tx inkubiert und anschließend die Aktivität der Luziferase gemessen. In einer weiteren Doppelbestimmung wurden die Zellen mit Tx und Insulin (im Folgenden mit „Ins“ abgekürzt) ebenfalls vier und zwölf Stunden inkubiert. Es erfolgte die Messung der RLUs aus allen Proben. Die Bestimmung erfolgte jeweils in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen.

3.2 Normierung der FoxO1a-Aktivität auf die Proteinmenge

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus **Abschnitt 3.1** zu ermöglichen, wurde der Proteinanteil der jeweiligen Zellproben mittels des BCA-Assays bestimmt. Im Anschluss daran wurden die Ergebnisse des Luziferase-Assays auf den jeweiligen Proteinanteil der Probe bezogen, wobei die Ergebnisse relativ zum Basalwert dargestellt wurden.

Man erkennt in **Abb. 3.1** (H4IIE Zellen), dass die gemessene Aktivität erwartungsgemäß gleichmäßig gering ist, d. h. es findet keine Aktivierung in den Kontrollzellen statt. Sie enthalten kein aktivierbares FoxO1a-ER-Konstrukt, jedoch das Reportergenkonstrukt. Ohne das konditionell aktivierbare FoxO1a-ER-Konstrukt kommt es zu keiner Zunahme der RLU. Die Kontrollzellen sind somit zur Überprüfung der konditionellen Aktivierbarkeit geeignet, da das Reportergenkonstrukt alleine nicht durch Hydroxytamoxifen aktiviert wird.

Abb. 3.2 (FoxO1a-ER-CC Zellen) zeigt eine Zunahme der Aktivität um etwa den Faktor 100 (99,57) durch Tx nach vierstündiger Stimulation im Vergleich zur unbehandelten Probe. Die Behandlung der Proben mit Insulin zeigt eine Hemmung der Aktivität auf 6.64 % des Maximalwertes nach vier Stunden. Nach zwölf Stunden zeigt die Aktivität eine Zunahme um Faktor 23,04. Insulin hemmt hier die Aktivität auf 15,25 %. Die Ergebnisse sind statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Das konditionell aktivierbare FoxO1a-Konstrukt ist durch 4-Hydroxytamoxifen aktivierbar und durch Insulin hemmbar. Es ist somit geeignet zur Analyse von Genen, die durch den Transkriptionsfaktor FoxO1a induziert bzw. gehemmt werden.

Normierung der FoxO1a-Aktivität auf die Proteinmenge

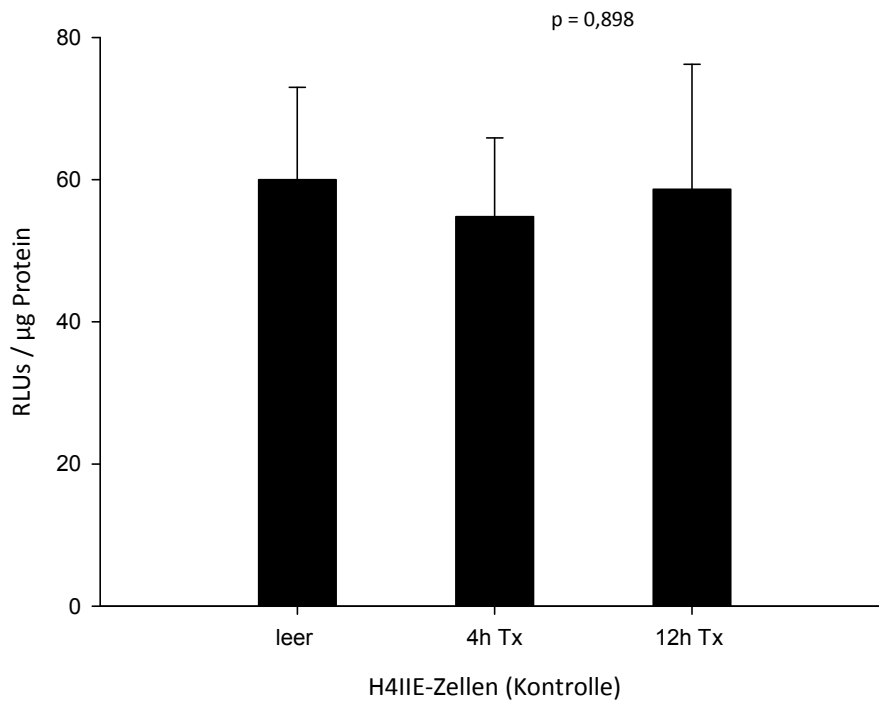


Abb. 3.1 Darstellung der RLU / µg Protein in den Kontrollzellen H4IIE

Die Unterschiede der einzelnen, unterschiedlich behandelten Zellgruppen sind statistisch nicht signifikant ($p=0,840$).

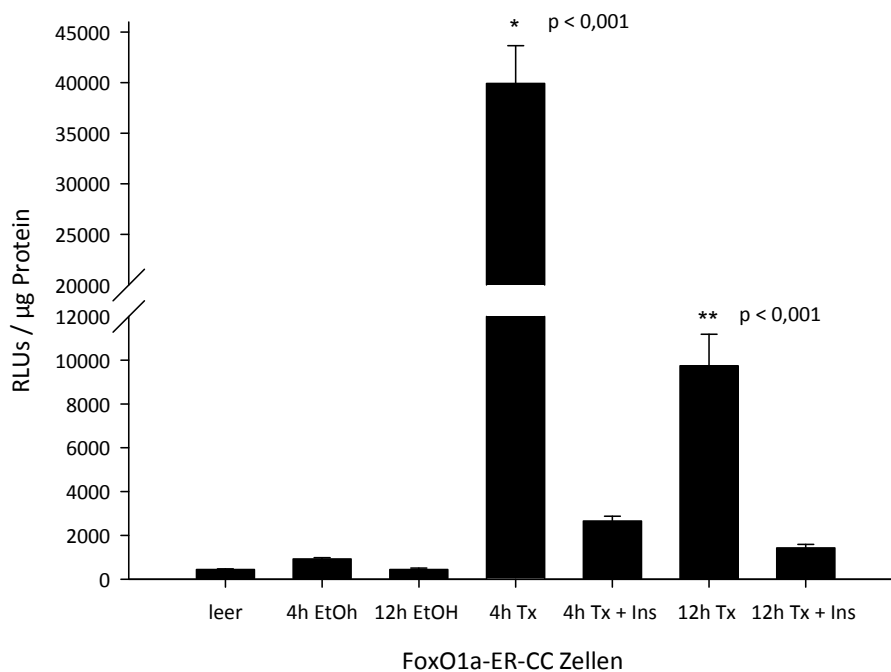


Abb. 3.2 Darstellung der RLU / µg Protein in den konditionell aktivierbaren Zellen Foxo1a-ER-CC.

*gibt einen statistisch signifikanten Unterschied ($p<0,001$) nach vierstündiger Stimulation Tx ggü. allen anderen Gruppen an; **gibt einen statistisch signifikanten Unterschied ($p<0,001$) nach zwölfstündiger Stimulation mit Tx ggü. allen Gruppen an (außer den mit 4 h Tx behandelten Zellen).

3.3 Mikroarray

Zur Identifikation weiterer, durch FoxO1a induzierter Gene, führten wir eine Mikroarray-Analyse durch. Dazu wurden die in den Vorversuchen (s. **Abschnitte 3.1 und 3.2**) verwendeten Proben weiterverwendet, die RNA aus den Proben isoliert und die RNA-Proben schließlich für die Analyse auf dem Mikroarray-Chip benutzt. Details zum Mikroarray-Chip finden sich in **Abschnitt 2.3.3**).

Als Ergebnis erhält man eine Auswertung von 1244 untersuchten Kandidatengenen. Diese wurden quantitativ analysiert und es wurde überprüft, ob die Kandidatengene durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors FoxO1a induziert werden. Im Folgenden wurden Gene, die um mehr als einen Faktor von zwei induziert wurden, weiteruntersucht. Die Sortierung erfolgte nach der Funktion des jeweiligen Gens.

Die einzelnen Gene und ihre Induktion nach 4-Hydroxytamoxifen -Gabe bzw. Hemmung nach Insulin-Gabe sind in der folgenden **Tabelle 3.1** dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde hier auf die Darstellung der Kontrollzellen und der mit Ethanol stimulierten Proben verzichtet, da dort keine bedeutsamen Unterschiede auftraten. Die vollständige Übersicht der Daten findet sich im Anhang.

Es wurden insgesamt 28 Kandidatengene gefunden, die im Mikroarray eine starke bis sehr starke Induktion (mehr als zweifach) durch FoxO1a-Aktivierung aufwiesen. Eine statistische Analyse war für diese Ergebnisse nicht möglich, da im Mikroarray lediglich eine Einzelbestimmung erfolgte.

Es gibt demnach zahlreiche weitere, durch FoxO1a regulierte Gene. Zur Validierung der im Mikroarray erhobenen Daten wurde die Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion (RTQ-PCR) als Bestätigungstest durchgeführt.

Mikroarray

Tab. 3.1 Kandidatengene, die um Faktor >2 induziert wurden. Angabe der relativen Fluoreszenzintensitäten. Grau unterlegt sind Gene mit starker Induktion (d. h. mindestens um Faktor 2)

