

**Aktivierung des Akt/FoxO-Signalweges durch Insulin und
Schwermetallionen: transkriptionelle Regulation der
Biosynthese von Selenoprotein P**

Inaugural-Dissertation
zur

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

vorgelegt von

Philippe Laurent Walter

aus Mettmann

Düsseldorf
2006

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: PD Dr. Lars-Oliver Klotz
Korreferent: Prof. Dr. Christian Ganter

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2006

*meiner Mutter in ewiger Liebe
und Dankbarkeit gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
1. Einleitung	1
1.1 Der PI3K/Akt-Signalweg	1
1.2 Akt-Substrate und ihre Aufgaben	5
1.3 FoxO-Transkriptionsfaktoren	7
1.3.1 Regulation von FoxO Transkriptionsfaktoren über Akt	8
1.3.2 Weitere Regulationswege von FoxO Transkriptionsfaktoren	9
1.3.3 Zielgene von FoxO-Transkriptionsfaktoren	11
1.3.4 Bedeutung des Akt/FoxO-Signalwegs in der Alterung	14
1.4 Metallionen in der Signaltransduktion	16
1.5 Selen im Organismus	18
1.5.1 Selenoprotein P	20
1.5.2 Regulation der Synthese von Selenoprotein P	23
1.6 Fragestellung	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Eukaryontische Zellkultur	25
2.1.1 Stammhaltung und Anzucht eukaryontischer Zellen	25
2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	26
2.1.3 Behandlung von Zellen mit Schwermetallionen	27
2.1.4 Behandlung von Zellen zur Analyse der SeP-Produktion (Western-Blot)	27
2.2 Bakterienkultur	28
2.2.1 Bakterienstämme	28
2.2.2 Anzucht der Bakterien	29
2.2.3 Herstellung von <i>E. coli</i> -Gefrierkulturen	30
2.3 Transformation von <i>Escheria coli</i> mit Plasmid-DNA und Expression	30
2.4 Präparation von Plasmid-DNA	32
2.4.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA	32
2.4.2 Midi/Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	32
2.5 Agarose-Gelelektrophorese	33

2.6 Elution von DNA aus Agarosegelen	34
2.7 Konzentrationsbestimmung von DNA	34
2.8 <i>In vitro</i>-Rekombination von DNA	34
2.8.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	34
2.8.2 Ligation von Vektor- und Fragment-DNA	34
2.9 DNA-Sequenzierung	35
2.10 Isolierung von RNA	35
2.11 RT-PCR	36
2.12 Proteinbestimmung nach Lowry	37
2.13 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.14 Immunologischer Nachweis von Proteinen	39
2.14.1 Elektro-Transfer auf PVDF-Membranen (Western-Blot)	39
2.14.2 Immunodetektion	40
2.14.3 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)	42
2.15 Färbung von PVDF-Membranen	42
2.16 Mutagenese-PCR	42
2.17 Transiente Transfektion	43
2.18 Luciferase-Reportergentests	44
2.19 Fluoreszenzmikroskopie	44
2.20 Viabilitätstest (Neutralrot)	45
2.21 Computerprogramme	45
3. Ergebnisse	46
3.1 PI3K-abhängige Aktivierung des Akt/FoxO-Signalweges durch Insulin	46
3.2 Regulation der Synthese von Selenoprotein P über den Akt/FoxO-Signalweg	49
3.2.1 Einfluss von Selenit auf den Akt/FoxO-Signalweg	49
3.2.2 Regulation des Selenoprotein P-Promoters durch den Akt/FoxO-Signalweg	52
3.2.3 Untersuchung der FoxO-Bindeelemente des Selenoprotein P-Promoters	56
3.2.4 Regulation der Selenoprotein P-mRNA-Synthese durch FoxO1a	59
3.2.5 Regulation der Selenoprotein P-Synthese durch Insulin/FoxO1a	63
3.2.6 Regulation der Produktion von Selenoprotein P in Astrocytomzellen	67
3.3 Aktivierung des Akt/FoxO-Signalweg durch Kupfer- und Zinkionen	71

4. Diskussion	85
4.1 Einfluss von Selenit auf den Akt/FoxO-Signalweg	85
4.2 Regulation von Selenoprotein P durch FoxO-Transkriptionsfaktoren	86
4.2.1 Beeinflussung des SeP-Promoters durch den Akt/FoxO-Signalweg	86
4.2.2 Regulation von SeP mRNA und Protein in Leberzellen	88
4.2.3 Regulation von Selenoprotein P in Astrocytomzellen	88
4.2.4 Konsequenzen der Regulation von SeP über Insulin in Leberzellen	90
4.3 Kupfer und Zink zeigen insulinmimetische Effekte	91
5. Zusammenfassung	94
6. Literatur	95

Abkürzungen

A. dest.	Aqua destillata
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> (Cyclinabhängige Kinase)
DBE	<i>daf16-binding-element</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	N,N-Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ERK1/2	Extrazellulär regulierte Kinasen 1/2
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
FoxO	Forkhead Box Gruppe O
G6Pase	Glucose 6-Phosphatase
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase
GPx	Glutathionperoxidase
GSK3	Glycogensynthasekinase-3
HBSS	Hank's balanced salt solution
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)

IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
Luc	Luciferase
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
NES	<i>nuclear export sequence</i> (Kernexportsequenz)
NLS	<i>nuclear localisation sequence</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK	3'-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase
PH	Pleckstrin-Homologie
PI3K	Phosphoinositid 3'-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SBP	SECIS-bindendes Protein
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PA-Gel	SDS-Polyacrylamidgel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sec	Selenocystein
SECIS	Selenocystein Insertionssequenz

SeP	Selenoprotein P
SOD	Superoxiddismutase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte-Saline
TBST	TBS + Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Units (Enzymeinheiten)
ÜK	Übernachtskultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

Zellen reagieren auf äußere Signale, um sich ihrer Umwelt anzupassen. Dabei reagieren simple Organismen wie Einzeller auf Veränderungen der Umgebung, wie z.B. Licht, Temperatur oder Nahrung. In komplexeren vielzelligen Organismen reagieren Zellen zusätzlich auf hormonelle Signale benachbarter oder entfernter Zellen. Die Zelle passt sich der Veränderung ihrer Umgebung an, indem sie als Antwort die Aktivität von Enzymen oder die Transkription von Genen reguliert.

Häufig werden extrazelluläre Signale durch membranassoziierte Rezeptorproteine erfasst. Diese besitzen intra- und extrazelluläre Domänen. Der Rezeptor wird beispielsweise durch Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne aktiviert, wobei das Signal durch die intrazelluläre Domäne ins Zellinnere weitergeleitet wird. Intrazellulär wird das Signal häufig durch Phosphorylierung von Proteinen durch spezifische Proteinkinasen weitergegeben. Diese Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten ist reversibel und wird durch spezifische Phosphatasen wieder aufgehoben. Die Phosphorylierung eines Proteins kann dabei zur Aktivierung oder Inaktivierung seiner enzymatischen Aktivität oder bei Transkriptionsfaktoren auch zur Veränderung der Bindeaffinität an die Promotoren von Zielgenen führen. Ein häufiges Beispiel für letzteres sind die intrazellulären Steroidrezeptoren. Diese erkennen im Zellkern unpolare und somit membrangängige Signalstoffe wie Steroide und binden dann an entsprechende Erkennungselemente der Promotoren. So kann die Aktivierung eines Signalweges einen schnellen Einfluss auf die Zelle haben, indem der Metabolismus durch bestehende Enzyme verändert wird oder durch die Veränderung des Expressionsprofils verschiedener Proteine eine längerfristige Antwort hervorgerufen wird.

1.1 Der PI3K/Akt-Signalweg

Ein Beispiel für eine Kinase, welche über vielfältige externe Stimuli aktiviert wird, ist die Phosphoinositid 3'-Kinase (PI3K). Diese Aktivierung erfolgt z.B. durch Insulin oder verschiedene Wachstumsfaktoren über entsprechende Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und nachfolgende Proteine (Liang & Slingerland, 2003). Wenn PI3K aktiviert ist, phosphoryliert

sie Phosphoinositide, beispielsweise das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), in 3'-Position, also am C 3 des Inositolrings, wobei Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) entsteht (Abb. 1.1 A). In höheren Organismen existieren mehrere PI3K-Formen, wobei in erster Linie Enzyme der Klasse IA für die durch Wachstumsfaktoren induzierte Produktion von 3'-Phosphoinositiden verantwortlich sind (Fruman et al., 1998). Bei PI3K der Klasse IA handelt es sich um Heterodimere aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit. Dabei wird durch Interaktion der regulatorischen Untereinheit (p85) mit Phosphotyrosinresten von aktivierten RTK oder über Adaptorproteine, wie z.B. Insulinrezeptor-Substrat-1 (IRS-1), die katalytische Untereinheit (p110) aktiviert, worauf diese die Übertragung eines Phosphats von ATP auf PIP_2 katalysiert (Datta et al., 1999; Cantley, 2002).

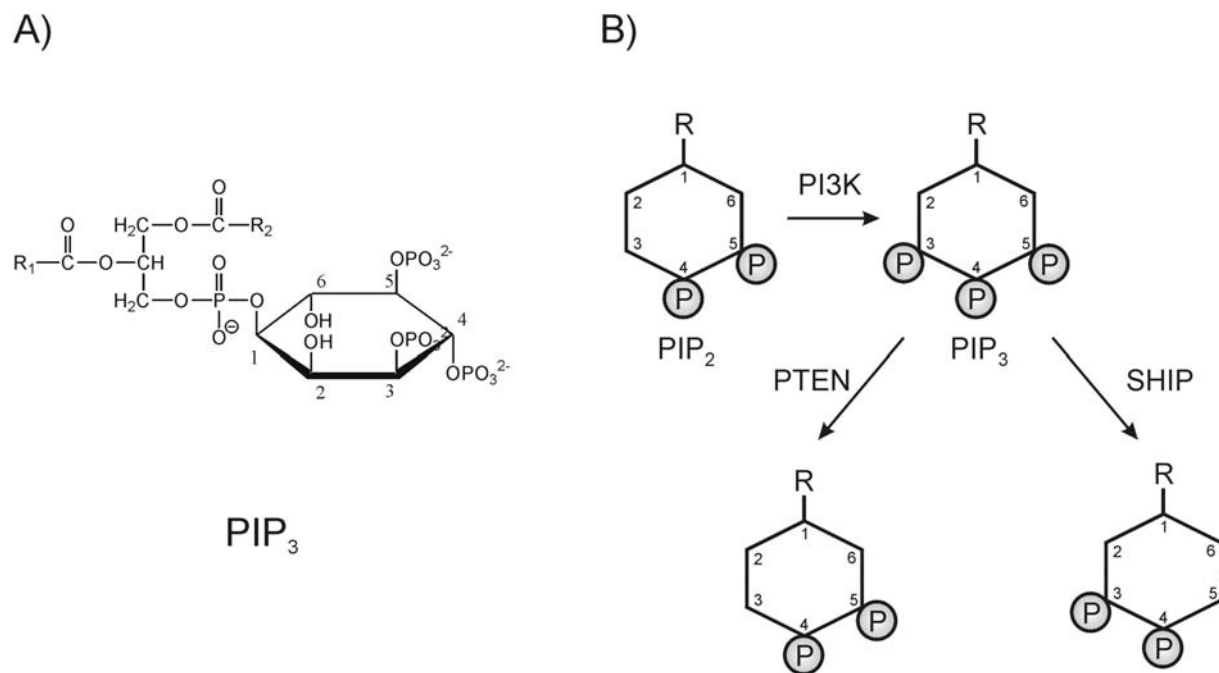


Abb. 1.1: Bildung und Abbau von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3)

(A) Strukturformel von PIP_3 (B) Phosphorylierung von PIP_2 durch Phosphoinositid 3'-Kinase und Dephosphorylierung von PIP_3 durch die Phosphatasen PTEN und SHIP.

PIP_3 wird durch zwei verschiedene Phosphatasen dephosphoryliert, was zu einer Deaktivierung der PI3K-abhängigen Signale führt (Abb. 1.1 B). Bei der einen Phosphatase handelt es sich um den Tumorsuppressor PTEN (phosphatase and tensin homolog), dessen Gen sich auf Chromosom 10 befindet und der bei Krebserkrankungen häufig mutiert ist (Vivanco & Sawyers, 2002). PTEN ist eine Lipidphosphatase, welche 3'-phosphorylierte Phosphoinositide dephosphoryliert. Bei der anderen Phosphatase handelt es sich um SHIP,

welche eine Lipidphosphatase darstellt, die Phosphoinositide an der 5'-Position dephosphoryliert (Damen et al., 1996).

Die durch PI3K phosphorylierten Lipide beeinflussen den weiteren Informationsfluss in der Zelle. Viele an der Signaltransduktion beteiligte Proteine, wie z.B. Proteinserin/threonin-Kinasen oder Proteintyrosinkinasen, besitzen Domänen, welche spezifisch phosphorylierte Phosphoinositide binden. Diese Proteine befinden sich bei nicht stimulierten Zellen im Cytoplasma. Wenn durch Stimulation der Zellen PIP_3 in der Zellmembran gebildet wird, akkumulieren diese Proteine an der Membran, wo sie aktiviert werden und verschiedene Signale, wie die Polymerisation von Aktin oder den Start von Proteinkinasekaskaden, auslösen (Cantley, 2002).

Von besonderer Bedeutung sind dabei die Serin/Threonin-Kinasen Akt, auch Proteinkinase B (PKB) genannt, und die 3'-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase (PDK). Der Amino-Terminus von Akt enthält eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne, mit welcher eine Bindung zu PIP_3 erfolgt (Datta et al., 1995). Untersuchungen an Akt ergaben, dass die Phosphorylierung von Thr-308 und Ser-473 des Proteins durch extrazelluläre Stimuli induziert wird (Alessi et al., 1996a). Die zur Aktivierung von Akt notwendige Phosphorylierung an Thr-308 kann erst erfolgen, wenn Akt an PIP_3 bindet und sich dadurch die Konformation des Proteins ändert (Abb. 1.2). So wird Akt in die Nähe der ebenfalls über eine PH-Domäne an PIP_3 bindenden PDK1 gebracht, welche Akt dann an Thr-308 phosphoryliert (Alessi et al., 1997). Für eine maximale Aktivierung von Akt muss zusätzlich Ser-473 phosphoryliert sein, was durch PDK1 alleine nicht erfolgt. Die dafür verantwortliche Kinase wird häufig als PDK2 bezeichnet, ist aber bis heute nicht sicher identifiziert. Es wurde vermutet, dass es sich um einen Komplex von PDK1 mit einem Fragment der Kinase PRK2 handelt (Balendran et al., 1999).

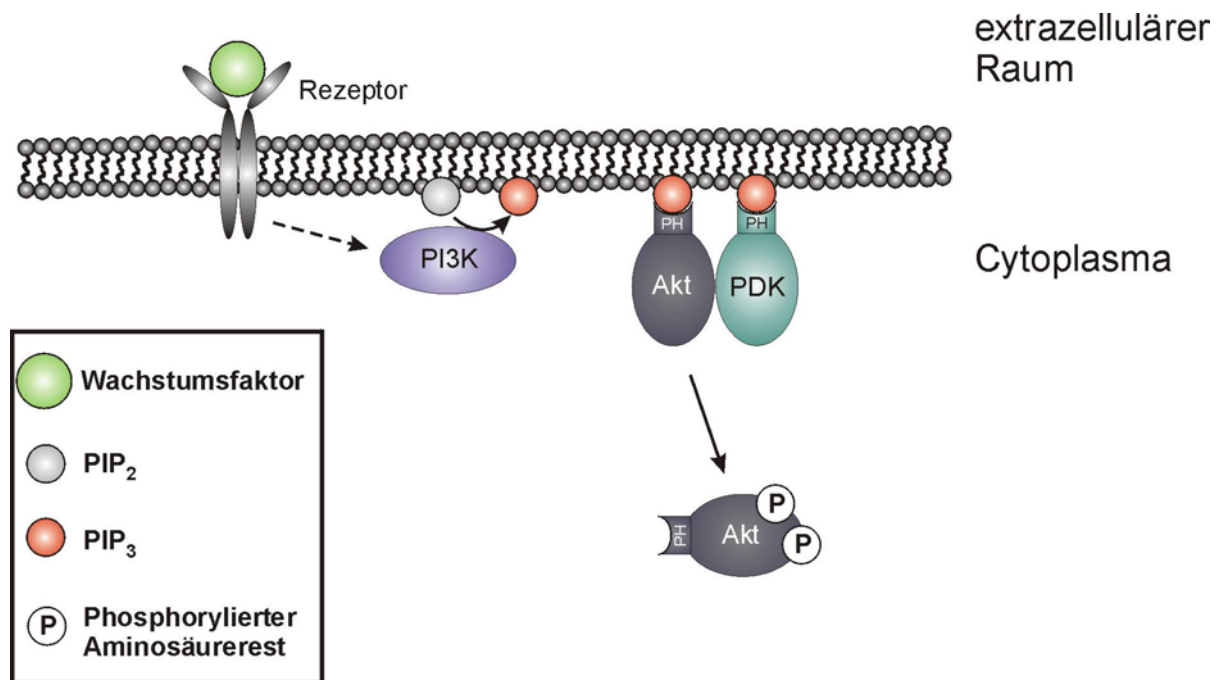


Abb. 1.2: Durch Wachstumsfaktoren induzierte Aktivierung von Akt durch PI3K und PDK

Durch spezifische Wachstumsfaktoren werden Rezeptoren und nachfolgend Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) aktiviert. PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in 3'-Position des Inositolrings, wobei Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) entsteht. An PIP₃ können Akt und PDK mit ihrer PH-Domäne binden und so in unmittelbare Nähe gelangen. PDK1 und PDK2 phosphorylieren dann Akt an Thr-308 und Ser-473, wodurch Akt aktiviert wird.

Wenn Akt phosphoryliert und somit aktiviert ist, kann es mit seiner Kinase-Domäne selber Zielproteine an Serin- oder Threoninresten phosphorylieren. Dabei haben Untersuchungen ergeben, dass die Substrate von Akt die Konsensussequenz RXRXXS/T enthalten (Alessi et al., 1996b). In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von Akt-Substraten identifiziert worden, welche für unterschiedliche Prozesse in der Zelle verantwortlich sind. Durch die Substrate von Akt werden hauptsächlich proliferative, den Zellzyklus aktivierende (Liang & Slingerland, 2003), oder antiapoptotische, den kontrollierten Zelltod verhindernde (Datta et al., 1999), Vorgänge beeinflusst (Abb.1.3).

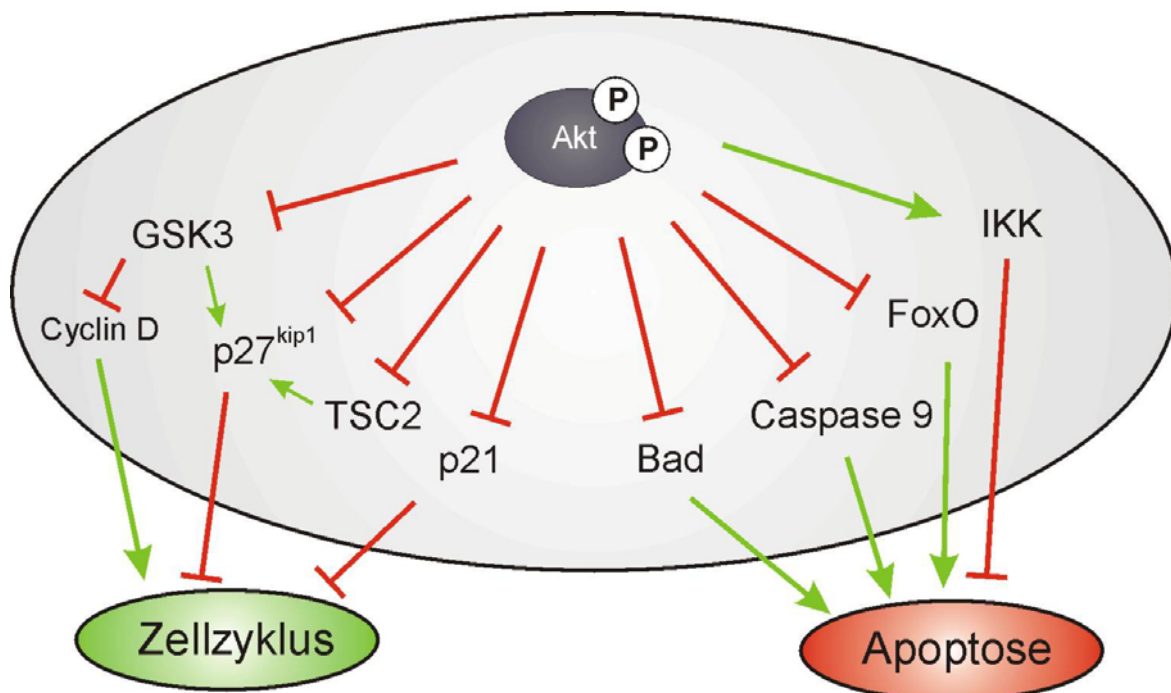


Abb. 1.3: Akt reguliert Zellzyklus und Apoptose über viele Wege

An Thr-308 und Ser-473 phosphoryliertes, aktives Akt aktiviert den Zellzyklus über Repression von Inhibitoren, Verhinderung der Inhibition von Aktivatoren oder Verhinderung der Aktivierung von Inhibitoren. Die Apoptose wird durch aktives Akt verhindert, indem Apoptoseaktivatoren inhibiert oder antiapoptotische Proteine aktiviert werden. Abkürzungen: GSK3, Glycogensynthasekinase-3; IKK, IκB Kinase; TSC2, Tuberöse Sklerose Komplex 2.

1.2 Akt-Substrate und ihre Aufgaben

Eines der ersten bekannten Akt-Substrate war die Glycogensynthasekinase-3 (GSK3), welche selber eine Vielzahl von im Zellmetabolismus involvierten Substraten reguliert (Cross et al., 1995). Diese Kinase ist in nicht mit Wachstumsfaktoren stimulierten Zellen aktiv und wird durch Akt phosphoryliert und deaktiviert. Das bekannteste Substrat von GSK3 ist dabei die namensgebende Glycogensynthase, welche von Akt über GSK3 aktiviert wird. Zusätzlich reguliert GSK3 auch Proteine, welche am Zellzyklus und somit an der Proliferation beteiligt sind.

So wird Cyclin D1 durch GSK3 beta an Thr-286 phosphoryliert, was zu einer Translokation von Cyclin D1 vom Zellkern ins Cytoplasma führt, wo es anschließend abgebaut wird (Diehl et al., 1998). Somit wird Cyclin D1 durch Inhibierung von GSK3 beta über Akt stabilisiert.

Auch der Transkriptionsfaktor c-myc wird über GSK3 beta phosphoryliert und dadurch im Anschluss abgebaut. Auch diese Phosphorylierung an Thr-58 kann durch Akt-abhängige Deaktivierung von GSK3 aufgehoben werden, was dann zu einer Stabilisierung von c-myc führt (Sears et al., 2000).

Zusätzlich wird der Tumorsuppressor TSC2 von Akt phosphoryliert (Marygold & Leever, 2002). Diese Phosphorylierung führt zu einem Zerfall des Komplexes von TSC2 und TSC1, welcher mTOR inhibiert, wodurch p27^{kip1}, ein Inhibitor des Zellzyklus, stabilisiert wird. Allerdings kann Akt p27^{kip1} auch direkt an Thr-157 phosphorylieren, was den Transport von p27^{kip1} in den Zellkern abschwächt (Liang et al., 2002). Diese Verlagerung ins Cytoplasma führt dazu, dass p27^{kip1} nicht länger an Cyclinabhängige Kinasen (CDKs) im Zellkern bindet und diese inhibiert, wodurch sonst der Zellzyklus angehalten würde (Blain & Massague, 2002).

Auch für den CDK-Inhibitor p21^{cip1/Waf1} konnte gezeigt werden, dass er durch Akt an Thr-145 phosphoryliert wird, was auch zu einer verstärkten Lokalisation im Cytoplasma und einer Aufhebung der Inhibierung des Zellzyklus über CDKs führt (Zhou et al., 2001). Somit reguliert Akt auf verschiedene Weisen den Zellzyklus, indem es die Inhibition von Aktivatoren verhindert oder Inhibitoren selber inhibiert.

Neben der Aktivierung des Zellzyklus wird durch Phosphorylierung von Akt auch der programmierte Zelltod, die Apoptose, verhindert. Eine besondere Bedeutung bei der Einleitung der Apoptose haben die Proteine der Bcl-2 Familie. Ein Teil dieser Proteine, wie Bcl-2 und Bcl-X_L, unterstützen das Überleben der Zelle, während andere, wie Bax und Bad, den Zelltod fördern. Dabei bilden sie untereinander Homo- und Heterodimere, deren Zusammensetzung die Funktion bestimmt (Reed, 1998; Green & Reed, 1998).

So bindet Bad an Bcl-X_L, wodurch der antiapoptotische Effekt von Bcl-X_L blockiert wird und sich der Komplex vom Cytoplasma an die äußere Mitochondrienmembran begibt, wo dann zum Zelltod führende Prozesse gestartet werden (Yang et al., 1995). Die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren induziert eine Phosphorylierung von Bad an Ser-112 und Ser-136, was zu einer Dissoziation von Bcl-X_L und einer anschließenden Bindung an cytoplasmatische 14-3-3-Proteine führt (Muslin et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Akt Bad bevorzugt an Ser-136 phosphoryliert, obwohl Ser-112 auch eine Konsensussequenz für die

Phosphorylierung durch Akt hat (Datta et al., 1997). Somit blockiert aktives Akt den durch Bad herbeigeführten Zelltod, indem es die Wechselwirkung zwischen Bad und den Mitochondrien verhindert (Wang et al., 1999).

Auch bei der Protease Caspase 9, welche im Verlauf der Apoptose Caspase 3 und 7 aktiviert (Cryns & Yuan, 1998), konnte eine Phosphorylierung durch Akt an Ser-196 nachgewiesen werden (Cardone et al., 1998). Diese Phosphorylierung hat zur Folge, dass Caspase 9 nicht länger durch freigesetztes Cytochrom *c* aktiviert werden kann und somit der programmierte Zelltod unterbunden wird.

Akt verhindert die Apoptose aber nicht nur durch direkte Phosphorylierung von beteiligten Proteinen, sondern auch durch die Modifikation von Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription von für die Apoptose relevanten Genen regulieren. So wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B durch Proteine der I κ B-Familie deaktiviert und dadurch im Cytoplasma gehalten (Mercurio & Manning, 1999). Phosphorylierung von I κ B führt zu seinem Abbau und damit zur Freisetzung von NF- κ B, welches dann in den Zellkern gelangen kann, wo es die Transkription von antiapoptotischen Proteinen aktiviert. I κ B wird dabei von IKK phosphoryliert, welches von Akt an Thr-23 phosphoryliert und aktiviert wird (Ozes et al., 1999).

Weitere Transkriptionsfaktoren, welche von Akt phosphoryliert werden, sind die Mitglieder der FoxO-Familie. Diese sind nicht nur an der Regulation der Apoptose beteiligt, sondern auch an einer Vielzahl von anderen Prozessen, auf welche im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

1.3 FoxO-Transkriptionsfaktoren

Die FoxO-Transkriptionsfaktoren gehören zu der großen Gruppe der Forkhead-Proteine, welche durch eine DNA-Bindedomäne, die sogenannte Forkhead-Box (Fox), charakterisiert sind (Kaestner et al., 2000). Beim Menschen sind 39 Mitglieder der Forkhead-Familie bekannt, welche in insgesamt 19 Untergruppen (Fox A bis S) unterteilt sind, wobei sie verschiedenste Aufgaben in der Entwicklung einnehmen (Lehmann et al., 2003).

Von den Transkriptionsfaktoren der Forkhead Box Gruppe O (FoxO) sind zur Zeit vier verschiedene Mitglieder in Säugern bekannt. Dabei handelt es sich um FoxO1a, FoxO3a, FoxO4 und FoxO6. Von diesen werden die ersten drei in allen Geweben in Säugern

exprimiert (Anderson et al., 1998). FoxO6 kommt eine Sonderrolle zu, da es überwiegend im sich entwickelnden Gehirn exprimiert wird (Jacobs et al., 2003).

Die verschiedenen Knockout-Mäuse der FoxO-Transkriptionsfaktoren zeigen sehr unterschiedliche Phänotypen. So sterben homozygote FoxO1a Knockout-Mäuse bereits als Embryos (Furuyama et al., 2004), während heterozygote Mutanten lebensfähig sind und den diabetischen Phänotyp von Mäusen mit einem mutierten Insulinrezeptor teilweise aufheben, was an einer erhöhten Empfindlichkeit für Insulin liegen könnte (Nakae et al., 2002). FoxO3a Knockout-Mäuse sind lebensfähig und zeigen eine altersabhängige weibliche Unfruchtbarkeit als Hauptdefekt (Castrillon et al., 2003). FoxO4 Knockout-Mäuse sind lebensfähig und zeigen keinen offenkundigen Phänotyp (Hosaka et al., 2004), während von FoxO6 noch keine Knockout-Mäuse erzeugt wurden.