Genprodukt	Unstimuliert / 4h Tx / 4h Tx + Ins	Unstimuliert / 12h Tx / 12h Tx + Ins
SIGNALTRANSDUKTION / REZEPTORPROTEINE		
Proteinphosphatase 1, regulatory subunit	21,18 / 50,36 / 17,45	21,18 / 51,49 / 16,23
Platelet glycoprotein IV (CD36 Antigen)	17,86 / 34,62 / 16,29	17,86 / 30,94 / 15,52
MIG-10	11,14 / 24,94 / 19,58	11,14 / 34,17 / 23,85
Retinoic acid receptor (RXR)	0,32 / 3,2 / 0,36	0,32 / 3,51 / 0,71
RAB30	27,52 / 80,75 / 29,13	27,52 / 135,56 / 23,38
Dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein (DARPP-32)	0,88 / 1,94 / 0,79	0,88 / 1,19 / 0,3
Alpha-2-Macroglobulin	0,92 / 2,18 / 1,69	0,92 / 1,83 / 1,17
G Protein-coupled receptor 1	0,64 / 1,64 / 2,09	0,64 / 1,9 / 0,65
Proto-oncogene src (SRC/YES/YRK/FYN/FGR) (PTK GROUP I)	1,03 / 2,66 / 0,83	1,03 / 2,21 / 1,45
Pancreatis-associated protein	47,02 / 114,11 / 48,74	47,02 / 200,06 / 12,17
Map kinase kinase 6	21,51 / 44,04 / 6,67	21,51 / 36,64 / 5,98
KOHLLENHYDRATMETABOLISMUS		
Isocitrate dehydrogenase (NADP dependent)	715,86 / 1100,01 / 282,69	715,86 / 1159,34 / 221,04
Glukose-6-phosphatase	416,19 / 633,7 / 118,27	416,9 / 625,18 / 52,42
ZELLSTRUKTURPROTEINE		
Leiomodin	1,05 / 3,54 / 0,79	1,05 / 3,29 / 0,76
F-spondin	0,52 / 4,93 / 0,76	0,52 / 4,93 / 1,24
RHO/RAC Guanine nucleotide exchange factor related protein	0,63 / 2,39 / 1,15	0,63 / 2,16 / 1,71
IMMUNSYSTEM		
Complement component 4 binding protein, beta	12,65 / 39,81 / 15,76	12,65 / 40,24 / 1,96
LIPIDMETABOLISMUS		
Sphingosine-1-phosphate lyase 1	15,99 / 37,98 / 16,16	15,99 / 37,12 / 20,71
Cytochrome P450, subfamily 2	4,57 / 10,97 / 2,92	4,57 / 14,67 / 2,11
Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 32	2,54 / 11,51 / 4,26	2,54 / 17,09 / 0,71
Sterol-O-Acyltransferase	3,77 / 7,05 / 7,35	3,77 / 6,56 / 6,42
NUKLEINSÄUREMETABOLISMUS		
Uridine phosphorylase	0,77 / 18,34 / 8,68	0,77 / 24,61 / 17,67
GTP cyclohydrolase 1	356,56 / 888,6 / 448,9	356,56 / 1043,82 / 611,09
TRANSKRIPTIONSFAKTOREN		
FOXP1 Forkhead Transcription Factor	58,93 / 280,36 / 29,69	58,93 / 168,85 / 35,41
TRANSPORTPROTEINE		
Cation Transport Protein Chac-Related	20,18 / 74,17 / 31,61	20,18 / 66,63 / 27,82
Probasin	1,71 / 5,43 / 0,69	1,71 / 6,52 / 0,49
Carnitine palmitoyltransferase 1, liver	173,18 / 333,04 / 82,9	173,18 / 544,98 / 49,79
Calbindin 3	10,43 / 32,88 / 18,21	10,43 / 18,61 / 14,54
Solute carrier family 22 (Organic cation transporter), member 4	15,28 / 25,01 / 14,94	15,28 / 20,13 / 14,3
Aquaporin 9	1240,73 / 1832,43 / 684,79	1240,73 / 2235,52 / 623,06
OXIDOREDUKTASEN		
Serum paraoxonase/arylesterase 2	3,41 / 18,26 / 3,35	3,41 / 9,64 / 0,61
Coeruloplasmin	9,46 / 42,16 / 7,61	9,46 / 63,01 / 3,43
Aldehyde oxidase 1	3,7 / 7,21 / 2,04	3,7 / 7,17 / 0,74
UNBEKANNTE / NICHT-KLASSIFIZIERTE FUNKTION		
ADP-Ribosylation factor-related	11,22 / 27,06 / 12,5	11,22 / 22,45 / 14,57
Transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	110,62 / 306,65 / 22,25	110,62 / 426,68 / 43,17
Melanocyte-specific gene 1 protein	15,98 / 164,33 / 41,56	15,98 / 265,3 / 82,32
Transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	9,36 / 22,56 / 1,55	9,36 / 20,71 / 4,64
NIPSNAP	582,77 / 936,61 / 431,59	582,77 / 1074,41 / 400,09

3.4 Bestimmung der Genexpression der Kandidatengene

3.4.1 Glukose-6-Phosphatase

Die Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) ist neben der Phosphoenol-Pyruvatcarboxykinase (PEPCK) eines der beiden geschwindigkeitsbestimmenden Schlüsselenzyme der Glukoneogenese. Das Enzym katalysiert den letzten Schritt der Glukoneogenese, die Erzeugung von Glukose aus Glukose-6-Phosphat. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression des G6Pasegens durch FoxO1a induziert und durch Insulin gehemmt wird.

Die G6Pase wurde sozusagen als „interne Qualitätskontrolle“ analysiert, da man bei Bestätigung der vorbekannten Ergebnisse davon ausgehen kann, dass die Versuchsbedingungen zur Analyse weiterer Gene geeignet sind.

Die Versuchsbedingungen waren für alle durchgeführten RTQ-PCR Experimente stets dieselben. Die Zellen wurden jeweils in Doppelbestimmung mit den entsprechenden Substanzen stimuliert, die RNA wurde aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die RTQ-PCR wie in **Abschnitt 2.3.5** beschrieben durchgeführt. Die Versuche wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt.

Anschließend wurde mittels der Ct-Vergleichsrechnung (s. **Kapitel 2**) die relative Genexpression berechnet und mittels ANOVA und der Holm-Sidak Methode als post-hoc Analyse nach statistisch signifikanten Unterschieden gesucht.

Die **Abb. 3.3** zeigt, dass die Genexpression in den Kontrollzellen H4IIE unverändert bleibt, da kein induzierbares Konstrukt enthalten ist.

Nach vierstündiger Stimulierung durch 4-Hydroxytamoxifen steigt die Expression in den FoxO1a-Zellen im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen um den Faktor 1,52 an und wird durch Insulin auf 18,66 % der maximalen Aktivität gehemmt.

In der **Abb. 3.4** ist zu erkennen, dass sich zwischen einigen Zellproben statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression ergeben. Im Einzelnen zeigt sich für die dem 4-Hydroxytamoxifen ausgesetzten Zellen ein signifikanter Unterschied zu den Proben 4 h Ethanol ($p=0,002$), 4h Tx + Ins ($p<0,001$) und 12h Tx + Ins ($p<0,001$). Für die 12 Stunden mit

Bestimmung der Genexpression der Kandidatengene

4-Hydroxytamoxifen stimulierten Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied allen Proben gegenüber, außer den 4 h mit Tx stimulierten. Für alle Proben lag dabei das Signifikanzniveau bei $p < 0,001$, außer gegenüber den 12 h mit Ethanol stimulierten Proben. Hier ergab sich ein p-Wert von genau 0,001.

FoxO1a induziert sowohl im Mikroarray als auch in der RTQ-PCR die Expression der G6Pase. Diese ist durch Insulin stark hemmbar. Im Mikroarray ist dies nicht statistisch beweisbar, da der Probenumfang ($n=1$) zu gering ist.

Ergebnisse

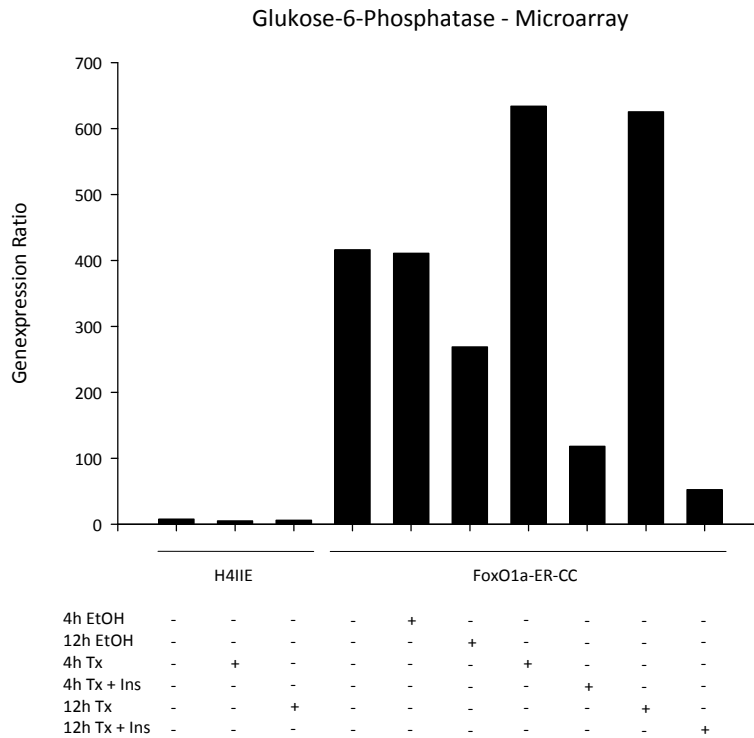


Abb. 3.3: Effekt von Stimulation mit Tx und Hemmung durch Ins auf die Glukose-6-Phosphatase Genexpression im Mikroarray. Es zeigt sich eine deutliche Induktion durch Stimulation mit Tx (nach 4 und 12 h) sowie Hemmung durch Insulin.

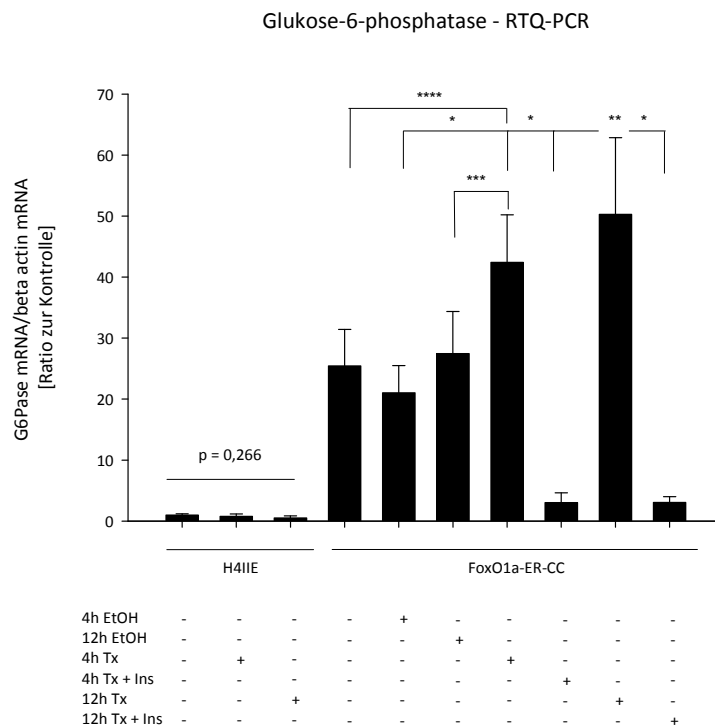


Abb. 3.4: Effekt von Stimulation mit Tx und Hemmung durch Ins auf die Glukose-6-Phosphatase Genexpression in der RTQ-PCR. *: statistisch signifikanter Unterschied der 4 h Tx-Proben ggü. 4 h Ethanol, 4 h Tx + Ins, 12 h Tx + Ins; **: statistisch signifikanter Unterschied der 12 h Tx-Proben zu den übrigen (außer 4 h Tx); ***: signifikanter Unterschied 4 h Tx ggü. 12 h EtOH (p=0,002); ****: signifikanter Unterschied 4 h Tx ggü. FoxO1a leer (p=0,004)

3.4.2 Coeruloplasmin

Coeruloplasmin (CP) ist das wichtigste Transportprotein für Kupfer im Organismus. Es wird in der Leber als einkettiges Polypeptid synthetisiert und nach Einbau von sechs Kupferatomen als alpha-2-Glykoprotein ins Blutplasma sezerniert. Details zu den physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften von CP finden sich in **Abschnitt 4.2.2**. Die Durchführung erfolgte analog zu den anderen Versuchen. Man stellt bei der Expression des Coeruloplasmins im Mikroarray (**Abb. 3.5**) nach vierstündiger Stimulation mit 4-Hydroxytamoxifen eine Induktion um Faktor 4,42 fest. Durch Insulin wird die Expression auf etwa 20 % (18,05 %) gesenkt.