1.3.1 Regulation von FoxO Transkriptionsfaktoren über Akt

Wie bereits angesprochen, werden FoxO-Transkriptionsfaktoren über den PI3K/Akt-Signalweg reguliert, wobei dieser Mechanismus in eukaryontischen Organismen konserviert ist. Dies wurde zuerst im Fadenwurm *C. elegans* gezeigt, wo das FoxO-Homolog daf-16 als Zielprotein von Akt identifiziert wurde (Ogg et al., 1997). Später konnte gezeigt werden, dass auch in menschlichen Zellen FoxO1a (Rena et al., 1999), FoxO3a (Brunet et al., 1999) und FoxO4 (Kops et al., 1999) direkt durch Akt phosphoryliert werden. Die drei Phosphorylierungsstellen (1 x Thr, 2 x Ser) entsprechen der Konsensussequenz für Akt-Substrate und sind dabei von *C. elegans* zu Säugern konserviert. So wird z.B. FoxO1a durch aktives Akt an Thr-24, Ser-256 und Ser-319 phosphoryliert. Dabei ist eine Phosphorylierung von Ser-256 notwendig, bevor Thr-24 und Ser-319 phosphoryliert werden können (Nakae et al., 1999). Einhergehend mit dieser durch Wachstumsfaktoren induzierten Phosphorylierung findet eine Relokalisation von FoxO vom Zellkern ins Cytoplasma statt (Biggs et al., 1999). Dies ist schematisch in Abbildung 1.4 dargestellt.

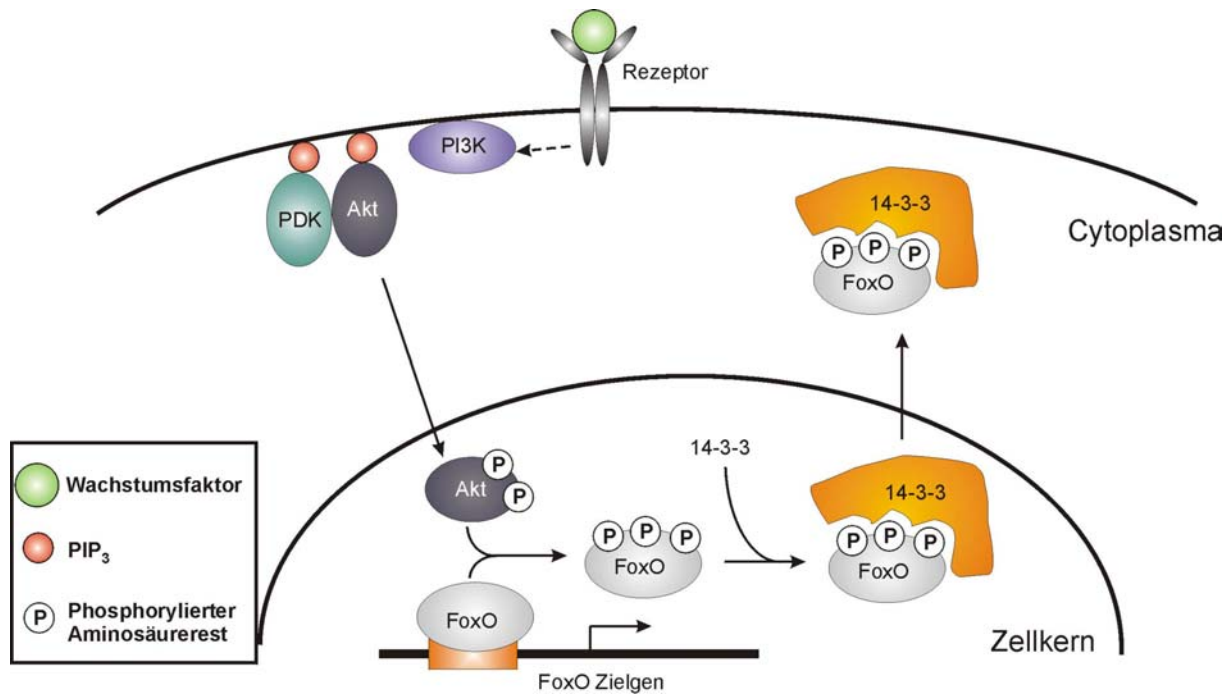


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Desaktivierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Akt

In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wird Akt mittels PI3K und PDK phosphoryliert und somit aktiviert. An Thr-308 und Ser-473 phosphoryliertes Akt bindet nicht länger an die äußere Membran und gelangt in den Zellkern. Dort an die genomische DNA bindende FoxO-Transkriptionsfaktoren werden an drei spezifischen Stellen phosphoryliert. Phosphorylierte FoxO-Transkriptionsfaktoren binden nicht mehr an die DNA und werden von 14-3-3-Proteinen erkannt. Dadurch wird eine Kernexportsequenz exponiert, worauf der Komplex ins Cytoplasma transportiert wird.

Verantwortlich für die Relokalisation von FoxO sind 14-3-3-Proteine, welche an phosphoryliertes FoxO binden. Dabei funktionieren Thr-24 und Ser-256 als die für die Bindung von 14-3-3-Proteinen verantwortlichen Stellen in FoxO1a (Zhao et al., 2004). Durch diese Bindung wird eventuell die Konformation von FoxO so verändert, dass eine leucinreiche Domäne im C-Terminus von FoxO, welche als Kernexportsequenz (NES) fungiert, exponiert wird und so Interaktion mit Proteinen der Exportmaschinerie möglich ist (Brunet et al., 2002). Zusätzlich wird durch die Bindung der 14-3-3-Proteine der Reimport in den Zellkern, durch Maskierung einer Kernlokalisationssequenz (NLS) an FoxO, verhindert (Rena et al., 2001).

1.3.2 Weitere Regulationswege von FoxO Transkriptionsfaktoren

Durch Insulin und Wachstumsfaktoren werden auch weitere Aminosäurereste der FoxO Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. So wird durch die Kinase DYRK1 Ser-329 in FoxO1a

phosphoryliert, was eine weitere Phosphorylierung von Ser-322 und Ser-325 durch die Caseinkinase 1 (CK1) zur Folge hat. Dies führt zu einer Beschleunigung der Akt-induzierten Relokalisierung von FoxO in das Cytoplasma, da die Interaktion mit den Exportproteinen Ran und Exportin/Crm1 verstärkt wird (Rena et al., 2002). Somit induzieren Wachstumsfaktoren über mehrere kooperierende Mechanismen den Export von FoxO aus dem Zellkern und die damit verbundene Abschwächung der Transkription von FoxO-Zielgenen.

Eine andere Regulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren erfolgt durch oxidativen Stress. So konnte gezeigt werden, dass die MAP-Kinase JNK, welche durch Stress-Stimuli aktiviert wird, menschliches FoxO4 und daf-16 phosphorylieren kann (Essers et al., 2004; Oh et al., 2005). So wird FoxO4 an Thr-447 und Thr-451 phosphoryliert, wobei diese Stellen sich jedoch nicht bei anderen Mitgliedern der FoxO-Familie konserviert finden. Die Phosphorylierung durch JNK führt zu einer Translokation von FoxO vom Cytoplasma in den Zellkern (Essers et al., 2004). Somit haben Wachstumsfaktoren und Stress entgegengesetzte Wirkung auf die Lokalisation von FoxO. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass bei gleichzeitigem Einfluss der beiden Faktoren der Effekt von Wachstumsfaktoren durch den oxidativen Stress ausgelöscht wurde und FoxO im Zellkern lokalisiert war (Frescas et al., 2005). Anscheinend werden durch JNK die 14-3-3-Proteine phosphoryliert, worauf diese ihre gebundenen Substrate abgeben. Dies würde im Falle von FoxO bedeuten, dass dieses ungebunden wäre und wieder in den Zellkern gelangen könnte (Tsuruta et al., 2004; Sunayama et al., 2005).

Neben der vielfältigen Regulation durch Phosphorylierung werden FoxO-Transkriptionsfaktoren auch noch durch weitere Modifikationen kontrolliert. So bindet FoxO an verschiedene Koaktivatoren der Transkription, wie CBP und p300. Diese acetylieren FoxO an einigen konservierten Lysinresten. So wird z.B. FoxO4 in Mäusen an Lys186, Lys189 und Lys408 acetyliert (Fukuoka et al., 2003). Während die Bindung an Koaktivatoren zu einer Erhöhung der FoxO-abhängigen Transkription führt, wird durch Acetylierung die Aktivität des FoxO-Transkriptionsfaktors reduziert.

Entgegensetzt der Acetylierung wirken die Deacetylasen der Sir2-Familie, wobei es sich um Deacetylasen der Klasse III handelt, welche NAD^+ als Cofaktor benutzen (Imai et al., 2000). Als Antwort auf oxidativen Stress werden FoxO-Transkriptionsfaktoren in Säugerzellen von SIRT1 deacetyliert. Diese Deacetylierung führt zu einer Erhöhung der Resistenz gegen Stress und verhindert Apoptose (Brunet et al., 2004; Motta et al., 2004; van der Horst et al., 2004).

Neben Phosphorylierung und Acetylierung können FoxO-Transkriptionsfaktoren auch ubiquitinyliert werden. Dabei ist zwischen Poly- und Mono-Ubiquitinylierung zu unterscheiden. So konnte gezeigt werden, dass nach Aktivierung von Akt FoxO-Transkriptionsfaktoren poly-ubiquitinyliert und durch das Proteasom abgebaut wurden (Plas & Thompson, 2003). Bei der Poly-Ubiquitinylierung von FoxO1a sind die Phosphorylierung von Ser-256 und die Lokalisation im Cytoplasma Voraussetzung (Huang et al., 2005).

Neueste Versuche zeigten, dass FoxO4 unter Stress nicht nur acetyliert, sondern auch mono-ubiquitinyliert wird. Durch diese Mono-Ubiquitinylierung an Lysin-Resten erfolgte eine Lokalisierung von FoxO4 im Zellkern mit gleichzeitiger Erhöhung der Aktivität des Transkriptionsfaktors. Als FoxO deubiquitinylierendes Enzym konnte USP7 identifiziert werden (Burgering, 2006).

1.3.3 Zielgene von FoxO-Transkriptionsfaktoren

Neben den vielfältigen Regulationsmöglichkeiten von FoxO-Transkriptionsfaktoren werden auch eine große Anzahl von Zielgenen durch diese reguliert. Im Bereich der DNA-Bindedomäne von FoxOs befindet sich eine Sequenz von fünf Aminosäuren (α -Helix 3), welche die spezifischen DNA-Bindesequenzen erkennt. Das Kernmotiv der DNA-Bindesequenz von FoxOs lautet GTAAA(C/T)A und wird nach dem FoxO-Homologen aus *C. elegans* daf-16-Bindeelement (DBE) genannt (Biggs et al., 2001). Mit Hilfe von Computeranalysen konnten eine Vielzahl von Genen mit potentiellen DBE identifiziert werden, welche noch nicht auf Interaktion mit FoxOs untersucht waren (Xuan & Zhang, 2005). Bis heute sind schon eine Vielzahl von Genen bekannt, deren Transkription über FoxO reguliert wird, wobei neben der Aktivierung der Transkription auch in einigen Fällen eine Repression durch FoxO beobachtet wurde (Ramaswamy et al., 2002). Dabei sind die Hauptfunktionen von FoxO-regulierten Genen größtenteils denen von Akt entgegengesetzt. In Abbildung 1.5 sind einige dieser Funktionen mit den zugehörigen FoxO Zielgenen dargestellt, welche im Anschluss besprochen werden.

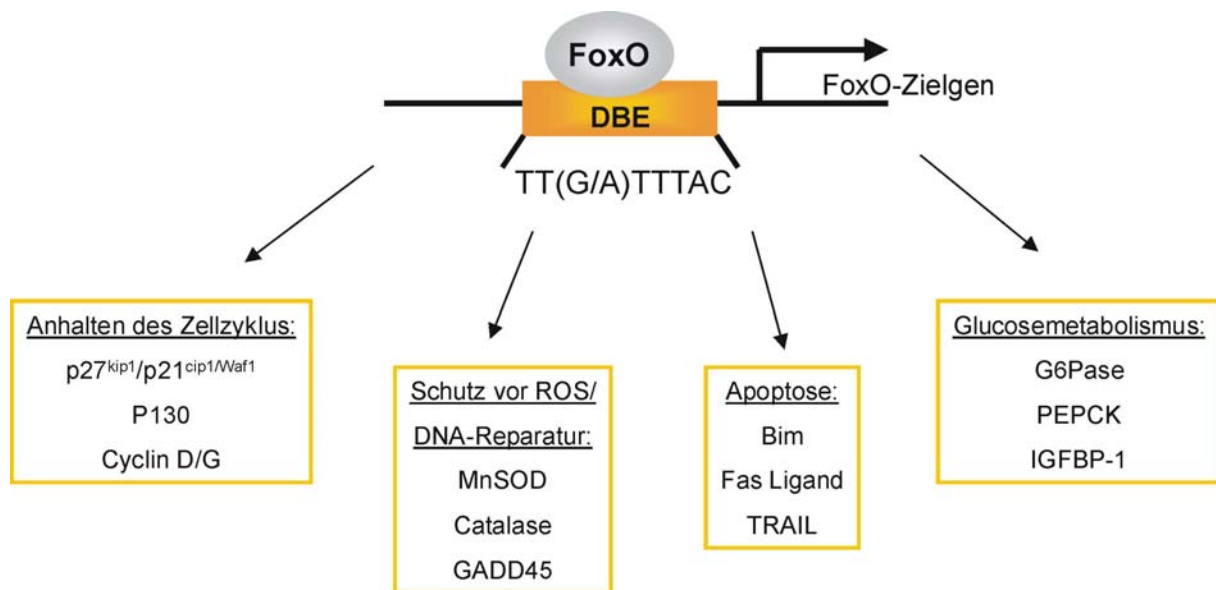


Abb. 1.5: Verschiedene Gruppen von Zielgenen der FoxO-Transkriptionsfaktoren

FoxO-Transkriptionsfaktoren binden an spezifische Sequenzen in den Promotoren ihrer Zielgene. Diese Sequenzen werden nach daf-16, dem FoxO-Homologen in *C. elegans*, als daf-16-bindende Elemente (DBE) bezeichnet (hier als inverses DBE dargestellt). Dabei sind Zielgene von FoxO an der Regulation des Zellzyklus, am Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), der Reparatur der Zelle, dem Einleiten der Apoptose und am Glucosemetabolismus beteiligt.