In der **Abb. 3.6** ist als wesentliches Ergebnis folgendes festzuhalten: Die Kontrollzellen H4IIE zeigen auch hier keine signifikanten Unterschied bzgl. der Genexpression.

Die vier Stunden lang mit Tx stimulierten FoxO1a-Zellen zeigen gegenüber allen (außer den für 12 h mit Tx stimulierten) Proben eine signifikant höhere Expression von Coeruloplasmin ($p \leq 0,001$). Sie ist genau um Faktor 2 erhöht. Diese Induktion wird durch Insulin auf 1.25% des Maximums gehemmt. Die Induktion mit 12 h Tx ist hier geringer (Faktor 1,25), jedoch immer noch signifikant gegenüber den durch Insulin gehemmten Proben (Hemmung auf 20 % des 12 Stunden-Wertes).

Coeruloplasmin wird durch FoxO1a im Mikroarray und in der RTQ-PCR induziert und durch Insulin gehemmt. Die Induktion ist nach 4 h stärker als nach 12 h.

Ergebnisse

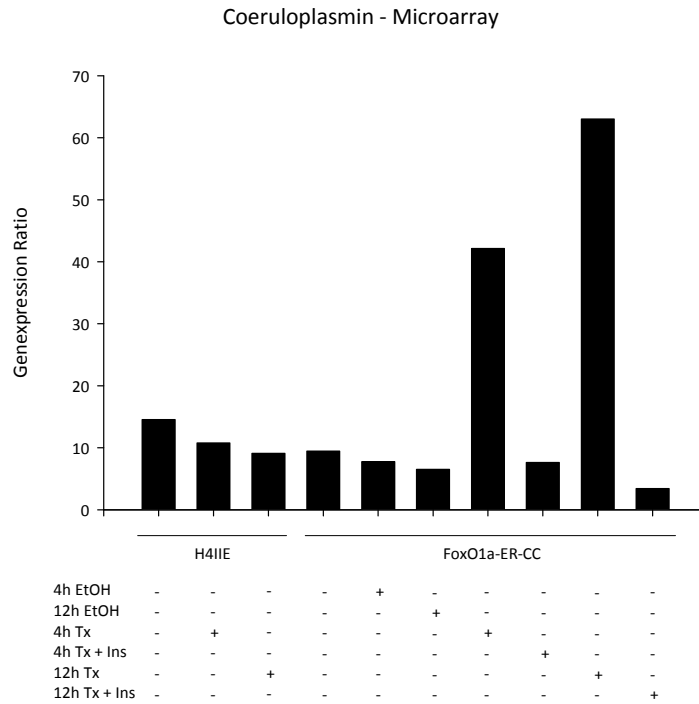


Abb. 3.5: Effekt von Stimulation mit 4-Hydroxytamoxifen und Hemmung durch Insulin auf die Genexpression des Coeruloplasmins im Mikroarray. Es zeigt sich eine starke Induktion durch Tx nach 4 h und 12 h, sowie eine starke Hemmung durch Ins.

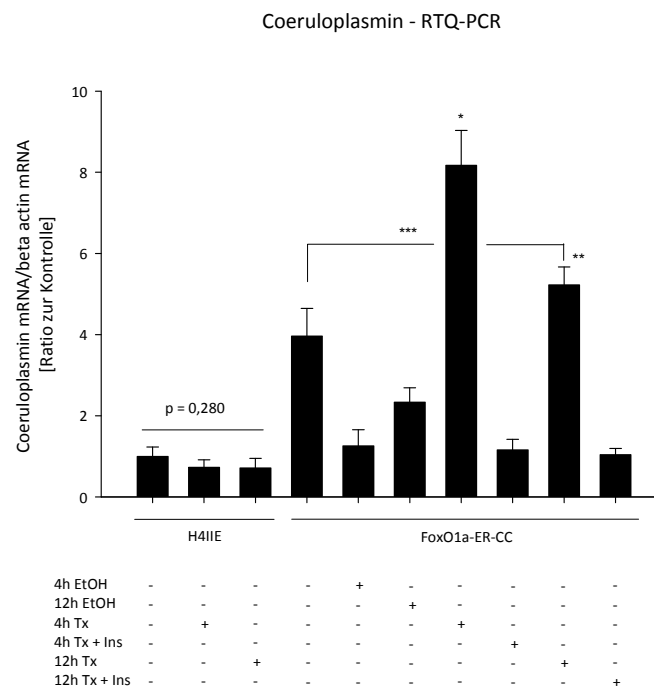


Abb. 3.6: Effekt von Stimulation mit 4-Hydroxytamoxifen und Hemmung durch Insulin auf die Genexpression des Coeruloplasmins in der RTQ-PCR. Es ist zu erkennen, dass die Kontrollzellen sich nicht signifikant voneinander bezüglich der Genexpression unterscheiden ($p=0,280$). *: signifikanter Unterschied von 4 h Tx stimulierten Proben ggü. allen anderen (außer 12 h Tx) ($p \leq 0,001$); **: signifikanter Unterschied der 12 h Tx ggü. allen anderen Proben (außer ggü. 4 h Tx); ***: signifikanter Unterschied der 12 h Tx ggü. FoxO1a leer ($p=0,002$)

3.4.3 Uridinphosphorylase 1

Die Uridinphosphorylase 1 (Upp 1) ist eines der Schlüsselenzyme im Pyrimidinstoffwechsel. Es katalysiert die reversible Phosphorolyse von Uridin zu Uracil und Ribose-1-phosphat und dient damit der Bereitstellung von Nucleinsäuren für die DNA-Synthese. Dies kann mittels *de novo*-Synthese oder durch so genannte „salvage pathways“ geschehen. Diese „salvage pathways“ stellen eine Art körpereigenen „Recyclingmechanismus“ aus Intermediärprodukten des Nucleinsäureabbaus dar, denn einige Gewebe sind nicht zur *de novo*-Synthese befähigt. Zudem wurde eine erhöhte Expression von Upp 1 in Tumorzellen gemessen (38) und es wurde gezeigt, dass sie beim Abbau von fluorierten Pyrimiden (wie 5-Fluorouracil, 5-FU) beteiligt ist, die als Chemotherapeutika eingesetzt werden.

In der **Abb. 3.7** wird der Einfluss von 4-Hydroxytamoxifen und Insulin auf die Expression der Uridinphosphorylase 1 im Mikroarray dargestellt. Nach vier Stunden Stimulierung mit Tx zeigt sich im Vergleich zur basalen Aktivität (FoxO1a unbehandelt) eine Induktion um Faktor 23,81. Durch vierstündige Zugabe von Insulin wird dies im Vergleich zu den vorangehenden Versuchen schwächer inhibiert. Die Expression beträgt 47,73 % der maximalen Aktivität.

Die **Abb. 3.8** zeigt mehrere Ergebnisse: Erstens gibt es hier überraschenderweise einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollzellen H4IIE, zumindest nach 12 h Stimulation. Die Relevanz dieses Befundes ist zu diskutieren.

Weiterhin zeigt sich eine sehr hohe Induktion nach 4 h Tx-Stimulation (um Faktor 16,5) mit deutlicher Signifikanz im Vergleich zu allen Proben ($p < 0,001$). Die 12 h Tx-stimulierten FoxO1a-Zellen sind ebenfalls signifikant erhöht (um Faktor 6,5) im Verhältnis zu den anderen (außer 4 h Tx) Zellproben. Die Hemmung der Genexpression (auf 21 bzw. 69 %) durch Insulin kann auch hier sehr gut beobachtet werden, nach 12 h ist der Unterschied nicht mehr ganz so groß, jedoch noch statistisch signifikant.

Die Uridinphosphorylase 1 wird durch FoxO1a stark induziert, in der RTQ-PCR ist der Effekt nach 4 h stärker als nach 12 h Stunden. Die Induktion kann durch Insulin gehemmt werden, auch hier zeigt sich nach 4 h eine stärkere Hemmung als nach 12 h.

Ergebnisse

Uridinphosphorylase 1 - Microarray

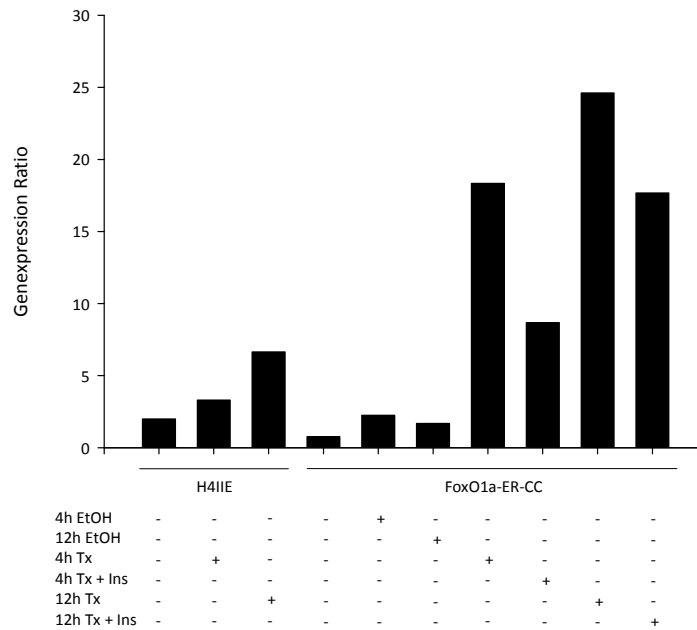


Abb. 3.7: Effekt von Stimulation mit 4-Hydroxytamoxifen und Hemmung durch Insulin auf die Genexpression der Uridinphosphorylase 1 im Mikroarray. In der Grafik sind auf der x-Achse die einzelnen Proben für die Messung der Genexpression der Uridinphosphorylase mit den entsprechenden experimentellen Bedingungen dargestellt, auf der y-Achse die gemessenen Werte für die absolute Genexpression.

Uridinphosphorylase 1 - RTQ-PCR

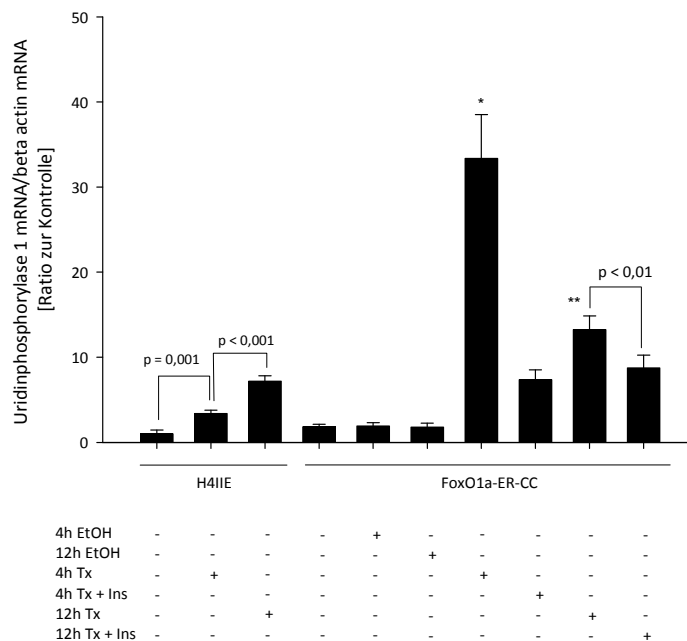


Abb. 3.8: Effekt von Stimulation mit Tx und Hemmung durch Ins auf die Genexpression der Uridinphosphorylase 1 in der RTQ-PCR. *gibt auch hier einen signifikanten Unterschied der 4 h Tx stimulierten Proben ggü. allen anderen Proben an; **gibt einen signifikanten Unterschied allen Proben (außer den 4 h Tx und 12 h Tx+ Ins stimulierten) gegenüber an. Beachte den Unterschied zwischen den Kontrollzellen.

3.4.4 Proteinphosphatase 1, regulatorische Untereinheit

Hierbei handelt es sich um kleines Protein, das die Funktion der Proteinphosphatase 1, einem wichtigen Enzym des Glykogenmetabolismus, modulieren kann. Die Proteinphosphatase 1 (PP1) ihrerseits dephosphoryliert (und aktiviert) die Glykogensynthase, das Enzym, das für das Anhängen zahlreicher Glukose-Moleküle bei der Herstellung von Glykogen verantwortlich ist. Es sind bislang etwa 50 kleine Bindungsproteine und regulatorische Untereinheiten der PP1 beschrieben worden, deren genaue Funktion noch nicht abschließend geklärt, insbesondere die genaue physiologische Wirkung von Insulin auf diese Interaktionspartner.

Die Analyse der Proteinphosphatase 1 mittels Mikroarray, dargestellt in **Abb. 3.9**, zeigt etwa eine Verdopplung der basalen Aktivität (Zunahme um Faktor 2,38) und eine Hemmung auf 34,65 % der maximalen Expression nach jeweils vierstündiger Behandlung mit Tx bzw. Tx und Ins. Es lässt sich hier zudem eine sehr homogene basale Aktivität der Proben feststellen, die nicht mit Hydroxytamoxifen oder Insulin behandelt wurden.

Abb. 3.10 verdeutlicht eine sehr eindrückliche Induktion in der Real-time PCR (Faktor 8,24) nach vierstündiger Stimulation durch Hydroxytamoxifen. Diese wird durch Insulin massiv gehemmt (auf 1.4 % des Maximums), sowohl nach vier Stunden als auch nach zwölf Stunden. Auch die Stimulation nach 12 h mit Hydroxytamoxifen ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zu den anderen Proben, die Induktion steigt um das Dreifache im Vergleich zum Basalwert der FoxO1a-Zellen und fällt auf 7,8 % durch Zugabe von Insulin ab.

Die regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 1 wird durch FoxO1a sehr stark induziert und durch Insulin sehr stark gehemmt. Der Effekt ist in der RTQ-PCR nach 4 h am größten, im Mikroarray ist die Induktion etwa gleich stark nach 4 h und 12 h.

Ergebnisse

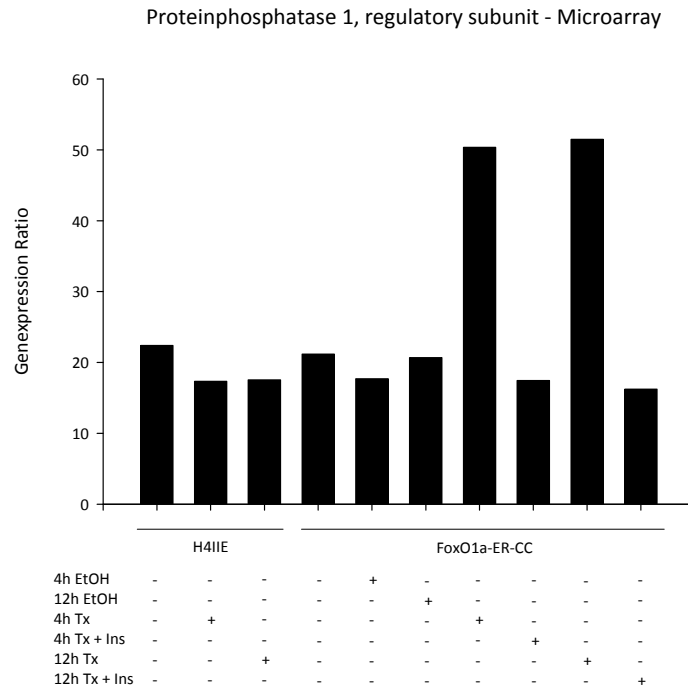


Abb. 3.9: Effekt von Stimulation mit Tx und Hemmung durch Ins auf die Genexpression der Proteinphosphatase 1, reg. subunit im Mikroarray. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied nach 4 h und 12 h Tx Stimulation sowie eine deutliche Hemmung durch Ins.

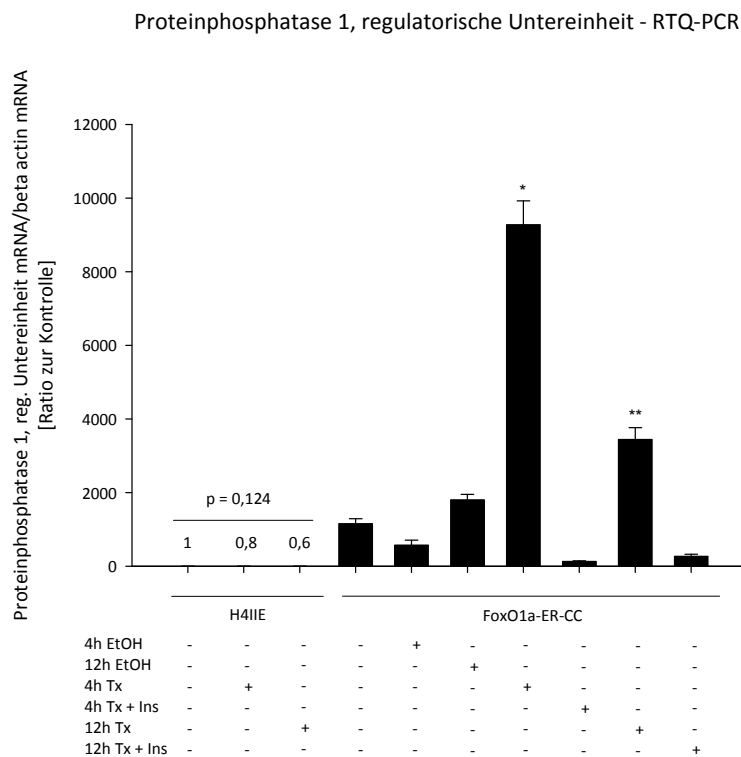


Abb. 3.10: Effekt von Stimulation mit Tx und Hemmung durch Ins auf die Genexpression der Proteinphosphatase 1, reg. subunit in der RTQ-PCR. Die Kontrollzellen zeigen keinen signifikanten Unterschied ($p=0,124$). *: signifikanter Unterschied nach 4 h Tx ggü. allen anderen Proben **: signifikanter Unterschied nach 12 h Tx im Vergleich zu den anderen Proben an (außer den 4 h Tx behandelten).

3.4.5 Serumparaoxonase 1 (Pon1)

Die Serumparaoxonase 1 (Pon1) übt eine protektive Wirkung gegenüber der Atherosklerose aus, vermittelt durch verminderte Lipidperoxidation von LDL-Lipoproteinen sowie Hydrolyse von Homocysteinthiolacton, einem Risikofaktor bei der Entstehung der Atherosklerose.

Bei der Untersuchung der Pon1 im Mikroarray zeigt sich eine starke Induktion durch Tx um den Faktor 5,35 nach vier Stunden. Dem gegenüber steht eine Hemmung auf erneut etwa 20 % (18,35 %) der maximalen Aktivität (s. **Abbildung 3.11**).

In **Abbildung 3.12** wird die deutliche Induktion der Pon1 auf das Doppelte gegenüber den Basalwerten gezeigt. Zudem kann man wiederum eine deutliche Hemmung durch Zugabe von Insulin beobachten, die Genexpression fällt auf 14,2 % ab. Auffallend sind hier die recht hohen basalen Werte der Zelllinie FoxO1a-ER-CC und die schwache Induktion 12 Stunden nach Hydroxytamoxifen-Gabe.

FoxO1a induziert die Pon1 sowohl im Mikroarray als auch in der RTQ-PCR. Der Effekt ist nach 4 h deutlich, nach 12 h nur gering ausgeprägt. Insulin hemmt die Induktion deutlich.