Der Zellzyklus wird durch FoxO-Transkriptionsfaktoren auf vielfältige Weise reguliert. So konnte bei Überexpression von aktiven Formen von FoxO ein Übergang von der G1- in die S-Phase verhindert werden. Zu den durch FoxO aktivierten Zielgenen, welche unter anderem für diese Hemmung verantwortlich sind, gehören der CDK-Inhibitor p27^{kip1} (Medema et al., 2000) und p130, ein Mitglied der Retinoblastom-Familie (Kops et al., 2002a). Des weiteren konnte in Anwesenheit von TGF-beta gezeigt werden, dass FoxO auch die Expression des CDK-Inhibitors p21 induziert und somit den G1/S-Übergang des Zellzyklus hemmt (Seoane et al., 2004). Neben der Aktivierung von Inhibitoren des Zellzyklus kann FoxO auch durch die Repression von Cyclin D1 und D2, welche Aktivatoren des Zellzyklus sind, die Zellen in der G1-Phase halten (Ramaswamy et al., 2002; Schmidt et al., 2002).

Zusätzlich wird auch der Übergang des Zellzyklus von der G2- in die M-Phase durch FoxO-Proteine reguliert. So konnten Cyclin G2 und das in die Reparatur der DNA involvierte Protein GADD45 als FoxO-Zielgene, welche eine Verzögerung des Übergangs in die M-Phase des Zellzyklus auslösen können, identifiziert werden (Furukawa-Hibi et al., 2002; Tran

et al., 2002). Somit wird der Zellzyklus durch aktive FoxO-Proteine angehalten, während Aktivierung von Akt FoxO deaktiviert und zur Proliferation der Zellen führt.

Von besonderer Bedeutung für die Effekte von FoxO-Transkriptionsfaktoren ist die Regulation von Enzymen, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) unschädlich machen. Zu hohe Konzentrationen von ROS schädigen in der Zelle, Proteine, Lipide und Nukleinsäuren (Stadtman, 2004). Durch Überexpression von FoxO-Transkriptionsfaktoren konnte eine Verringerung der durch ROS verursachten oxidativen Schädigung von Zellbestandteilen beobachtet werden. Als für diesen Schutzeffekt verantwortliche Proteine konnten die Enzyme Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) und Catalase identifiziert werden (Kops et al., 2002b; Nemoto & Finkel, 2002). Zusätzlich wird der Schädigung von Zellen durch ROS auch durch die Aktivierung von an der Reparatur beteiligten Proteinen, wie GADD45, über FoxO entgegengewirkt (Tran et al., 2002). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der durch FoxO induzierten Hemmung des Zellzyklus, da diese für eine Reparatur der Zelle und Bekämpfung von ROS genutzt wird.

Überexpression von dauerhaft aktiven Formen von FoxO führt Zellen allerdings auch in den programmierten Zelltod, die Apoptose (Zheng et al., 2000; Dijkers et al., 2002). So konnte die Aktivierung von verschiedenen an der Apoptose beteiligten Proteinen durch FoxO beobachtet werden. Dazu gehören die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie BIM (Dijkers et al., 2000) und bNIP3 (Tran et al., 2002). Auch die Aktivierung von Bcl-6, einem Repressor des antiapoptotischen Bcl-X_L, durch FoxO konnte gezeigt werden (Tang et al., 2002). Somit verschiebt FoxO das Verhältnis von proapoptotischen zu antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie zugunsten der ersteren.

Des weiteren induziert FoxO die Synthese der für die Apoptose wichtigen Cytokine Fas-Ligand und TRAIL (Brunet et al., 1999; Modur et al., 2002). Diese Ergebnisse erklären somit auch einen Teil der antiapoptotischen Effekte von Akt.

Schließlich spielen FoxO-Proteine auch eine wichtige Rolle bei der Induktion von Proteinen, welche am Glucosemetabolismus beteiligt sind. So wird die Expression der an der Gluconeogenese beteiligten Enzyme Glucose 6-Phosphatase (G6Pase) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) durch FoxO induziert (Schmoll et al., 2000; Nakae et al., 2001; Yeagley et al., 2001). Des weiteren wird auch das Insulinwachstumsfaktorbindende Protein 1 (IGFBP-1), welches die kurzfristige

Bioverfügbarkeit von IGF beeinflusst, durch FoxO induziert (Guo et al., 1999). Neueste Versuche mit Mäusen, welche aktives FoxO in der Leber überexprimieren, zeigen, dass neben der Gluconeogenese auch andere Wege des Stoffwechsels durch FoxO beeinflusst werden. So werden Proteine des Glycerintransports und des Aminosäurestoffwechsels aktiviert, während Proteine der Glykolyse, des Pentosephosphatwegs und der Lipolyse deaktiviert werden (Zhang et al., 2006).

FoxO-Transkriptionsfaktoren sind an vielen weiteren Prozessen beteiligt, die hier nur kurz erwähnt werden sollen. So konnte gezeigt werden, dass FoxO die Zelldifferenzierung inhibiert (Hribal et al., 2003), Muskelschwund durch Aktivierung von Atrogin-1 verursacht (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004), Gefäßwachstum sowie eNOS reguliert (Potente et al., 2005) und den Androgenrezeptor aktiviert (Yang et al., 2005). Interessanterweise regulieren FoxO-Proteine nicht nur vielfältige, sondern zum Teil auch entgegengesetzte Prozesse, wie ROS-Abbau und Apoptose, in der Zelle. Dies ist wohl nur durch das bereits beschriebene vielfältige Regulationsnetzwerk von FoxOs möglich, wobei noch zu klären ist, wie die selektive Stimulation von bestimmten Zielgenen möglich ist (Greer & Brunet, 2005).

Nach den bisherigen Erkenntnissen dient der Akt/FoxO-Signalweg als Schaltstelle zwischen den Zuständen der Proliferation und einem Ruhezustand, in welchem Schutzfunktionen der Zelle aktiviert werden. Somit kommt diesem Signalweg eine entscheidende Bedeutung in der Entstehung von Krebs, sowie in der Alterung von Zellen zu (Greer & Brunet, 2005). Auf letzteres soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

1.3.4 Bedeutung des Akt/FoxO-Signalwegs in der Alterung

Die Lebensdauer verschiedener Organismen ist höchst unterschiedlich. Es ist inzwischen bekannt, dass das Phänomen Altern über verschiedene Wege in der Zelle reguliert wird. Davon ist der Insulin/Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) Signalweg, über welchen auch der PI3K/Akt/FoxO-Signalweg reguliert wird, bisher am besten untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass über diesen Signalweg die Lebensdauer von Würmern, Fliegen und Säugern reguliert wird (Tatar et al., 2003).

Der Fadenwurm *C. elegans* besitzt für den Insulin- und den IGF-1-Rezeptor nur ein Ortholog, welches *daf-2* genannt wird. *C. elegans* Mutanten von *daf-2* zeigten eine gegenüber Wildtyp-

Würmern verdoppelte Lebensdauer (Kenyon et al., 1993). Auch Mutationen in *age-1*, dem *C. elegans* Homolog von PI3K, führten zu einer deutlichen Erhöhung der Lebensdauer (Johnson, 1990; Morris et al., 1996). Diese Verlängerung der Lebensdauer konnte durch Mutation des FoxO-Homologs *daf-16* wieder aufgehoben werden (Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997). Zusätzlich zeigten Gene mit DBEs (*daf-16* Bindeelementen), wie z.B. MnSOD, auch einen Einfluss auf die Lebensdauer (Honda & Honda, 1999; Lee et al., 2003a). Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass Langlebigkeit mit dem Schutz vor oxidativem Stress verbunden ist. So zeigten die langlebigen Mutanten von *C. elegans*, bei denen *daf-16* aktiviert war, auch eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress, Hitze und UV-Strahlung (Henderson & Johnson, 2001).

Auch in *Drosophila* verursachte die Mutation des Insulin/IGF-1-Rezeptors eine Erhöhung der Lebensdauer um bis zu 80 % (Tatar et al., 2001). Interessanterweise genügte die Überexpression von dFoxO, dem FoxO-Homolog der Fruchtfliege, um die Lebensdauer zu erhöhen (Giannakou et al., 2004; Hwangbo et al., 2004). Im Gegensatz zu Fadenwürmern und Fliegen haben Mäuse je einen einzelnen Rezeptor für Insulin und IGF-1. So lebten Mäuse mit einem heterozygoten Knockout des IGF-1-Rezeptors um bis zu 30 % länger (Holzenberger et al., 2003), während Mäuse ohne Insulinrezeptor im Fettgewebe um bis zu 18 % länger leben als der Wildtyp (Bluher et al., 2003). Dem entgegengesetzt konnte gezeigt werden, dass eine Mutante des Hormons Klotho bei Mäusen zu einer abnormal beschleunigten Alterung führte (Kuro-o et al., 1997). Mäuse, die dieses Hormon überexprimieren, zeigen im Gegensatz dazu einen Anstieg der Lebensdauer um bis zu 30 % (Kurosu et al., 2005). Zellkulturstudien bestätigten, dass Klotho zu einer Abschwächung der Aktivierung des Insulin-Signalweges führte und somit zu einer Aktivierung von FoxO und FoxO-abhängiger Expression von MnSOD (Yamamoto et al., 2005).

Somit haben FoxO-Transkriptionsfaktoren in Verbindung mit Insulin, IGF-1 und dem zugehörigen PI3K/Akt-Signalweg eine entscheidende Funktion in der Alterung vieler verschiedener Organismen. Dabei legen die Ergebnisse nahe, dass sich eine Verringerung der Plasmakonzentrationen von Insulin positiv auf die Lebensdauer auswirkt. Andererseits ist die Anwesenheit von Insulin für Wachstum und Energiespeicherung wichtig. Es erscheint paradox, dass suboptimale Insulinkonzentrationen mit einer erhöhten Lebensdauer einhergehen, Resistenz gegenüber Insulin aber zu Diabetes vom Typ II führt. Dies könnte aber auch ein gewebespezifisches Problem sein, da die Abwesenheit des Insulinrezeptors bei

Mäusen in der Leber zwar zu Diabetes führt, aber im Fettgewebe die Lebenserwartung erhöht (Kenyon, 2005). Eine Reduktion der Nahrungszufuhr („caloric restriction“) führt zu verringerter Ausschüttung von Insulin und könnte somit auch bei Menschen zur Verlängerung der Lebenserwartung beitragen. Für eine Vielzahl von Lebewesen konnte mit „caloric restriction“ eine Erhöhung der Lebensdauer festgestellt werden, wobei nur bei *Drosophila* bisher gezeigt werden konnte, dass dieser Effekt über den Insulin-Signalweg verläuft (Clancy et al., 2002). Bei Mäusen konnte dies noch nicht geklärt werden.

Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges kann nicht nur durch Hormone und Wachstumsfaktoren hervorgerufen werden, sondern auch durch eine Vielzahl anderer Stimuli, wie z.B. Wasserstoffperoxid, Hitzeschock, Vanadat oder Cadmium (Datta et al., 1999). Im folgenden soll der Einfluss von Metallionen auf zelluläre Signalwege und speziell Akt besprochen werden.

1.4 Metallionen in der Signaltransduktion

Der Mensch kann durch Gegebenheiten im Beruf oder der Umwelt größeren Mengen von verschiedenen Metallen ausgesetzt sein. Zu den potentiellen Quellen von abnormal großen Mengen an Metallen gehören Grundwasserkontamination, das Gerben von Leder oder Arbeiten mit Metallen oder in Minen (Leonard et al., 2004). Obwohl viele Metallionen als Spurenelemente in geringen Mengen für den Organismus lebensnotwendig sind, führen größerer Mengen bestimmter Metallionen zu Entzündungen, Schädigung von Zellen oder Krebs (Desurmont, 1983).

Metallionen sind aber auch essentiell, da sie in vielen Proteinen eine stabilisierende Wirkung auf deren Tertiärstruktur haben. Erst durch die Hilfe des Metallions bei der Ausbildung der Struktur kann das Protein seine bestimmte Funktion erfüllen, wie dies z.B. bei Zink(II) in Zinkfinger-Motiven der Fall ist (Witkiewicz-Kucharczyk & Bal, 2006). Aber auch in den aktiven Zentren von Enzymen wird die katalytische Aktivität erst durch die Anwesenheit von Metallionen erreicht. Ein gutes Beispiel hierfür sind die Superoxiddismutasen (SOD), von denen es beim Menschen drei verschiedene gibt und welche die Reaktion von zwei Superoxid-Anionen und zwei Protonen zu je einem Molekül Wasserstoffperoxid und Wasser katalysieren. Dabei enthalten die cytoplasmatische SOD1, sowie die extrazelluläre SOD3 je

Untereinheit ein Kupfer- und ein Zink-Ion und die mitochondriale SOD2 ein Mangan-Ion im aktiven Zentrum (Zelko et al., 2002).

Abgesehen von den toxischen Effekten und katalytischen oder strukturgebenden Funktionen in Proteinen sind viele Metallionen in der Lage, zelluläre Signaltransduktion zu modulieren. Dies geschieht häufig indirekt über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche dann Signalkaskaden aktivieren. Ein häufig beobachteter Mechanismus ist dabei die Reduktion von Hydroperoxiden durch Metallionen unter Bildung von Hydroxyl- oder Alkoxyradikalen. Auf diese Weise bildet sich in einer Reaktion vom Fenton-Typ aus Wasserstoffperoxid das hochreaktive Hydroxyl-Radikal (Leonard et al., 2004). Neben Metallen wie Eisen-, Chrom- und Nickelionen, können auch Kupferionen eine Fenton-Typ Reaktion eingehen. Dafür muss es zuerst als Cu(I)-Ion vorliegen. Dies geschieht in der Zelle durch Reaktion von Cu(II) mit freien Thiolgruppen, welche zu Disulfiden oxidiert werden (Klotz et al., 2003). Alternativ zur Fenton-Typ Reaktion kann das gebildete Cu(I) auch das Elektron auf molekularen Sauerstoff übertragen, der in sehr viel höheren Konzentrationen vorliegt als Hydroperoxide, wodurch sich das Superoxid-Anion bildet (Abbildung 1.6). Aus diesem kann sich durch Disproportionierung (Dismutation) Wasserstoffperoxid bilden. Diese Reaktion erfolgt spontan, kann aber enzymatisch über die Superoxiddismutase beschleunigt werden.

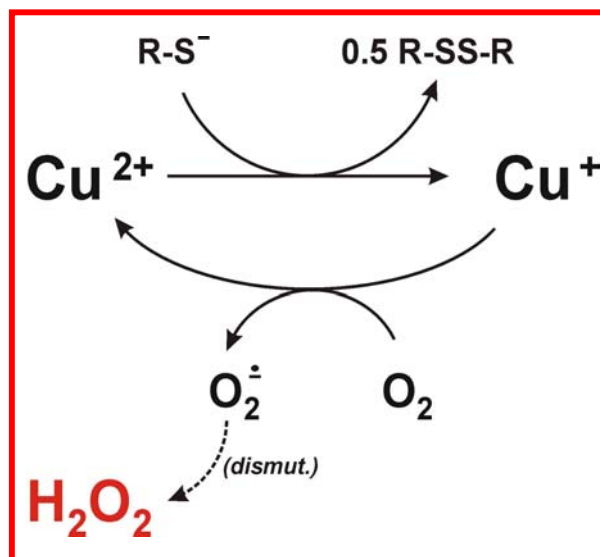


Abb. 1.6: Mechanismus der Bildung von Wasserstoffperoxid durch Cu(I)-Ionen

Cu(II)-Ionen werden durch Reaktion mit freien Thiolgruppen zu Cu(I)-Ionen reduziert. Diese Cu(I)-Ionen können das aufgenommene Elektron an Sauerstoff abgeben, wobei das Superoxidanion entsteht, welches durch Dismutation zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt. Das somit regenerierte Cu(II) kann nun wieder reduziert werden.

Es ist bekannt, dass ROS, wie Wasserstoffperoxid oder das aus Superoxid und dem NO-Radikal gebildete Peroxynitrit, für das Überleben und Wachstum der Zelle verantwortliche Signalwege aktivieren können. Dazu gehören die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und der PI3K/Akt-Signalweg (Wang et al., 1998; Schieke et al., 1999; Klotz et al., 2000; Wang et al., 2000).

Auch für verschiedenste Metallionen konnte gezeigt werden, dass sie den Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und nachfolgend den Ras/MEK/ERK-Signalweg aktivieren (Samet et al., 1998; Wu et al., 1999). Für den PI3K/Akt-Signalweg konnte eine Aktivierung durch Kupfer- und Zinkionen beobachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass Kupferionen Akt unabhängig von Wasserstoffperoxid aktivieren (Ostrakovitch et al., 2002). Auch Zink zeigte eine PI3K-abhängige Aktivierung von Akt (Kim et al., 2000), wobei in Atemwegsepithelzellen ein Abbau von PTEN als mögliche Ursache gefunden wurde (Wu et al., 2003). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Schwermetallionen, welche in Enzymen der antioxidativen Abwehr eine Rolle spielen, auch durch Aktivierung von Signalwegen zum Wachstum und Überleben der Zelle beitragen können.

Ein weiteres Spurenelement, welches in der Zelle am Schutz vor Oxidation beteiligt ist, ist Selen. In Form von Selenit fördert es in verschiedenen Zellen das Überleben durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges (Yoon et al., 2002; Lee et al., 2003b).

1.5 Selen im Organismus

Selen wurde lange Zeit nur als toxisches Element angesehen. Erst in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden die nützlichen Wirkungen von Selen als Spurenelement bemerkt (Schwarz & Folz, 1958). Im Unterschied zu den Übergangsmetallionen, welche im vorherigen Abschnitt besprochen wurden, hat Selen keine strukturgebende Funktion in Proteinen, sondern wird in Form der Aminosäure Selenocystein in das Protein eingebaut. Lange Zeit war ungeklärt, wie dies funktioniert, da die üblichen von Aminoacyl-tRNAs erkannten Codons nur für die bekannten 20 proteinogenen Aminosäuren codierten. Schließlich wurde gezeigt, dass unter bestimmten Umständen ein UGA-Codon, welches eigentlich als Stop-Codon fungiert, für Selenocystein codieren kann (Chambers et al., 1986). Dabei benötigt die zu translatierende mRNA im 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) eine sogenannte Selenocystein

Insertionssequenz (SECIS), welche eine haarnadelförmige Struktur hat (Hill et al., 1993). Nur im Falle des Vorliegens dieses Sekundärstrukturelements erfolgt an einem UGA-Codon der Einbau eines Selenocysteins anstelle eines Abbruchs der Translation (Abb. 1.7).

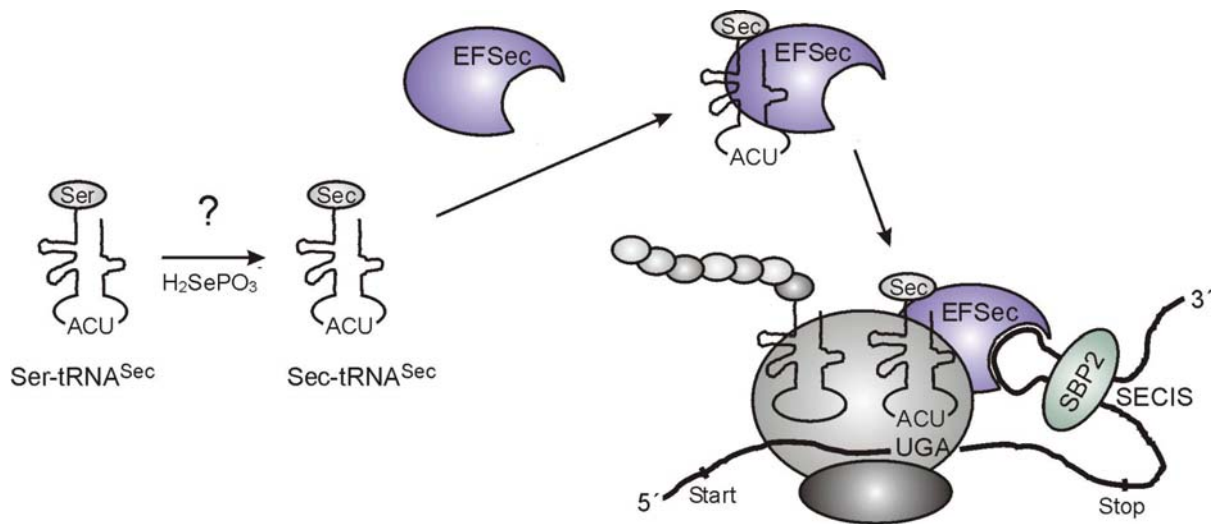


Abb. 1.7: Mechanismus des Einbaus von Selenocystein bei der Translation (nach Gromer et al., 2005)

Die mit Serin beladene selenocysteinspezifische tRNA (Ser-tRNA^{Sec}) wird enzymatisch in Sec-tRNA^{Sec} umgewandelt, wobei Monoselenophosphat als Selenquelle vermutet wird. Die so gebildete Sec-tRNA^{Sec} bindet an den selenocysteinspezifischen Elongationsfaktor EFSec. Dieser Komplex bindet seinerseits an den vorher gebildeten Komplex aus der Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS) und dem SECIS-bindenden Protein (SBP2). Dadurch wird die Sec-tRNA^{Sec} in die Nähe des Ribosoms gebracht, wo Selenocystein (Sec) bei der Proteinbiosynthese in die Polypeptidkette eingebaut werden kann.

Somit gilt Selenocystein (Sec) als die 21. proteinogene Aminosäure, welche im Falle der Archaeobakterien kürzlich noch durch Pyrrolysin, welches auch über ein Stop-Codon eingebaut wird, als 22. proteinogene Aminosäure ergänzt wurde (Srinivasan et al., 2002). Der Einbau von Selenocystein erfordert eine komplexe Maschinerie (Abb. 1.7). So erkennt das SECIS-bindende Protein (SBP2) das SECIS-Element der mRNA und bindet an dieses (Hubert et al., 1996). Der Selenocystein-spezifische Translationsfaktor EFSec bindet an die selenocysteinspezifische tRNA^{Sec}, welche ursprünglich mit Serin, welches dann enzymatisch in Selenocystein umgewandelt wurde, beladen war (Lee et al., 1989; Gromer et al., 2005). Durch die Bindung an SBP2 wird EFSec zum Ribosom gebracht, wo Selenocystein bei der Synthese des Proteins eingebaut wird (Fagegaltier et al., 2000).

Proteine, welche Selenocystein enthalten, werden als Selenoproteine bezeichnet und die Gesamtheit der Selenoproteine in einem Organismus als das Selenoproteom. Beim Menschen

wurden mit Hilfe eines bioinformatischen Ansatzes 25 Selenoproteine identifiziert (Kryukov et al., 2003). In anderen höheren Organismen gibt es teilweise deutlich weniger Selenoproteine. So synthetisiert der Fadenwurm *C. elegans* nur ein einziges (Taskov et al., 2005), *Drosophila melanogaster* immerhin drei (Martin-Romero et al., 2001) und der einzellige Malaria-Erreger der Gattung *Plasmodium falciparum* vier Selenoproteine (Lobanov et al., 2006).

Beim Menschen ist die Funktion von einer Vielzahl der Selenoproteine bisher nicht sicher geklärt. Alle Selenoproteine mit bekannter enzymatischer Funktion enthalten in ihrem aktiven Zentrum ein Selenocystein (Schweizer et al., 2004). Das zuerst entdeckte und bekannteste Selenoprotein ist die Glutathionperoxidase (Flohé et al., 1973; Rotruck et al., 1973). Inzwischen sind sechs verschiedene Isoformen der Glutathionperoxidase (GPx) bekannt, welche sich in ihrer Verteilung in Geweben und in der Zelle unterscheiden (Brigelius-Flohé, 1999). Die GPx katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser unter Oxidation von Glutathion zum Glutathiondisulfid und ist somit am Schutz der Zelle gegen oxidativen Stress beteiligt. Auch andere Selenoproteine wie z.B. Selenoprotein P oder Thioredoxinreduktase, welche nicht nur Thioredoxin, sondern auch Peroxide reduziert, haben antioxidative Funktionen (Mustacich & Powis, 2000).

1.5.1 Selenoprotein P

Dabei stellt Selenoprotein P (SeP) eine Ausnahme dar, weil es das einzige bekannte Selenoprotein mit mehr als einem Selenocysteinrest ist. Es wurde 1977 als zweites Selenoprotein überhaupt im Blutplasma nachgewiesen, woher auch der Name (P für Plasma) kommt (Herrman, 1977). SeP, dessen Plasmakonzentration auf 40 nM geschätzt wird, enthält rund 50 % des im menschlichen Blutplasma vorhandenen Selens (Akesson et al., 1994).

Das Gen von Selenoprotein P besteht beim Menschen und Mäusen aus insgesamt 5 Exons, welche zehn für Selenocystein codierende TGA-Codons und zwei SECIS-Elemente (Abb 1.8) enthalten (Burk & Hill, 2005). Im Gegensatz dazu wurden beim Zebrafisch zwei für Selenoprotein P codierende Gene gefunden, von denen das eine 17 Selenocysteine und zwei SECIS-Elemente enthält, während bei dem anderen nur je ein Selenocystein und ein SECIS-Element vorhanden waren (Kryukov & Gladishev, 2000). In den Genomen von *C. elegans*

und *Drosophila* wurde kein Selenoprotein P gefunden, so dass dieses Gen anscheinend nur bei Vertebraten existiert (Kryukov et al., 2003).

Selenoprotein P wird in zwei Domänen unterteilt (Abb. 1.8). Dabei enthält die größere N-terminale Domäne (244 Aminosäuren in Ratte) nur ein Selenocystein, eine Heparin-Bindestelle und zwei histidinreiche Regionen. Die C-terminale Domäne ist kürzer (122 Aminosäuren in Ratte) und enthält neun Selenocysteine (Burk & Hill, 2005).

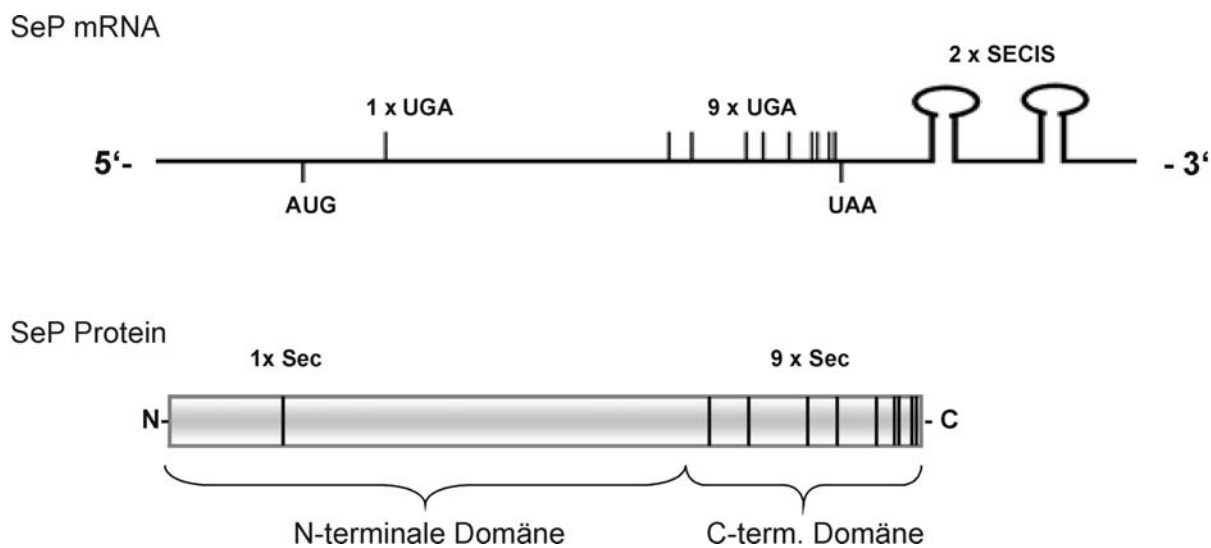


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der mRNA und des Proteins von Selenoprotein P (SeP)

In der mRNA von Selenoprotein P codieren insgesamt zehn UGA-Codons, welche sonst als Stop-Codons fungieren, für Selenocystein. Selenoprotein P ist das einzige Selenoprotein dessen mRNA für mehr als ein Selenocystein (Sec) codiert und welches zwei Selenocysteininsertionssequenzen (SECIS) besitzt. Dabei besitzt die N-terminale Domäne des Proteins, welcher Peroxidaseaktivität zugeschrieben wird, nur ein Selenocystein, während der C-Terminus insgesamt neun Selenocysteine enthält.

Neben dem vollständigen SeP wurden bei Ratten auch drei kürzere Isoformen gefunden, bei welchen nach dem zweiten, dritten oder siebten UGA-Codon die Translation abgebrochen wurde (Ma et al., 2002). Dies zeigt, dass die für Selenocystein codierenden UGA-Codons unter gewissen Umständen auch als Stop-Codon fungieren können. Die Masse von SeP aus Ratte wurde per Massenspektrometrie bestimmt und beträgt 50,5 kDa, während die mRNA nur für ein Protein mit 41,1 kDa codiert (Hill et al., 1991). Diese Diskrepanz lässt sich durch

mehrfache Glykosylierung von SeP erklären, wie Massenspektrometrie und Behandlung mit Glykosidase zeigten (Read et al., 1990; Ma et al., 2003). Diese Ergebnisse lassen sich auch auf menschliches SeP übertragen, welches in Zellkulturüberständen verschiedene Isoformen mit Massen zwischen 51 und 67 kDa im SDS-Gel zeigt, welche auch bei Behandlung mit Glukosidase bei niedrigeren Molekulargewichten laufen (Mostert et al., 1998; Steinbrenner et al., 2006a).