Ergebnisse

Serumparaoxonase - Microarray

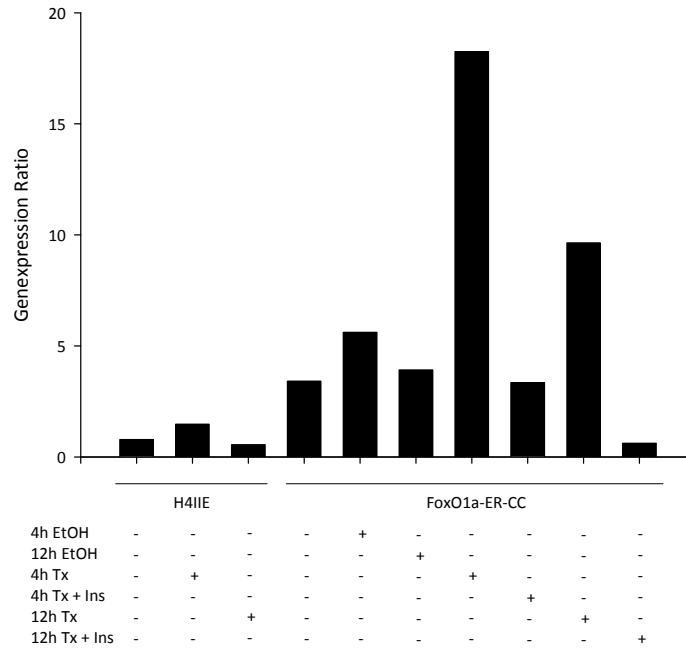


Abb. 3.11: Effekt von Stimulation mit Tx und Hemmung durch Ins auf die Genexpression der Serumparaoxonase 1 im Mikroarray. Es zeigt sich eine deutliche Induktion nach 4h Tx mit deutlicher Hemmung durch Ins. Nach 12h Tx ist der Effekt schwächer ausgeprägt.

Serumparaoxonase 1 - RTQ-PCR

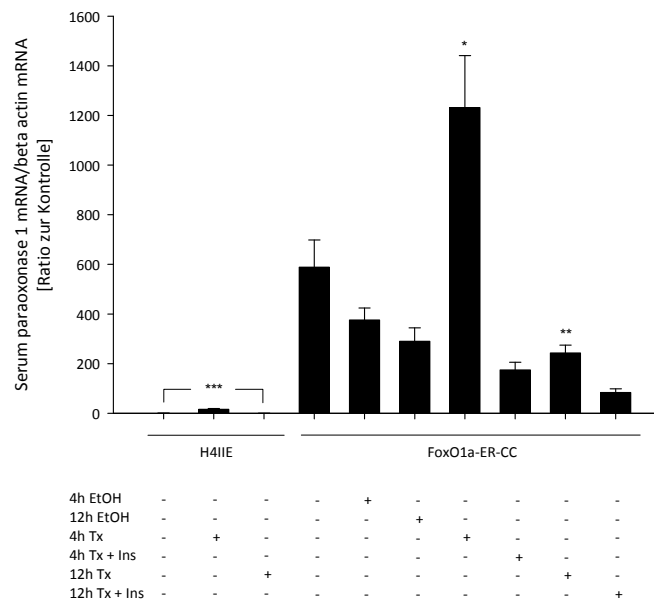


Abb. 3.12: Effekt von Stimulation mit Tx und Hemmung durch Ins auf die Genexpression der Serumparaoxonase 1 in der RTQ-PCR. *: signifikante Induktion nach vierstündiger Stimulierung mit Tx. **: signifikante Induktion nach 12h Stimulation mit Tx ggü. 12h Insulin. Gegenüber den anderen Proben zeigt sich kein signifikanter Unterschied. ***gibt einen statistisch signifikanten ($p < 0,001$) Unterschied zwischen den Kontrollzellen an. Man beachte hier jedoch die absoluten Zahlenwerte (1 vs. 15 vs. 1).

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt einerseits neuartige Resultate auf, an anderer Stelle wurde bereits Bekanntes zu Kontrollzwecken reproduziert. Dies diente der Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Systems und war Voraussetzung für die korrekte Durchführung und Interpretation der Folgeversuche. Es wurde die in **Abschnitt 1.7** formulierte Frage nach durch FoxO1a induzierten und möglicherweise an Krankheitsprozessen beteiligten Genen bearbeitet.

4.1 Methodische Anmerkungen

Bei Durchführung des Luziferase-Assays konnten die bei der initialen Beschreibung des FoxO1a-Reportergenkonstruktes erhaltenen Ergebnisse reproduziert werden. Die Glukose-6-Phosphatase stellt ein bekanntermaßen durch FoxO1a induziertes Enzym dar und wurde zum Vergleich mit den aus der Literatur bekannten Daten auch in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle herangezogen (31).

Die Hemmung durch Insulin führte bezüglich der Glukose-6-Phosphatase zu einer Verminderung der Aktivität auf etwa 20 %. Dies stellte ein wichtiges Instrument zur internen Qualitätskontrolle vor Durchführung des Mikroarrays dar, da dieser aus Kostengründen nur einmal durchgeführt werden konnte. Man kann demnach davon ausgehen, dass die erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten aus dem Mikroarray valide Ergebnisse darstellen. Auch im Mikroarray konnte man, wie in **Kapitel 3** dargestellt, eine Inhibierung durch Zugabe von Insulin auf etwa 20 % des Maximalwertes beobachten.

Dieses ist eine wichtige Voraussetzung zur korrekten Einordnung der erhaltenen Ergebnisse. Selbstverständlich erfordert ein Mikroarray eine weitere bestätigende Methode. Dies geschieht aus den im Methodenteil im Einzelnen erläuterten, technisch bedingten Gründen. Zu diesem Zweck ist die Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion (RTQ-PCR) gut geeignet, da hierbei in Echtzeit die Replikation des zu untersuchenden Gens nach Anlagerung spezifischer *primer* gemessen wird. Hauptfehlerquellen sind hierbei Verunreinigungen der Proben und/oder der Materialien, bei der Durchführung der Experimente konnte man allerdings feststellen, dass die verwendeten *primer* zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse lieferten. Dies wurde erleichtert durch die exakte Zuordnung der

Gene auf dem Mikroarray-Chip, d.h. jede Position auf dem Chip war durch den Hersteller dem jeweiligen vordefinierten *primer* zugewiesen worden.

4.2 Bewertung der Ergebnisse

Insgesamt wurden im Mikroarray 38 Kandidatengene identifiziert (s. **Tabelle 3.1**), die sowohl induziert wurden als auch eine funktionelle Relevanz im Sinne der Fragestellung hatten. Diese wurden mittels weitergehender Literaturrecherche zur weiteren Untersuchung mittels RTQ-PCR ausgewählt. Bestimmte Kandidatengene blieben dabei unberücksichtigt, so zum Beispiel Aquaporin 9, das Transportprotein für Glycerol in der Leber. Für dies war eine Induktion durch FoxO1a in der Literatur bereits beschrieben (19). Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich diejenigen Gene betrachtet, die durch Aktivierung von FoxO1a induziert wurden, nicht jedoch diejenigen, die durch FoxO1a reprimiert wurden. Diesbezüglich wären weitere Arbeiten interessant, um die Funktionen von FoxO1a noch genauer zu charakterisieren. Insgesamt wären nach denselben Auswahlkriterien sieben reprimierte Kandidatengene in Frage gekommen. Für die genaue Analyse wurden nur diejenigen 28 Kandidatengene betrachtet, die sehr stark, d. h. mindestens um Faktor 2, induziert wurden. Von diesen wurden 22 Kandidatengene mittels RTQ-PCR analysiert, die weiteren 6 fielen auf Grund ihres zugehörigen biologischen Prozesses aus der engeren Auswahl heraus. Die RTQ-PCR konnte nun für insgesamt fünf Kandidatengene die Ergebnisse des Mikroarray bestätigen. Im Einzelnen sind dies die schon erwähnte Glukose-6-Phosphatase, Coeruloplasmin, die Serumparaaxonase 1, die Uridinphosphorylase 1 sowie die regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 1.

4.2.1 Glukose-6-Phosphatase (G6Pase)

Die Diskussion dieser Ergebnisse erfolgt hier in verkürzter Form, da die Transaktivierung des G6Pases durch FoxO1a und die Hemmung dieses Effektes durch Insulin hinlänglich bekannt ist und hier als Positivkontrolle des Systems diente (39). Dies konnte in den in **Abschnitt 3.4.1** dargestellten Versuchen ebenfalls gezeigt werden. Foxo1a induziert die Expression der Glukose-6-phosphatase etwa um Faktor 1,5, die Zugabe von Insulin führt zu einer Hemmung auf 20 % des Maximalwertes.

4.2.2 Coeruloplasmin (CP)

Coeruloplasmin ist mit verschiedenen Funktionen assoziiert worden (40): Es dient als Transportprotein für Kupfer, ist beteiligt bei am Eisenstoffwechsel, der Angiogenese, sowie bei der Abwehr gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies mit seiner Oxidase-Eigenschaft. Es werden jedoch auch pro-oxidative Eigenschaften diskutiert.

Darüber hinaus ist CP ein so genanntes Akute-Phase-Protein; die Serumspiegel steigen bei Zuständen wie Verletzungen oder Infektionen an. ES konnten Veränderungen der Serumspiegel bei bestimmten Erkrankungen festgestellt werden. Allen voran beim Morbus Wilson, bei dem ein Mangel an CP vorliegt und es zur Einlagerung von Kupfer in verschiedenen Geweben mit sekundärer Schädigung derselben kommt . Daneben kommt es bei Erkrankungen wie der Acoeruloplasminämie (dem Fehlen von Coeruloplasmin) in vielen Fällen zur Entwicklung eines Typ 2-Diabetes mellitus als Erstsymptom (41).

Andererseits konnten einige Arbeiten erhöhte Coeruloplasmin-Spiegel bei Patienten mit Diabetes mellitus nachweisen (42). Zudem konnte CP als vaskulopathischer, d.h. gefäßschädigender Faktor, identifiziert werden. Die anti-oxidativen Eigenschaften scheinen bei Zuständen, die mit vermehrtem oxidativem Stress einhergehen, umgekehrt werden zu können (43). Dies geschieht vermutlich durch die gestörte Funktion des CP und der folgenden Akkumulation von Kupfer und Eisen in atherosklerotischen Plaques in Gefäßen (44). In unserer Arbeitsgruppe konnten wir erstmals die Regulation von Coeruloplasmin in H4IIE Ratten-Hepatomazellen und primären Ratten Hepatozyten zeigen (45).

4.2.3 Uridinphosphorylase 1 (Upp1)

Die Uridinphosphorylase 1 ist eines der Schlüsselenzyme im Metabolismus der Pyrimidine. Es katalysiert die Reaktion (reversible Phosphorolyse) von Uridin zu Uracil und Ribose-1-phosphat. Die klinische Bedeutung des Enzyms ist in den letzten Jahren vermehrt untersucht worden. Das Enzym scheint auch bei der Reaktion von Tumorzellen auf die Applikation bestimmter Chemotherapeutika beteiligt zu sein, z.B. Capecitabine oder 5-Fluorouracil als Vertreter der Fluoropyrimidin-Nukleosid Chemotherapeutika. Es werden bereits Inhibitoren des Enzyms entwickelt, um normales Gewebe durch gesteigerte Uridinkonzentrationen vor den toxischen Effekten der erwähnten Substanzen zu schützen (46). Zudem wurden in einigen Arbeiten die Konzentrationen des Enzyms in gesundem Gewebe und in Tumorzellen

gemessen. Die Enzymkonzentration scheint bei bestimmten Tumoren einen gewissen prognostischen Wert zu haben (38, 47). Die Regulation der Uridinphosphorylase durch FoxO1a ist noch nicht beschrieben worden. Die therapeutische Modifikation von FoxO-Proteinen könnte eine Bedeutung gewinnen bei der Sensitivität gegenüber und Effizienz von Chemotherapeutika (48). Ribose-1-phosphat kann im Hexosemonophosphatweg wieder zu Ribose-5-phosphat isomerisiert werden. Diese Reaktion stellt im Prinzip Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP+) für Oxidoreduktasen zur Verfügung. Über diesen integrativen Mechanismus ist die Regulation der Upp1 durch FoxO1a bedeutsam für die Bereitstellung von Kofaktoren für antioxidativ wirkende Enzyme.