Aufgrund des hohen Selengehalts und der Anwesenheit im Blutplasma wurde früh angenommen, dass SeP eine Funktion als Transporter für Selen hat (Motsenbocker & Tappel, 1982). Dabei ist die Leber die Hauptquelle für SeP im Blutplasma. SeP-Knockout-Mäuse zeigten im Gehirn und in den Hoden stark gesunkene und in Niere und anderen Geweben leicht gesunkene Selenkonzentrationen. Im Gegensatz dazu war der Selengehalt der Leber gleich oder erhöht (Hill et al., 2003; Schomburg et al., 2003). Auch die Ausscheidung von größeren Mengen an Selen im Urin wurde festgestellt, was zeigt, dass die Leber von SeP-Knockout-Mäusen zwar zur Aufnahme von Selen in der Lage ist, es jedoch nicht zur Synthese von SeP heranzieht, sondern ausscheidet (Burk et al., 2004). Ein anderes Knockout-Modell benutzte Mäuse, in deren Leber gezielt das Gen für die Selenocystein-tRNA ausgeschaltet wurde. Dabei sanken der Selengehalt im Plasma und in der Niere deutlich. Überraschenderweise zeigte sich im Gehirn keine Veränderung des Selengehalts und keine Störung seiner Funktion (Schweizer et al., 2005). Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen aus Studien an SeP-Knockout-Mäusen, die schwere neurologische Schäden wie epileptische Anfälle und Bewegungsstörungen zeigten, was aber durch die Fütterung von selenreicher Nahrung verhindert werden konnte (Hill et al., 2004). Somit scheint das Gehirn eine andere Quelle für SeP als die Leber zu haben.

Neben der Funktion als Selentransporter weisen verschiedene Ergebnisse auch auf eine antioxidative, enzymatische Aktivität von SeP hin. So schützte SeP in Rattenleber vor Oxidation durch Diquat (Burk et al., 1995) und es zeigte in zellfreien Systemen eine Peroxidaseaktivität, indem es Phosphatidylcholinhydroperoxid über Oxidation von Glutathion oder Thioredoxin reduzierte (Saito et al., 1999; Takebe et al., 2002). Für diese Aktivität wird die SecXxxXxxCys (UxxC)-Sequenz im N-Terminus, welche das erste Selenocystein beinhaltet, verantwortlich gemacht (Saito et al., 2004). Weitere in-vitro Experimente zeigten, dass Zugabe von SeP den Schutz von Plasmaproteinen gegen Peroxynitrit und von Lipoproteinen (LDL) gegen Oxidation durch freie Radikale verbesserte (Sies & Arteel, 2000;

Traulsen et al., 2004). Durch Inkubation mit SeP konnte in Astrocytom- und Endothelzellen eine Erhöhung der Aktivität von antioxidativen Selenoenzymen wie der GPx beobachtet werden, was zu einem Schutz der Zellen vor oxidativem Stress führte (Steinbrenner et al., 2006a/b).

1.5.2 Regulation der Synthese von Selenoprotein P

Über die Regulation von SeP ist bisher nur sehr wenig bekannt. Für die Translation wird eine Selenquelle benötigt, wobei die Abwesenheit von Selen in Rattenleber keinen Einfluss auf die Transkription von SeP hatte (Burk & Hill, 1994). Sequenzierung der Promotoren der SeP-Gene aus Mensch und Maus haben eine große Anzahl von möglichen Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren ergeben (Dreher et al., 1997; Steinert et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des SeP-Promoters bei Behandlung mit den Cytokinen TNF- α , Interferon- γ und Interleukin-1 β abnahm (Dreher et al., 1997). Weitere Versuche zeigten, dass diese Cytokine nur die Promoteraktivität, nicht aber die Menge an Selenoprotein P mRNA und Protein verminderten. Nur TGF-beta inhibierte deutlich die Synthese von SeP-mRNA und -Protein (Mostert et al., 1999). Dieser Effekt wurde über die Transkriptionsfaktoren Smad 3 und 4 übermittelt und stellt eine Reaktion auf Entzündungsprozesse dar (Mostert et al., 2001).

1.6 Fragestellung

- 1.) Der Akt/FoxO-Signalweg ist von entscheidender Bedeutung für den Schutz von Zellen gegen oxidativen Stress und damit verbundene Alterung dieser Zellen. Als Zielgene von FoxO-Transkriptionsfaktoren mit antioxidativer Funktion konnten bisher Mangan-Superoxiddismutase und Catalase identifiziert werden. In einem cDNA-Microarray wurde die Steigerung der Expression von Selenoprotein P nach Überexpression von FoxO3a gezeigt (Tran et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob Selenoprotein P über FoxO-Transkriptionsfaktoren in Leberzellen reguliert wird und welchen Einfluss die beiden vermeintlichen Bindeelemente für FoxO-Transkriptionsfaktoren im Selenoprotein P-Promoter haben.
- 2.) Die Hauptquelle für SeP im Blutplasma ist die Leber, während das Gehirn sich scheinbar eigenständig mit SeP versorgt. Daher soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Regulation von SeP in Astrocytomzellen, welche die Neuronen im Gehirn versorgen und schützen, mit der in Leberzellen identisch ist.
- 3.) Der Akt/FoxO-Signalweg reguliert nicht nur antioxidative Enzyme, sondern wird selbst auch durch oxidativen Stress reguliert. Metallionen können verschiedene Arten von Stress auf Zellen ausüben. Eine Möglichkeit, den Akt-Signalweg zu aktivieren, ist die Behandlung von Zellen mit Kupfer- oder Zinkionen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob Metallionen FoxO-Transkriptionsfaktoren und deren Zielgene modulieren, und ob somit ein Zusammenhang zwischen Kupfer- und Selenhomöostase (über SeP) besteht.

2. Material und Methoden

Die verwendeten Substanzen wurden, falls nicht anders angegeben, von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Alle nicht erwähnten Kleingeräte entsprachen den allgemeinen Laborstandards.

2.1 Eukaryontische Zellkultur

2.1.1 Stammhaltung und Anzucht eukaryontischer Zellen

Tabelle 2.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

Name der Zelllinie	Beschreibung	Referenz/Bezugsquelle
HepG2	Humane Hepatomzellen aus einem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom eines 15 jährigen kaukasischen Jungen	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC No.: 85011430) Freundlicherweise von PD Dr. J. Bode (Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt
H4IIE-C3	Rattenhepatomzellen aus einem H35-Reuber Hepatom	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC No.: 85061112) Freundlicherweise von PD Dr. A. Barthel (BG Kliniken Bergmannsheil, Bochum) zur Verfügung gestellt
FKHR-ER-CC	H4-IIE-C3 Rattenhepatomzellen, stabil transfiziert mit einer induzierbaren FoxO1-ER-Chimäre	Freundlicherweise von PD Dr. A. Barthel (Bochum) zur Verfügung gestellt (Orth et al., 2004)
MOG-G-CCM	Humane Astrozytomzellen aus einem anaplastischen Astrozytom eines normalen Erwachsenen Gehirns	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC No.: 86022702) Freundlicherweise von Prof. Dr. P. Brenneisen zur Verfügung gestellt

HepG2-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose, das mit 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) supplementiert war, in einer wasserdampfgesättigten, 37 °C warmen Atmosphäre mit 5 % (v/v) Kohlendioxid kultiviert. Bei Abwesenheit von FCS wurde dieses Komplettmedium als serumfreies Medium bezeichnet.

Zum Passagieren und Vermehren wurden die Zellen nach Erreichen einer 70–80 %igen Konfluenz mit PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,4; 2,6 mM KCl, 1,4 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 6,4 mM Na_2HPO_4) gewaschen und nach Abnahme des Waschpuffers mit einer Trypsin-EDTA : PBS Lösung (1:1) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 2-5 min mit dem Anzuchtmedium abgestoppt, die Zellen resuspendiert und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen und –schalen überführt.

H4IIE-C3 und FKHR-ER-CC-Zellen wurden auf dieselbe Weise in Kultur gehalten, wobei bei den FKHR-ER-CC-Zellen zur Selektion dem Komplettmedium 2 µg/ml Blasticidin-S hinzugefügt wurde.

MOG-G-CCM-Zellen wurden unter gleichen Bedingungen in Ham's F10 : DMEM (1:1) mit 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) kultiviert.

2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden möglichst in früheren Passagen verwendet. Nach dem Abstoppen der Trypsinierung (s.o.) wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium (Komplettmedium mit 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO) wieder aufgenommen und mit einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/ml in speziellen Kryogeßäßen bei -80 °C eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden schnell aufgetaut und in eine 75 cm² Kulturflasche mit Komplettmedium überführt. Um den DMSO-Gehalt im Medium auf unter 1% zu reduzieren und dadurch einer Membranschädigung vorzubeugen, wurde nach 24 Std. ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.1.3 Behandlung von Zellen mit Schwermetallionen

HepG2-Zellen wurden in Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70 bis 90 % in Vollmedium kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und evtl. für 24 h im serumfreiem Medium kultiviert. Vor der Behandlung wurden die Zellen gegebenenfalls mit den PI3K-Inhibitoren Wortmannin (Calbiochem, San Diego, USA), LY294002 (Calbiochem) oder den MEK1/2-Inhibitoren PD98056 (Alexis Biochemicals, San Diego, USA), U0126 (Alexis Biochemicals) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 30 bis 60 min präinkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in Hank's balanced salt solution (HBSS) die Zellen mit 10 bis 100 μ M Metallsalzen und gegebenenfalls wieder DMSO/Inhibitoren für 30 bis 60 min inkubiert. Nach der Behandlung wurden das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellen in 2 x Lämmli-Puffer lysiert. Alternativ wurden die Zellen in DMEM anstelle von HBSS behandelt. Als Positiv-Kontrolle für die Aktivierung des Akt-Signalweges wurden 100 nM Insulin (Roche, Mannheim) benutzt.

2.1.4 Behandlung von Zellen zur Analyse der SeP-Produktion (Western-Blot)

HepG2-Zellen wurden in 60 mm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70 bis 80 % in Vollmedium kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in 2 ml serumfreiem Medium eventuell mit 0,2 μ M Selenit unter Zugabe von gegebenenfalls 50 μ M LY294002 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 60 min präinkubiert und dann für 24 h gegebenenfalls unter Zugabe von 100 nM Insulin koinkubiert.

Transient transfizierte HepG2-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion (2.17) mit PBS gewaschen und dann in 1 ml serumfreiem Medium mit 0,2 μ M Selenit für 24 h gegebenenfalls unter Zugabe von 100 nM Insulin inkubiert.

Die Kulturüberstände dieser Versuche wurden gesammelt, für 10 min bei 14000 UpM und 4 °C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und dann der Überstand bei – 80 °C verwahrt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 200 μ l 1 % SDS lysiert und bei – 80 °C verwahrt. Später wurde eine Proteinbestimmung (2.12) der Lysate durchgeführt und der Überstand auf diese normiert.

MOG-G-CCM-Zellen wurden in 60 mm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70 bis 80 % in Vollmedium kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in 2 ml serumfreiem Medium eventuell mit 0,2 μ M Selenit unter Zugabe von 20 μ M LY294002 oder 100 nM Wortmannin bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 24 h inkubiert. Nach der Behandlung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in 200 μ l 1 % SDS lysiert und bei – 80 °C verwahrt.

Transient transfizierte MOG-G-CCM-Zellen in 60 mm Kulturschalen wurden 24 h nach der Transfektion (2.17) mit PBS gewaschen und dann in 2 ml serumfreiem Medium gegebenenfalls unter Zugabe von 0,2 μ M Selenit für 24 h inkubiert. Nach der Behandlung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in 200 μ l 1 % SDS lysiert und bei – 80 °C verwahrt.

2.2 Bakterienkultur

2.2.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp ^a	Quelle
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17, (r_K⁻, m_K⁺), relA1, supE44, $\Delta(lac-proAB)$, [F', <i>traD36, proAB, lacI^qZAM15</i>]</i>	Promega, Madison, USA
<i>E. coli</i> Fusion-Blue Competent Cells	<i>endA1, hsdR17 (r_{K12}⁻, m_{K12}⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F' <i>proA⁺ B⁺, lacI^qZAM15 Tn10(Tet^r)</i>]</i>	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
<i>E. coli</i> XL1-Blue supercompetent cells	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' <i>proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r)</i>]</i>	Stratagene, La Jolla, USA

^a Die Bezeichnungen der Genotypen entsprechen der allgemeinen Nomenklatur für *E. coli*

2.2.2 Anzucht der Bakterien

Alle Nährmedien wurden bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wie Antibiotika wurden vor ihrer Verwendung mit einem Membranfilter (Millipore, Eschborn) sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur unterhalb von 60 °C nachträglich zugesetzt.

LB-Flüssigmedium (Sambrook et al., 1989)

10	g	NaCl
10	g	Trypton
5	g	Hefeextrakt
ad 1000	ml	dH ₂ O

LB-Agar

15	g	Agar
ad 1000	ml	LB-Flüssigmedium

SOC-Medium (pH 7)

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

Vor Gebrauch Zugabe von:

10	ml	MgCl ₂ (1 M)
20	ml	Glucose (1 M)

Slant 50:50

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

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte bei 37 °C in LB-Medium. Dabei wurden Stämme mit plasmidcodierten Antibiotikaresistenzen unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert. Den Nährmedien wurden dazu folgende Konzentrationen der jeweiligen Antibiotika zugegeben:

Ampicillin:	100	µg/ml
Chloramphenicol:	34	µg/ml
Kanamycin:	30	µg/ml

Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden im Reagenzglas, größere Kulturen im Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler bei 180 UpM bebrütet.

Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von Transformationsplatten oder einigen µl einer Gefrierkultur angeimpft. Wenn diese mindestens 16 h bebrütet wurden, bezeichnete man sie als Übernachtskulturen (ÜK). Hauptkulturen wurden mit einer für 8 h bebrüteten Vorkultur im Verhältnis 1:1000 angeimpft und über Nacht bebrütet.

2.2.3 Herstellung von *E. coli*-Gefrierkulturen

Nach dem Animpfen einer Hauptkultur wurde bei Bedarf der Rest der Vorkultur in einer Tischzentrifuge für 1 min bei 5000 UpM abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Slant 50:50 resuspendiert und bei –80 °C gelagert.