4.2.4 Proteinphosphatase 1, regulatorische Untereinheit 6 (PP1R6)

Die Proteinphosphatase 1 (PP1) ist ein Enzym, das die Aktivität der Glykogensynthase (GS) verändern kann. Die GS katalysiert die Verknüpfung einzelner Glukose-Moleküle zu Glykogen. Diese Aktivierung erfolgt durch die PP1.

Die PP1 ist eine Serin/Threonin-Phosphatase, die eine katalytische Untereinheit enthält (PP1c). Diese katalytische Untereinheit ist wichtiger Interaktionspartner für kleine Moleküle. Es existieren mehr als 50 bekannte Bindungspartner der PP1c, die so genannten regulatorischen Untereinheiten (49). Die Identifikation der in dieser Arbeit verwendeten regulatorischen Untereinheit wurde erschwert durch die Tatsache, dass viele Untereinheiten in ihrer Funktion noch nicht genau charakterisiert worden sind. Die im Mikroarray induzierte „Proteinphosphatase 1, regulatorische Untereinheit“ wurde vom Hersteller des Arrays für die sich anschließende RTQ-PCR nicht genauer beschrieben. Bekannt war jedoch, dass sie auf Chromosom 17 (der Ratte, *R. norvegicus*) kodiert ist. Zudem konnten durch die Assay-Suche auf der Internetseite des Herstellers (Applied Biosystems) die verwendeten Basenpaare gefunden werden (NCBI: *Chromosome 17* 28478169 – 28480448). Die weitere Suche in der „*Rat Genome Database*“ (<http://rgd.mcw.edu>) nach regulatorischen Untereinheiten und Vergleich der angegebenen Basenpaare der PP1 ergab, dass es sich bei dem angegebenen Genprodukt um die regulatorische Untereinheit 3D (auch bekannt als R6) handelt. Es konnte eine Übereinstimmung der Basenpaare auf dem Chromosom an der folgenden Position gefunden werden: 28478722 – 28480491.

Diese Untereinheit wurde erstmalig im Jahr 1997 von Armstrong *et al.* beschrieben (25). Insgesamt gibt es vier regulatorische Untereinheiten, die eine Rolle im Glykogenmetabolismus spielen (G_M /PPP1R3, G_L /PPP1R4, PPP1R5/PTG und PPP1R6) (26). Die Aktivitäten dieser Untereinheiten sind bei Versuchstieren, die einen diabetischen Phänotyp aufweisen, deutlich reduziert und führen zu einer verminderten Aktivität der Glykogensynthase und damit verminderten Glykogensynthese. Die R6-Untereinheit scheint, bisherigen Untersuchungen zufolge, unabhängig von Insulin reguliert zu werden (50-51). Auf Grund der in **Kapitel 3** aufgezeigten Ergebnisse kann man hier jedoch mutmaßen, dass Insulin zumindest indirekt (via FoxO1a) Einfluss auf die Regulation auch der R6-Untereinheit nehmen kann. Die genaue Funktion der PP1R6 ist bis dato unbekannt, es kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, ob die PP1R6 eine inhibitorische oder aktivierende Funktion hat. Aktivierung der Funktion der PP1 würde bedeuten, dass die Glykogensynthese gesteigert würde; Inhibition würde zu verminderter Glykogensynthese beitragen und damit eine pro-diabetische Wirkung haben. Genauere Untersuchungen zur Charakterisierung der regulatorischen Untereinheiten des Glykogenmetabolismus könnten mittels FoxO1a-Hemmung günstige Angriffspunkte zur Therapie des Diabetes mellitus bieten (z. B. durch Verminderung eine Nüchternhyperglykämie).

4.2.5 Serumparaoxonase 1 (Pon1)

Die Pon1 wird in der Leber gebildet, sie gehört zur Gruppe der Paraoxonasen. Es sind bislang drei Isoenzyme bekannt, Pon1, Pon2 und Pon3. Pon1 ist das am besten untersuchte Enzym, es weist eine Esterase-Aktivität auf, Pon2 und Pon3 dagegen Laktanase-Aktivität.

Pon1 und Pon3 sind an die Cholesterol-Transportproteine HDL („*high density lipoprotein*“) gebunden. Diese transportieren in der Peripherie anfallendes Cholesterol zurück in die Leber, wo dieses weiter verstoffwechselt werden kann. Hohe Konzentrationen von HDL sind mit einem Schutz vor Atherosklerose verbunden und einem niedrigeren Risiko für deren Folgeerkrankungen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall (52). Wie in **Kapitel 3** kurz beschrieben, vermindert die Pon1 zudem die Lipidperoxidation in LDL („*low density lipoproteins*“) durch Phospholipase A2-Aktivität und Hydrolyse von Homocysteinthiolacton. Durch diese Mechanismen wird ein gewisser Schutz gegenüber der Entstehung von Gefäßveränderungen

geboden. Niedrige Konzentrationen von Pon1 gehen mit einem erhöhten Atherosklerose-Risiko einher (28).

In den hier vorgelegten Experimenten konnte eine gesteigerte Expression von Pon1 nach Aktivierung von FoxO1a gezeigt werden. Das ist deswegen interessant, weil FoxO1a auch pro-diabetische Funktionen ausübt. Diabetes mellitus ist im Rahmen des metabolischen Syndroms mit einem erhöhten Risiko für Atherosklerose und deren negativen Auswirkungen assoziiert. Dieser Befund unterstreicht die diversen Funktionen von FoxO1a, das einerseits pro-diabetisch und damit negativ wirkt, andererseits gleichzeitig schützende Enzyme wie die Pon1 (und andere) zu induzieren vermag.

5 Zusammenfassung der vorgelegten Daten und deren Interpretation

Aus der Literatur ist bekannt, dass FoxO1a einerseits, um dies noch einmal zu betonen, eindeutig pro-diabetische Funktionen hat (Glukoneogenese), andererseits auch protektiv gegenüber oxidativem Stress wirken kann durch die Induktion schützender Enzyme wie der Mn-SOD und Selenoprotein P (SeP). In dieser Arbeit konnte diese duale Rolle von FoxO1a durch die Entdeckung neuer, durch FoxO1a induzierter Gene, bestätigt werden.

Coeruloplasmin

Die Induktion von FoxO1a durch den verwendeten experimentellen Ansatz führt zu einer gesteigerten mRNA-Expression von Coeruloplasmin um den Faktor 4,42 nach 4 Stunden im Microarray und Faktor 2 in der RTQ-PCR. Diese erreichte statistische Signifikanz. Der Effekt ist durch Hinzugabe von Insulin umkehrbar, die Expression von Coeruloplasmin kann auf 20 % (Microarray) bzw. 1,25 % (RTQ-PCR) des Maximalwertes gehemmt werden. Die genaue Bedeutung von Coeruloplasmin beim Diabetes mellitus bleibt noch zu definieren, denkbar ist jedoch eine Rolle als Biomarker in der Früherkennung (40, 43). Zudem werden Coeruloplasmin sowohl anti-oxidative als auch vaskulopathische Funktionen zugeschrieben (43). Als Akute-Phase-Protein ist es Marker einer Inflammation.

Uridinphosphorylase 1

FoxO1a führt nach 4 Stunden Induktion zu einer um Faktor 23,81 bzw. 16,5 gesteigerten Expression der Uridinphosphorylase 1, Insulin führt zur Hemmung. Es liegen dann lediglich noch 47,73 % bzw. 21 % der maximalen Aktivität vor (Microarray bzw. RTQ-PCR). Die Ergebnisse erreichten statistische Signifikanz. Die Uridinphosphorylase 1 ist bei einigen Tumorarten gesteigert, eine Induktion durch FoxO1a (ebenfalls bei bestimmten Tumoren in erhöhter Konzentration vorliegend) könnte ein besseres Ansprechen auf bestimmte Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil anzeigen.

Proteinphosphatase 1, regulatorische Untereinheit 6 (PP1R6)

FoxO1a-Induktion steigert die Expression der PP1R6 um Faktor 2,38 und 8,24 in Microarray und RTQ-PCR nach vier Stunden. Eine Hemmung durch Insulin vermindert diese auf 34,65 % bzw. 1,4 % des Maximums. Der Effekt ließ sich in allen Experimenten zeigen und war

statistisch signifikant. Über die beschriebene regulatorische Untereinheit der PP1 ist leider derzeit noch nicht genug bekannt, um positive oder negative Effekte zu assoziieren. Die gezeigten Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die Untereinheit R6 zumindest zum Teil durch insulinabhängige Mechanismen (da durch FoxO1a induziert) reguliert wird, was vorher nicht bekannt war.

Serumparaoxonase 1 (PON1)

Die PON1 wird nach Aktivierung des Transkriptionsfaktors FoxO1a um Faktor 5,35 und 2 induziert, durch Insulingabe wird die maximale Expression auf 18,35 % und 14,2 % verringert (Microarray vs. RTQ-PCR). Die Daten sind statistisch signifikant. Gesteigerte Konzentration der PON1 sind als protektiv gegenüber der Atherosklerose beschrieben worden.

FoxO1a ist ein interessanter Transkriptionsfaktor mit divergenten Funktionen. Einerseits kann er zu einer Verstärkung diabetischer Effekte beitragen (G6Pase, möglicherweise PP1R6?), andererseits zur gesteigerten Expression schützender Enzyme (CP, Pon1) als Reaktion auf oxidativen Stress, den gemeinsamen Pathomechanismus diabetischer Komplikationen führen.. In der Zukunft wäre es interessant, genauer zu untersuchen, wovon die differentielle Aktivierung des Transkriptionsfaktors abhängt, um gezielt in bestimmte pathophysiologische Prozesse eingreifen zu können.

6 Anhang

Genprodukt	H4IIE		Unstimuliert		4 h ER0H		12 h ER0H		FoxO1a		12 h Tx + Ins	
	Unstimuliert	4 h Tx	12 h Tx	Unstimuliert	4 h ER0H	12 h ER0H	4 h Tx	12 h Tx	4 h Tx + Ins	12 h Tx	12 h Tx + Ins	
SIGNALTRANSDUKTION / REZEPTORPROTEINE												
Proteinphosphatase 1, regulatory subunit	22,4	17,34	17,54	21,18	17,69	20,67	50,36	51,49	17,45	17,45	16,23	
Platelet glycoprotein IV (CD36 Antigen)	4,26	1,47	3,80	17,86	11,87	8,63	34,62	30,94	16,29	16,29	15,52	
MIG-10	8,91	6,02	5,43	11,14	9,68	7,51	24,94	34,17	19,58	19,58	23,85	
Retinoic acid receptor (RXR)	1,87	0,67	1,59	0,32	1,4	0,64	3,2	3,51	0,36	0,36	0,71	
RAB30	13,36	9,67	12,11	27,52	31,01	29,89	80,75	135,56	29,13	135,56	23,38	
Dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein (DARPP-32)	0,38	0,19	0,46	0,88	0,45	0,60	1,94	1,19	0,79	0,79	0,3	
Alpha-2-Macroglobulin	0,62	0,49	1,49	0,92	0,88	0,95	2,18	1,83	1,69	1,69	1,17	
G Protein-coupled receptor 1	0,72	0,91	1,11	0,64	0,61	0,68	1,64	1,9	2,09	2,09	0,65	
Proto-oncogene src (SRC/YES/YRK/FYN/FGFR) (PTK GROUP I)	0,81	0,73	1,73	1,03	0,71	0,89	2,66	2,21	0,83	0,83	1,45	
Pancreatis-associated protein	15,39	8,42	13,95	47,02	41,60	53,88	114,11	200,06	48,74	48,74	12,17	
Map kinase kinase 6	16,79	12,87	17,11	21,51	19,75	27,32	44,04	36,64	6,67	6,67	5,98	
KOHLNHYDRATMETABOLISMUS												
Isocitrate dehydrogenase (NADP dependent)	183,39	271,72	264,28	715,86	712,00	478,64	1100,01	1159,34	282,69	282,69	221,04	
Glukose-6-phosphatase	7,84	4,99	6,1	416,19	268,85	633,7	633,7	625,18	118,27	118,27	52,42	
ZELLSTRUKTURPROTEINE												
Leiomodin	1,03	1,12	1,12	1,05	0,63	1,62	3,54	3,29	0,79	0,79	0,76	
F-spondin	0,51	0,91	1,96	0,52	0,57	0,68	4,93	4,93	0,76	0,76	1,24	
RHO/RAC Guanine nucleotide exchange factor related protein	0,72	0,42	1,34	0,63	0,71	0,7	2,39	2,16	1,15	1,15	1,71	
IMMUNSYSTEM												
Complement component 4 binding protein, beta	3,87	1,24	2,00	12,65	20,25	11,22	39,81	40,24	15,76	15,76	1,96	
LIPIDMETABOLISMUS												
Sphingosine-1-phosphate lyase 1	15,80	12,74	15,38	15,99	13,32	10,04	37,98	37,12	16,16	16,16	20,71	
Cytochrome P450, subfamily 2	5,67	5,61	5,33	4,57	2,51	2,31	10,97	14,67	2,92	2,92	2,11	
Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 32	1,26	0,49	0,66	2,54	4,54	4,12	11,51	17,09	4,26	4,26	0,71	
Sterol-O-Acyltransferase	1,78	0,83	0,96	3,77	3,20	3,26	7,05	6,56	7,35	7,35	6,42	
NUKLEINSÄUREMETABOLISMUS												
Uridine phosphorylase	1,99	3,31	6,65	0,77	2,25	1,69	18,34	24,61	8,68	8,68	17,67	
GTP cyclohydrolase 1	6,10	8,46	11,29	356,56	454,05	389,42	888,6	1043,8	448,9	448,9	611,09	

Anhang

Genprodukt	H4IIE		Unstimuliert		12 h Tx	Unstimuliert	4 h EtOH	12 h EtOH	FoxO1a		12 h Tx	12 h Tx + Ins
	4 h Tx	Unstimuliert	4 h Tx	Unstimuliert					4 h Tx	4 h Tx + Ins		
TRANSKRIPTIONSFAKTOREN												
FOXP1 Forkhead Transcription Factor		67,93	63,84	66,76	58,93		31,56	62,14	280,36	29,69	168,85	35,41
TRANSPORTPROTEINE												
Cation Transport Protein Chac-Related		37,41	32,18	39,84	20,18		22,75	23,84	74,17	31,61	66,63	27,82
Probasin		2,65	2,55	1,95	1,71		0,50	1,11	5,43	0,69	6,52	0,49
Carnitine palmitoyltransferase 1, liver		57,58	95,37	89,42	173,18		134,34	137,48	333,04	82,9	544,98	49,79
Calbindin 3		1,26	0,76	2,54	10,43		10,76	5,82	32,88	18,21	18,61	14,54
Solute carrier family 22 (Organic cation transporter), member 4		5,88	6,47	5,92	15,28		12,56	11,29	25,01	14,94	20,13	14,3
Aquaporin 9		56,23	40,74	53,09	1240,73		958,51	968,66	1832,43	684,79	2235,52	623,06
OXIDOREDUKTASEN												
Serum paraoxonase/arylesterase 2		0,78	1,47	0,55	3,41		5,61	3,92	18,26	3,35	9,64	0,61
Coeruloplasmin		14,55	10,77	9,10	9,46		7,76	6,51	42,16	7,61	63,01	3,43
Aldehyde oxidase 1		0,84	1,73	0,60	3,7		4,47	4,90	7,21	2,04	7,17	0,74
UNBEKANNTE / NICHT-KLASSIFIZIERTE FUNKTION												
ADP-Ribosylation factor-related		9,01	11,97	8,50	11,22		14,36	11,97	27,06	12,5	22,45	14,57
Transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1		101,21	88,41	93,89	110,62		63,04	151,06	306,65	22,25	426,68	43,17
Melanocyte-specific gene 1 protein		20,12	19,69	24,81	15,98		22,41	18,80	164,33	41,56	265,3	82,32
Transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1		10,12	6,51	10,31	9,36		5,21	12,04	22,56	1,55	20,71	4,64
NIPSNAP		334,19	295,29	327,71	582,77		532,07	510,09	936,61	431,59	1074,41	400,09

7 Literaturverzeichnis

1. Newgard CB, McGarry JD. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:689-719.
2. Straub SG, Sharp GW. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev.* 2002;18(6):451-63.
3. Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med.* 2005;22(6):674-82.
4. Barthel A, Schmol D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(4):E685-92.
5. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature.* 2005;436(7049):356-62.
6. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.* 2005;307(5708):426-30.
7. Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, et al. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(30):10610-5.
8. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548-56.
9. Kaufmann E, Knochel W. Five years on the wings of fork head. *Mech Dev.* 1996;57(1):3-20.
10. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 2000;14(2):142-6.
11. Walter PL, Steinbrenner H, Barthel A, Klotz LO. Stimulation of selenoprotein P promoter activity in hepatoma cells by FoxO1a transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;365(2):316-21.
12. Brent MM, Anand R, Marmorstein R. Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification. *Structure.* 2008;16(9):1407-16.
13. Nakae J, Park BC, Accili D. Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J Biol Chem.* 1999;274(23):15982-5.
14. Rena G, Prescott AR, Guo S, Cohen P, Unterman TG. Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochem J.* 2001;354(Pt 3):605-12.
15. Barthel A, Schmol D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(4):183-9.
16. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature.* 2002;419(6904):316-21.
17. Nemoto S, Finkel T. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science.* 2002;295(5564):2450-2.
18. Steinbrenner H, Bilgic E, Alili L, Sies H, Brenneisen P. Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. *Free Radic Res.* 2006;40(9):936-43.

19. Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powell DR, Le J, et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem.* 2006;281(15):10105-17.
20. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-25.
21. Manolopoulos KN, Klotz LO, Korsten P, Bornstein SR, Barthel A. Linking Alzheimer's disease to insulin resistance: the FoxO response to oxidative stress. *Mol Psychiatry.* 2010;15(11):1046-52.
22. Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol.* 2006;5(1):64-74.
23. Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes.* 2004;53(2):474-81.
24. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010;362(4):329-44.
25. Armstrong CG, Browne GJ, Cohen P, Cohen PT. PPP1R6, a novel member of the family of glycogen-targeting subunits of protein phosphatase 1. *FEBS Lett.* 1997;418(1-2):210-4.
26. Armstrong CG, Doherty MJ, Cohen PT. Identification of the separate domains in the hepatic glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 that interact with phosphorylase a, glycogen and protein phosphatase 1. *Biochem J.* 1998;336 (Pt 3):699-704.
27. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(5):412-9.
28. Soran H, Younis NN, Charlton-Menys V, Durrington P. Variation in paraoxonase-1 activity and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2009;20(4):265-74.
29. Microarray NCBI Webpage; abrufbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>. (letzter Zugriff am 04.01.2013)
30. Applied Biosystems. Guide To Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR (Part #: 4371095) 2004.
31. Barthel A, Orth HM, Kruger KD, Schmoll D, Joost HG. Construction and characterization of a conditionally active construct of the insulin-regulated forkhead transcription factor FKHR. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2002;110(6):304-9.
32. Promega. Technical Bulletin Luciferase Assay System (Part# TB281) 2006.
33. Qiagen. RNeasy Mini Handbook. 2006.
34. Applied Biosystems. High-Capacity DNA Archive Kit (Part #: 4322169) 2000.
35. Applied Biosystems; abrufbar unter: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-probe-based-gene-expression-analysis/taqman-gene-expression-assay-selection-guide.html>. (letzter Zugriff am 04.01.2013)
36. Applied Biosystems. TaqMan Gene Expression Assays Protocol (Part #: 433458) 2004.
37. Glantz SA. Primer of biostatistics. 6th Edition ed: McGraw-Hill; 2005.
38. Miyashita H, Takebayashi Y, Eliason JF, Fujimori F, Nitta Y, Sato A, et al. Uridine phosphorylase is a potential prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2002;94(11):2959-66.
39. Barthel A, Schmoll D, Kruger KD, Bahrenberg G, Walther R, Roth RA, et al. Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285(4):897-902.

40. Healy J, Tipton K. Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm.* 2007;114(6):777-81.
41. Miyajima H, Nishimura Y, Mizoguchi K, Sakamoto M, Shimizu T, Honda N. Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration. *Neurology.* 1987;37(5):761-7.
42. Daimon M, Susa S, Yamatani K, Manaka H, Hama K, Kimura M, et al. Hyperglycemia is a factor for an increase in serum ceruloplasmin in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1998;21(9):1525-8.
43. Shukla N, Maher J, Masters J, Angelini GD, Jeremy JY. Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor? *Atherosclerosis.* 2006;187(2):238-50.
44. Stadler N, Lindner RA, Davies MJ. Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(5):949-54.
45. Leyendecker M, Korsten P, Reinehr R, Speckmann B, Schmoll D, Scherbaum WA, et al. Ceruloplasmin Expression in Rat Liver Cells is Attenuated by Insulin: Role of FoxO Transcription Factors. *Horm Metab Res.* 2011;43(4):268-74.
46. Renck D, Ducati RG, Palma MS, Santos DS, Basso LA. The kinetic mechanism of human uridine phosphorylase 1: Towards the development of enzyme inhibitors for cancer chemotherapy. *Arch Biochem Biophys.* 2010;497(1-2):35-42.
47. Kawamura K, Takiguchi N, Wada A, Takenobu H, Kimura H, Soda H, et al. Up-regulated expression of the uridine phosphorylase gene in human gastric tumors is correlated with a favorable prognosis. *Anticancer Res.* 2006;26(6C):4647-51.
48. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. OutFOXOing disease and disability: the therapeutic potential of targeting FoxO proteins. *Trends Mol Med.* 2008;14(5):219-27. PMID: 2572150.
49. Cohen PT. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 2):241-56.
50. Browne GJ, Delibegovic M, Keppens S, Stalmans W, Cohen PT. The level of the glycogen targeting regulatory subunit R5 of protein phosphatase 1 is decreased in the livers of insulin-dependent diabetic rats and starved rats. *Biochem J.* 2001;360(Pt 2):449-59.
51. Doherty MJ, Cadefau J, Stalmans W, Bollen M, Cohen PT. Loss of the hepatic glycogen-binding subunit (GL) of protein phosphatase 1 underlies deficient glycogen synthesis in insulin-dependent diabetic rats and in adrenalectomized starved rats. *Biochem J.* 1998;333 (Pt 2):253-7.
52. Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 17th Edition ed: McGraw-Hill; 2008.

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Andreas Barthel für die freundliche Überlassung des Themas der Dissertation bedanken. Durch seine aufmunternden Worte, seine Geduld und fachliche Kompetenz trug er wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum, dem Direktor der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie, danke ich für die Bereitstellung der Logistik und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Labor, die essentiell zur erfolgreichen Durchführung der Arbeit waren.

Dr. med. Konstantinos Manolopoulos, dem Betreuer meiner Arbeit, danke ich für die Hilfestellung bei den Experimenten zu Beginn der Arbeit und die kritische Durchsicht des Manuskripts sowie die konstruktiven Verbesserungsvorschläge beim Verfassen der Arbeit.

Frau Annette Tries, ehemals BTA im Labor, danke ich für die Unterstützung bei den Zellkulturexperimenten und den Gelelektrophoresen.

Bei Dr. med. Matthias Haase bedanke ich mich sehr herzlich für die Hilfe und die guten Tipps zum *troubleshooting* bei der Durchführung der Real-time PCRs.

Meinen Eltern, Dr. med. Friedrich W. Korsten und Gabriele Korsten, danke ich für die großzügige Förderung meines Medizinstudiums und die Durchsicht des Manuskripts.

Meinen Geschwistern, Dr. rer. nat. Anne Korsten und M. A. David Korsten, danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit, meiner Schwester insbesondere für die hilfreichen Tipps bezüglich des Methodenteils.

Schließlich danke ich meiner Ehefrau, Dr. Linda Lucia Vázquez Jimenez, für Ihre stete Unterstützung und Aufmunterung während der Abfassung großer Teile der Arbeit und Ihre Geduld, da sie während dieser Zeit auf viele gemeinsame Stunden verzichten musste.

Lebenslauf

Lebenslauf

Ausbildung	2001	Abitur (Note 1,5)	
	07/2001 – 04/2002	Ersatzdienst	
	07 – 08 / 2002	Sprachkurs (Spanisch) in Ecuador	
	05 – 06 / 2002	Krankenpflegepraktikum im KKH Grevenbroich	
Studium	10 / 2002	Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf	
	09 / 2004	Ärztliche Vorprüfung (Note 2,0)	
	02 / 2005	Beginn der Dissertation zum Thema „Differentielle Genexpression durch den prodiabetischen Transkriptionsfaktor FoxO1a“ in der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie, Universitätsklinik Düsseldorf	
	Teilnahme an den Kursen (Leitung: Dr. med. Matthias Hofer, MME, MPH): „Sonographie“ „Computertomographie“ „Röntgen-Thorax Diagnostik“		
	20.11.2008	2. Ärztliche Prüfung (Note 2,5)	
	15.12.2008	Approbation als Arzt	
	Famulaturen / Praktisches Jahr	08 / 2005	Famulatur Gastroenterologie, EVK Düsseldorf
		08 / 2006	Famulatur Interdisziplinäre Intensivmedizin, Klinik m.S. Nephrologie und intern. Intensivmedizin, Campus Virchow Klinikum, Berlin
		09 / 2006	Famulatur Gynäkologie und Geburtshilfe, Hospital Carlos Andrade Marin, Quito, Ecuador
		03 / 2007	Famulatur Internistische Ambulanz, BG Kliniken Bergmannsheil, Bochum
08 / 2007 – 12 / 2007		1. Terial des Praktischen Jahres (Chirurgie), Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf (Gerresheim)	
12 / 2007 – 04 / 2008		2. Terial des Praktischen Jahres (Gynäkologie und Geburtshilfe), Hospital Civil „Juan I. Menchaca“, Guadalajara, Mexiko	

04 / 2008 – 3. Terial des Praktischen Jahres (Innere Medizin),
07 / 2008 Hospital Civil „Juan I. Menchaca“, Guadalajara, Mexiko

Vorträge / Veröffentlichungen

Kongressbeiträge

03 / 2006 Kurzvortrag beim Kongress der Deutschen
Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) in Essen
04 / 2006 Posterpräsentation beim Kongress der Deutschen
Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) in Wiesbaden
09 / 2009 Posterpräsentation beim Kongress der Deutschen
Gesellschaft für Nephrologie in Göttingen
09 / 2011 Vortrag beim Kongress der Deutschen Gesellschaft
Interdisziplinäre Notfall- und Akutmedizin (DGINA) in
Göttingen
09 / 2012 Posterpräsentation beim Kongress der Deutschen
Gesellschaft für Rheumatologie in Bochum
09 / 2012 Posterpräsentation beim Kongress der Deutschen
Gesellschaft für Interdisziplinäre Notfall- und
Akutmedizin (DGINA) in Berlin

Publikationen

2011

1. Patschan D*, **Korsten P***, Behlau A, Vasko R, Heeg M, Sweiss N, Muller GA, Koziolk M. Idiopathic combined, autoantibody-mediated ADAMTS-13/factor H deficiency in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome in a 17-year-old woman: a case report. **J Med Case Reports. 2011 Dec 29;5(1):598.**
2. Vasko R, Groenewold F, **Korsten P**, Müller GA, Koziolk M. Plasmapheresis-refractory thrombotic microangiopathy in a hematopoietic stem cell transplant recipient. **Ther Apher Dial. 2011 Oct;15(5):507-9.**
3. Patschan SA, Patschan D, Temme J, **Korsten P**, Wessels JT, Koziolk M, Henze E, Mueller GA. Endothelial progenitor cells (EPC) in sepsis with acute renal dysfunction (ARD). **Crit Care. 2011 Mar 11;15(2):R94.**
4. Leyendecker M*, **Korsten P***, Reinehr R, Speckmann B, Schmoll D, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A, Klotz LO. Ceruloplasmin Expression in Rat Liver Cells is Attenuated by Insulin: Role of FoxO Transcription Factors. **Horm Metab Res. 2011 Feb 17**
5. Sweiss NJ, Lower EE, **Korsten P**, Niewold TB, Favus MJ, Baughman RP. Bone Health Issues in Sarcoidosis. **Curr Rheumatol Rep. 2011 Feb 16**

2010

1. Manolopoulos KN, Klotz LO, **Korsten P**, Bornstein SR, Barthel A. Linking Alzheimer's disease to Insulin Resistance: The FoxO Response to Oxidative Stress. **Mol Psychiatry. 2010 Nov;15(11):1046-52**

Lebenslauf

2. **Korsten P**, Sweiss NJ, Nagorsnik U, Niewold TB, Gröne HJ, Gross O, Müller GA. Drug-induced granulomatous interstitial nephritis in a patient with ankylosing spondylitis during therapy with Adalimumab. **Am J Kidney Dis.** 2010 Oct 23
3. Sweiss NJ, Patterson K, Sawaqed R, Jabbar U, **Korsten P**, Hogarth K, Wollman R, Garcia JGN, Niewold TB, Baughman RP. Rheumatologic manifestations of Sarcoidosis. **Semin Respir Crit Care Med.** 2010 Aug;**31(4):463-73. Epub 2010 Jul 27**

2009

1. Mues C, Zhou J, Manolopoulos KN, **Korsten P**, Schmoll D, Klotz LO, Bornstein SR, Klein HH, Barthel A. Regulation of Glucose-6-Phosphatase Gene Expression by Insulin and Metformin. **Horm Metab Res.** 2009 Oct;**41(10):730-5. Epub 2009 Jul 3**

Gutachtertätigkeit	Journals: Expert Opinion On Drug Safety
Berufserfahrung	06–07 / 2002 Aushilfstätigkeit im Kreiskrankenhaus Grevenbroich (Pflegetätigkeit)
	03–06 / 2003 Promotion- und Werbetätigkeit im Großraum Köln
	10 / 2004 – Aushilfstätigkeit im Ambulanten Operativen Zentrum 06 / 2005 Düsseldorf (Pflegetätigkeit)
	09 / 2005 – Aushilfstätigkeit im Evangelischen Krankenhaus 12 / 2007 Düsseldorf (Pflegetätigkeit mit Tag- und Nachtdiensten)
	Seit 02 / 2009 Assistenzarzt in der Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie, Zentrum Innere Medizin, Universitätsmedizin Göttingen
Zusatz- Qualifikationen	10 / 2009 und web-basierter Kurs „ICH - Good Clinical Practice“ 11 / 2012
Mitgliedschaften	Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, Ärztekammer Niedersachsen
Sprachkenntnisse/ Sonstiges	Deutsch: Muttersprache Englisch: fließend Spanisch: fließend Französisch: Schulkenntnisse EDV-Kenntnisse: MS-Office, Adobe Illustrator, SigmaPlot
Hobbies und Interessen	Musik, Reisen, Literatur, Basketball, Laufen, internationale Politik

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

01.06.2012, Peter Korsten