2.3 Transformation von *Escheria coli* mit Plasmid-DNA und Expression

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Bei einer Retransformation wurden zu einem auf Eis aufgetauten Ansatz transformationskompetenter *E. coli* JM109-Zellen 0,5 µg isolierter Plasmid-DNA hinzugegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 s, 2 min Inkubation auf Eis und Zugabe von 0,7 ml SOC-Medium folgte die Expression, bei welcher der Ansatz unter Schütteln für 1 h bei 37 °C inkubiert wurde.

Zur Transformation von Ligationsansätzen wurden 2 µl Ligationsansatz zu einem auf Eis aufgetauten Ansatz transformationskompetenter *E. coli* Fusion-Blue Competent Cells hinzugegeben und der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für

30 s und einer zweiminütigen Inkubation auf Eis folgte nach Zugabe von 0,5 ml SOC-Medium auch hier die Expression.

Von den Ansätzen wurden je 100 µl auf entsprechendem Selektiv-LB-Agar ausplattiert.

Tabelle 2.3 und 2.4 beinhalten die für die Transformation benutzten Plasmide.

Tabelle 2.3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten rekombinanten Plasmide.

Rekombinante Plasmide	Genetische Marken	Referenz
pEGFP-FKHR	FKHR cDNA in pEGFP-C1; Resistenzen: Kan ^a , Neo ^a	Kortylewski et al., 2003 ^b
pEGFP-FKHR-TSS-Ala	T24A-S256A-S319A-Mutante von pEGFP-FKHR; Resistenzen: Kan, Neo	Kortylewski et al., 2003 ^b
FKHR	FKHR cDNA in pAlter-MAX unter Kontrolle des CMV-Promoters; Resistenz: Cm ^a	Guo et al., 1999 ^c
FKHR-TSS-Ala	T24A-S256A-S319A-Mutante von FKHR; Resistenz: Cm	Guo et al., 1999 ^c
Myr-Akt	N-Terminal myristoyliertes Akt1 in pUSEamp; Resistenzen: Amp ^a , Neo	Upstate, Lake Placid, USA
6xDBE-luc	6 x DBE-Sequenz in pGL3-basic; Resistenz: Amp	Furuyama et al., 2000 ^d
G6Pase-luc	-1227/+57 G6Pase-Promoter in pGL3-basic; Resistenz: Amp	Schmoll et al., 1999 ^b
BK4GL3 (SeP-luc)	-1808/-14 SeP-Promoter in pGL3-basic; Resistenz: Amp	Mostert et al., 2001 ^e
SeP-Mut1-luc	-349G(C)-Mutante von SeP-luc; Resistenz: Amp	diese Arbeit
SeP-Mut2-luc	-110C(G)-Mutante von SeP-luc; Resistenz: Amp	diese Arbeit
SeP-Mut1/2-luc	-349G(C) und -110C(G)-Mutante von SeP-luc; Resistenz: Amp	diese Arbeit
SeP234-luc	-234/-14 SeP-Promoter-Fragment in pGL3-basic; Resistenz: Amp	diese Arbeit

^a Abkürzungen: Amp, Ampicillin; Cm, Chloramphenicol; Kan, Kanamycin; Neo, Neomycin

^b Freundlicherweise von PD Dr. A. Barthel (BG Kliniken Bergmannsheil, Bochum) zur Verfügung gestellt

^c Freundlicherweise von Dr. D. Schmoll (Sanofi-Aventis, Frankfurt) zur Verfügung gestellt

^d Freundlicherweise von Prof. Dr. B. Burgering (University Medical Center Utrecht) zur Verfügung gestellt

^e Freundlicherweise von Prof. Dr. J. Köhrle (Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt

Tabelle 2.4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Kontroll-Plasmide.

Kontroll-Plasmide	Eigenschaften	Referenz/Bezugsquelle
pGL3-basic	codiert die Glühwürmchen (firefly) Luciferase aus <i>Photinus pyralis</i> ; Resistenz: Amp ^a	Promega
pRL-SV40	codiert die <i>Renilla</i> Luciferase aus <i>Renilla reniformis</i> unter Kontrolle des SV40-Promoters; Resistenz: Amp	Promega
pCI-Neo	Leervektor mit CMV-Promoter; Resistenzen : Amp, Neo ^a	Promega
pEGFP-C1	codiert EnhancedGreenFluorescent Protein unter Kontrolle des CMV-Promoters; Resistenzen: Kan ^a , Neo	BD Biosciences Clontech, Heidelberg

^a Abkürzungen: Amp, Ampicillin; Kan, Kanamycin; Neo, Neomycin

2.4 Präparation von Plasmid-DNA

2.4.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Von einer unter Selektionsdruck angezogenen ÜK wurden 5 ml genommen und die Bakterienzellen durch Zentrifugation (1 min, 10000 UpM, RT) geerntet. Der Kulturüberstand wurde vollständig entfernt und aus dem verbliebenen Sediment mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert. Abschließend wurde die Plasmid-DNA in 25-50 µl A. dest. aufgenommen.

2.4.2 Midi/Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Für Transfektionen wurden aus einer 50-100 ml Kultur größere Mengen an Plasmid-DNA nach Anweisung des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer isoliert. Dafür wurde die Kultur zuerst in einer Sorvall-Kühlzentrifuge mit einem SLA-1000-Rotor bei 4 °C für 10 min mit 5000 UpM abzentrifugiert und der Kulturüberstand gründlich entfernt.

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit folgenden Kits:

Midi-Präparation:

Pure Yield Plasmid Midiprep System	Promega
------------------------------------	---------

Maxi-Präparation:

Qia-Plasmid-Maxi-Prep (Endo-Free)	Qiagen
-----------------------------------	--------

Nucleo-Spin-EndoFree	Macherey-Nagel, Düren
----------------------	-----------------------

2.5 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren, welches auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden großer, geladener Moleküle im elektrischen Feld beruht. Nukleinsäuren, die aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ein konstantes Ladungs-Massen-Verhältnis besitzen, wandern aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Dabei hängt ihre Wanderungsgeschwindigkeit vom Molekulargewicht der DNA-Fragmente, ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Feldes ab. Die Agarose-Gelelektrophorese fand ihre Anwendung bei der präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten (2.6), bei der Analyse von DNA-Hydrolysierungen (2.8) und bei der Analyse von Produkten der RT-PCR (2.11).

Die Matrix der Gele bestand aus 1 % (w/v) Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA; pH 8,3). Die entsprechende Menge an Agarose wurde eingewogen und im gewünschten Volumen TAE-Puffer durch Erwärmen in der Mikrowelle gelöst. Zur Anfärbung der DNA im Gel wurde die aufgekochte Agaroselösung auf unter 60 °C abgekühlt und dann Ethidiumbromid in einer Konzentration von 5 µg/ml zugesetzt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die Helix von DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht Strahlung im sichtbaren Bereich ($\lambda = 452 \text{ nm}$) emittiert.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 30 % (v/v) Glycerol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau versetzt und in die Taschen der ausgehärteten Agarose-Gele pipettiert. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von bis zu 100 V mit TAE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Die Dokumentation der mit UV-Licht bestrahlten Gele erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage.

2.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das „NukleoSpin Extract II“ Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren. Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

2.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration von Plasmiden erfolgte spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm unter der Annahme, dass eine Extinktion von 1,0 etwa einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht.

2.8 *In vitro*-Rekombination von DNA

2.8.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die hydrolytische Spaltung der DNA erfolgte durch Typ II-Restriktionsendonukleasen, welche an eine spezifische Nukleotidsequenz binden und innerhalb dieser die DNA spalten. Für die hydrolytische Spaltung wurden die vom Hersteller empfohlenen Bedingungen mit dem jeweils optimalen Reaktionspuffer gewählt. Pro µg DNA wurden 5 bis 10 U der jeweiligen Restriktionsendonukleasen (Promega, Roche) verwendet und der Ansatz für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.8.2 Ligation von Vektor- und Fragment-DNA

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Verknüpfung der 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden von benachbarten, doppelsträngigen DNA-Molekülen zu Phosphordiesterbindungen.

In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurde 1 µg der Vektor-DNA nach Zugabe des T4-DNA-Ligasepuffers und von 3 U Ligase bei RT für 3 h inkubiert.

2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der rekombinanten Plasmide erfolgte als Auftragsarbeit am Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum der Universität Düsseldorf.

2.10 Isolierung von RNA

H4IIE-C3 oder FKHR-ER-CC-Zellen wurden in 60 mm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70 bis 80 % in Vollmedium kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 2 bis 24 h in 2 ml serumfreiem Medium, wenn benötigt unter Zugabe von 100 nm Insulin, 1 μ M 4-OH-Tamoxifen (EtOH als Lösungsmittelkontrolle) oder 0,2 μ M Selenit, inkubiert.

Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Flüssigkeit gründlich abgesaugt. Es wurden je 400 μ l Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) auf eine konfluente 6 cm Kulturschale gegeben, die Zellen mit einem Schaber abgekratzt, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Isolierung der RNA wurden die Trizol-Lysate aufgetaut, je 120 μ l Chloroform (Roth, Karlsruhe) hinzugegeben, für 10 sec unter starkem Schütteln gemischt und dann für 20 min bei 4°C mit $20800 \times g$ zentrifugiert. Währenddessen wurden neue Eppendorfgefäße mit je 280 μ l Isopropanol als Vorlage vorbereitet, in welche die nach der Zentrifugation obere, wässrige Phase vorsichtig überführt wurde. Diese Ansätze wurden für 10 sec unter starkem Schütteln gemischt und für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert.

Danach wurden die Proben für 20 min bei 4°C mit $20800 \times g$ zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und das entstandene RNA-Präzipitat mit 1 ml eiskalten 70 %igem Ethanol gewaschen. Es wurde für 10 min bei 4°C mit $20800 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen, noch einmal 5 min bei 4°C mit $20800 \times g$ zentrifugiert und der restliche Überstand vorsichtig entfernt. Die RNA wurde für etwa 5-15 min im Abzug luftgetrocknet. Je nach Präzipitatgröße wurden 40-100 μ l steriles A. dest. hinzupipettiert und zum Lösen für 10 min bei 65°C unter Schütteln inkubiert und resuspendiert.

Die RNA-Lösung wurde im Anschluss bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten oder bei -80°C eingefroren. Eine Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch

durch Messung der Extinktion bei 260 nm unter der Annahme, dass eine Extinktion von 1,0 etwa einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht.

2.11 RT-PCR

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von Invitrogen in lyophilisierter Form bezogen. Sie wurden in dem vom Hersteller angegebenen Volumen A. dest. aufgenommen, so dass sie in einer Konzentration von 100 pmol/µl vorlagen.

Tabelle 2.5: Liste der in dieser Arbeit für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotide.

Name	DNA-Sequenz (5'-3'-Richtung) und eingefügte Merkmale
G6Pase-rat-fwd*	TGGAGACTGGTTCAACCTCG
G6Pase-rat-rev*	ACGGTCGCACTCTTGCAGAA
SeP-rat-fwd	GCACAGTGACAGTGGTTGCT
SeP-rat-rev	GCTTACTGCTCCCAAGATGC
GAPDH-rat-sense	GATCGTGGAAGGGCTAATGA
GAPDH-rat-antisense (2)	GGATGCAGGGATGATGTTCT

*Barthel et al., 2001

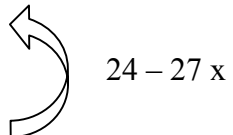
Die isolierte Gesamt-RNA (2.10) wurde mit Hilfe des „Omniscript-Kits“ (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde je 1 µg Gesamt-RNA in einem Ansatzvolumen von 20 µl umgeschrieben. Der Ansatz enthielt zudem den Reaktionspuffer aus dem Kit (1x), reverse Transkriptase (1 U), dNTPs (je 500 µM), Oligodesoxythymidin (dT₁₅, 10 µM; Invitrogen) und „RNaseOUT“ RNase Inhibitor (10 U; Invitrogen). Der Ansatz wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und die erhaltene cDNA, falls nötig, bei –20 °C gelagert.

Die über Polymerasekettenreaktion durchgeführte Amplifikation von Zielsequenzen aus der entstandenen cDNA erfolgte in einem „T-Personal“-Thermocycler (Biometra, Göttingen). Dafür wurden je 2 µl des Produkts aus oben genannten RT-Ansätzen in einem Gesamtvolumen von 20 µl amplifiziert. Der Ansatz enthielt Taq-Polymerase (1 U; Qiagen), den zugehörigen PCR-Puffer (1x; Qiagen), dNTP-Mix (je 200 µM) sowie je 0,5-1,5 µM der jeweiligen Primer. Eine Liste der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primer findet sich in

Tabelle 2.6. Die Amplifikation im Thermocycler wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 2.6: Programm der PCR

Programmschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Vollständige Denaturierung	95	2
Denaturierung	95	0,5
Annealing	60	0,5
Elongation	72	1
Finale Elongation	72	10



Die Zyklenzahl variierte dabei mit den eingesetzten Primerpaaren (SeP: 27 Zyklen; G6Pase: 25 Zyklen; GAPDH: 24 Zyklen). Die entstandenen PCR-Produkte hatten Größen von 527 bp für SeP, 804 bp für G6Pase und 124 bp für GAPDH.

2.12 Proteinbestimmung nach Lowry

(Lowry et al., 1951)

Die Proteinkonzentration der SDS-Proteinlysate wurde auf Basis der von Lowry entwickelten Methode mit Hilfe des kommerziell erhältlichen „Dc Protein Assay“ (Biorad, Hercules, USA) nach Angaben des Herstellers über die Absorption bei 750 nm bestimmt. Zur Berechnung der Proteinkonzentration aus der Absorption wurde bei jeder Messung eine Eichgerade mit BSA-Standardlösungen (0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 mg/ml) erstellt.

2.13 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(SDS-PAGE nach Laemmli, 1970)

2 x SDS-Probenpuffer

125	mM	Tris-HCl (pH 6,8)
20 %	(w/v)	Glycerol
4 %	(w/v)	SDS
0,02 %	(w/v)	Bromphenolblau
100	mM	DTT

Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,8)

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

Trenngel, 12 % (w/v) Acrylamid

40 % (v/v) Sol 1
25 % (v/v) Sol 2
35 % (v/v) A. dest.
0,075 % (v/v) APS
0,0075 % (v/v) TEMED

Sammelgel, 4 % (w/v) Acrylamid

13,4 % (v/v) Sol 1
30 % (v/v) Sol 3
56,6 % (v/v) A. dest.
0,075 % (v/v) APS
0,0075 % (v/v) TEMED

Sol 1 (Acrylamid-Stammlösung)

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

Sol 2 (running buffer)

0,4 % (w/v) SDS
1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 8,8

Sol 3 (stacking buffer)

0,4 % (w/v) SDS
1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 6,8

APS

10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde mit einem diskontinuierlichen Gelsystem gearbeitet (Laemmli, 1970). Durch Komplexbildung der Proteine mit SDS wird infolge der negativen Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt. So wurden die Proteine während der Elektrophorese nur nach ihrer Molekülgröße getrennt. Die Proteine wurden in einem Sammelgel fokussiert und anschließend in einem Trenngel ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt.

Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5-10 min bei 95 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in einer vertikalen Gelapparatur „Novex Mini Cell“ (Invitrogen) in Elektrophorese-Laufpuffer durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei einer maximalen Stromstärke von 40 mA pro Gel.

2.14 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zum immunologischen Nachweis wurden die Proteine zuerst auf einer PVDF-Immuno-Blot-Membran „Hybond-P“ (Amersham, Braunschweig) immobilisiert und konnten dann über einen indirekten Enzym-Immunoassay nachgewiesen werden.

2.14.1 Elektro-Transfer auf PVDF-Membranen (Western-Blot)

Um die Proteine von einem SDS-Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran zu transferieren, wurde die „Novex-Mini-Cell-Tank-Apparatur“ (Invitrogen) benutzt. Für die Durchführung wurden pro Gel zwei 3 mm-Blottingpapiere (Schleicher & Schuell, Dassel) und eine PVDF-Membran in der Größe des Trenngels benötigt (ca. 9 cm x 7 cm). Die Filterpapiere und Schwämme wurden in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol; pH 8,5) eingeweicht. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran für 10 sec in Methanol equilibriert und anschließend auch in den Transferpuffer überführt. Auch das Gel wurde kurz in Transferpuffer equilibriert.

Beim Aufbau des Blots wurden zwei in Transferpuffer gesättigte Schwämme auf die Kathode gelegt; darauf kam ein eingeweichtes Filterpapier, auf welchem das Trenngel luftblasenfrei positioniert wurde. Die PVDF-Membran wurde nun ebenfalls luftblasenfrei auf das Gel gelegt, worauf das nächste Filterpapier folgte. Anschließend folgte entweder ein getränkter Schwamm und ein zweites Gel mit Membran und Filterpapier (mehr als zwei Gele sollten

aber in der Apparatur nicht geblottet werden) oder aber ausreichend in Transferpuffer getränkte Schwämme, um die Apparatur zu füllen. Der Transfer der Proteine erfolgte in Transferpuffer für 2 h bei einer Spannung von 20 V.

Zur Kontrolle des Transfers kann die Membran für eine Minute in Ponceau S-Lösung (5 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Ponceau S) geschwenkt werden, wobei die Proteinbanden eine rote Färbung erhalten. Im Anschluß kann die Membran in Wasser wieder entfärbt werden.

2.14.2 Immunodetektion

TBS-Puffer (pH 7,6)

20	mM	Tris-Base
137	mM	NaCl

TBST-Puffer

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

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran, wurde diese entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in TBST-Puffer mit 5 % (w/v) Milchpulver geblockt. Alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte wurden falls nicht anders angegeben bei RT und unter leichtem Schütteln durchgeführt.

Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurde die Membran als erstes entweder über Nacht bei 4 °C oder für 3 h bei RT mit dem primären Antikörper (Tabelle 2.7) inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Membran 1 h in TBST-Puffer gewaschen, wobei dieser mehrfach gewechselt wurde. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden sekundären Antikörper-HRP-Konjugat (Tabelle 2.7) für 1 h inkubiert. Erneut wurde die Membran zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper 1 h mit TBST-Puffer gewaschen, wobei der Puffer mindestens viermal gewechselt wurde. Das auf der Membran gebundene Protein konnte nun indirekt über die an den Zweitantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (HRP) mit Hilfe des ECL-Systems „SuperSignal® West Pico Chemiluminescent“ Substrat (Pierce, Rockford, USA) nachgewiesen werden. Dieses wurde nach den Herstellerangaben verwendet, wobei die Dokumentation über das Belichten eines Röntgenfilms (Amersham, Freiburg) erfolgte.

Tabelle 2.7: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller/Bezugsquelle	Verdünnung
Anti-phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology, Beverly, USA; # 9271	1:1000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-total-Akt	Cell Signaling Technology; # 9272	1:1000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology; # 9101	1:5000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-total ERK1/2	Cell Signaling Technology; # 9102	1:2000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-phospho-FoxO1 (Ser256)	Cell Signaling Technology; # 9461	1:1000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-phospho-FoxO1/ FoxO3a (Thr24/Thr32)	Cell Signaling Technology; # 9464	1:1000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-phospho-GSK- 3alpha/beta (Ser21/9)	Cell Signaling Technology; # 9331	1:1000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-phospho- (Ser/Thr) Akt Substrate	Cell Signaling Technology; # 9611	1:2000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-total FKHR	A.Barthel (Barthel et al., 2001)	1:10000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-SeP	V. Mostert (Mostert et al., 1998)	1:1000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-GAPDH	Chemicon International, Temecula, USA; # MAB374	1:2000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Sekundäre AK	Hersteller/Bezugsquelle	Verdünnung
Anti-Rabbit-HRP	Dianova, Hamburg; # 111-035-144	1:5000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST
Anti-Mouse-HRP	Amersham, Piscataway, USA; # NA931V	1:5000 in 5 % (w/v) Milchpulver/TBST

2.14.3 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)

Zur Entfernung von Antikörpern von proteinbeladenen Membranen wurde die Blotmembran für 30 min bei 50°C in Stripping-Puffer (62,5 mM Tris-Base, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS; pH 6,8) geschüttelt. Im Anschluß wurde die Membran zunächst gründlich in Leitungswasser und dann mehrmals mit TBST gewaschen, bis der Geruch von β -Mercaptoethanol verschwunden war. Hiernach konnte eine erneute Immunodetektion (2.14.2) durchgeführt werden.

2.15 Färbung von PVDF-Membranen

Die Färbung von PVDF-Membranen in Coomassie brilliant blue-Färbelösung (10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol, 0,2 % (v/v) Coomassie brilliant blue R250) erfolgte bei RT unter langsamem Schütteln. Nach 30 min Inkubation wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol) ersetzt, welche alle 20 min bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes gewechselt wurde.

2.16 Mutagenese-PCR

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von Invitrogen in lyophilisierter Form bezogen und in dem vom Hersteller angegebenen Volumen A. dest. aufgenommen.

Tabelle 2.8: Liste der in dieser Arbeit für die Mutagenese-PCR verwendeten Oligonukleotide.

Name	DNA-Sequenz (5'-3'-Richtung) und eingefügte Merkmale
SePMut1-fwd	GGCAACTTGGAGGCCTT <u>C</u> TTTACCCTTAGCCCTTC
SePMut1-rev	GAAGGGCTAAGGGTAAAG <u>A</u> AAGGCCTCCAAGTTGCC
SePMut2-fwd	CCTGAGGGGTGAGGTAAAG <u>A</u> AACAGGACTATAAATATC
SePMut2-rev	GATATTTATAGTCCTGTT <u>C</u> TTTACCTCACCCCTCAGG
SeP-seq1	CTAAGCTAGCACCTCATCACTG
SeP-seq2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC

Die Mutagenese der DNA erfolgte mit dem QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA) nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurden für die Herstellung der Mutanten 10 ng des Plasmids SeP-luc verwendet und mit je 125 ng der Primerpaare SePMut1-fwd/rev und SePMut2-fwd/rev. Für die Herstellung der Doppelmutante wurden 10 ng des Plasmids SeP-Mut1 als template verwendet und je 125 ng des Primerpaares SePMut2-fwd/rev. Nach Zugabe der mitgelieferten Polymerase wurden die Reaktionen im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 2.9: Programm der Mutagenese-PCR

Programmschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Vollständige Denaturierung	95	0,5
Denaturierung	95	0,5
Annealing	55	1
Elongation	68	7



12 x

Nach der *Dpn* I-Behandlung wurden je 1 µl der Ansätze in die mitgelieferten *E. coli* XL1-Blue supercompetent cells nach Protokoll transformiert und nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Je 200 µl der Ansätze wurden auf Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Einzelne Klone wurden in LB-Medium angezogen (2.2.2) und im Anschluß eine Mini-Präparation der Plasmid-DNA (2.4.1) durchgeführt. Nach einer Konzentrationsbestimmung der DNA (2.7) wurde diese auf einem Agarose-Gel analysiert (2.5) und zum Sequenzieren mit den Primern SeP-seq1/seq2 (2.9) gegeben.

2.17 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion von HepG2-Zellen erfolgte in 35 mm Kulturschalen bei 40-60 % Konfluenz mit dem Transfektionsreagenz Polyfect (Qiagen).

Für Luciferase-Reportergergenversuche (2.18) wurden die Zellen pro Ansatz mit 12 µl Polyfect mit je 0,75 µg Reporterplasmid (pGL3-Derivat), 0,75 µg Expressionsvektor und 0,1 µg pRL-SV40 nach dem Protokoll des Herstellers transfiziert.

Für alle anderen Versuche wurden die Zellen pro Ansatz mit 12 µl Polyfect mit je 1,5 µg Expressionsvektor nach dem Protokoll des Herstellers transfiziert.

Die transiente Transfektion von MOG-G-CCM erfolgte in 35 mm oder 60 mm Kulturschalen bei 60-70 % Konfluenz mit dem Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Roche). Die Zellen wurden mit je 3 µl FuGENE 6 (6 µl bei 60 mm Kulturschalen) mit je 1 µg Plasmid (2 µg) nach dem Protokoll des Herstellers transfiziert.

Nach der Transfektion wurden die Zellen bei 37 °C für 24 h inkubiert.

2.18 Luciferase-Reportergentests

Die Zellen wurden in 35 mm Kulturschalen mit den Reportergen-Plasmiden transient transfiziert (2.17) und 24 h nach der Behandlung gegebenenfalls mit 100 nM Wortmannin, 50 µM LY294002 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 60 min präinkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 18 h in 1 ml serumfreiem Medium, wenn benötigt unter Zugabe von 100 nm Insulin, Schwermetallsalzen oder 0,2 µM Selenit und gegebenenfalls wieder DMSO/PI3K-Inhibitoren inkubiert. Nach der Behandlung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in 100 µl „passiv lysis buffer“ (Promega) lysiert und bei –20 °C bis zur Messung eingefroren.

Die Messung der Luciferaseaktivität wurde mit dem „Dual LuciferaseTM Reporter Assay System“ durchgeführt. In Mikrotiterplatten wurde durch Mischen von 10-20 µl Lysat mit 50 µl „Luciferase Assay Reagent II“ wurde die Lichtreaktion der Firefly-Luciferase gestartet und für 2 s im „Victor 1420 Multilabel Counter“ (PerkinElmer Wallac, Freiburg) die Fluoreszenz gemessen. Durch die Zugabe von 50 µl „Stop & GloTM Reagent“ wurde die Fluoreszenz der Firefly-Luciferase gequencht und stattdessen die Fluoreszenz der Renilla-Luciferase aktiviert und auch über einen Zeitraum von 2 s die resultierende Lichtemission gemessen.

2.19 Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen wurden in 35 mm Kulturschalen mit Glasplättchen ausgesät und 24 h vor der Behandlung mit pEGFP-Plasmiden transient transfiziert (2.17). Vor der Behandlung wurden die Zellen gegebenenfalls mit 100 nM Wortmannin bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle

für 30 min präinkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und HBSS hinzugegeben. Zur Behandlung wurden die Zellen mit 10 bis 50 μ M Metallsalzen oder 100 nM Insulin und gegebenenfalls wieder DMSO/Wortmannin für 30 min inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei wurde mit Licht des Wellenlängenbereichs 450 bis 490 nm angeregt und bei einer 400-fachen Vergrößerung digitale Aufnahmen der Lichtemission der transfizierten Zellen im Wellenlängenbereich von 515 bis 565 nm gemacht, welche später ausgewertet wurden. Die Aufnahmen von Zellen mit EGFP-Fusionsproteinen wurden an einem inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 TV (Zeiss, Göttingen) mit einer Hamamatsu C4742-95 Digitalkamera und der Software AquaCosmos (Hamamatsu, Herrsching) durchgeführt.

2.20 Viabilitätstest (Neutralrot)

Neutralrot ist ein lipophiler und somit membrangängiger Vitalfarbstoff, welcher in den Liposomen von vitalen Zellen gespeichert wird. Somit entspricht die Menge des in einer Zellpopulation enthaltenen Farbstoffs der Zahl der vitalen Zellen.

HepG2-Zellen wurden in 24 well Kulturschalen bis 70 bis 80 % Konfluenz herangezogen, entsprechend behandelt und nach 6 bzw. 24 h das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und mit je 0,5 ml Neutralrot-Medium (0,5 ml Neutralrot-Lösung (3,3 g/l in DPBS) ad 100 ml serumfreies Medium) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Neutralrot-Medium wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und je 0,5 ml Fixierlösung (50 % (v/v) Ethanol, 1 % (v/v) Eisessig, 49 % (v/v) H₂O) hinzugegeben. Die Zellen wurden nun kurz bei RT geschüttelt und dann die Extinktion der Überstände bei 550 und 405 nm photometrisch gegen die Fixierlösung als Referenzwert gemessen.

2.21 Computerprogramme

Zur Analyse von DNA-Sequenzen wurde das Programmpaket DNASTAR™ der Fa. Lasergene benutzt. Zur Auswertung von Sequenzierungen wurde das Programm Chromas 2 der Fa. Technolysium Pty Ltd benutzt und für die Densitometrie das Programm Scion Image der Fa. Scion Corporation verwendet.

3. Ergebnisse

Der Akt/FoxO-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation von einer wachsenden Zahl an bekannten Zielgenen und wird auch von einer Vielzahl von äußeren Faktoren reguliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sowohl der Einfluss des Akt/FoxO-Signalweges auf Selenoprotein P (SeP) als Produkt eines möglichen Zielgens, als auch von Schwermetallionen als potentielle Aktivatoren des Signalweges untersucht.

3.1 PI3K-abhängige Aktivierung des Akt/FoxO-Signalweges durch Insulin

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich die bekannte Aktivierung des Akt/FoxO-Signalweges durch Insulin unter den gegebenen Zellkulturbedingungen in HepG2-Zellen, einer humanen Hepatomzelllinie, findet. Um dies zu testen, wurde zunächst die mit einer Aktivierung einhergehende Phosphorylierung von Akt am Aminosäurerest Ser-473 untersucht. Neben der Phosphorylierung von Akt nach Behandlung der Zellen mit Insulin sollte auch der Einfluss der für die Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) spezifischen Inhibitoren Wortmannin und LY294002 auf diesen Vorgang untersucht werden.

Vor dem Versuch wurden HepG2-Zellen über Nacht mit serumfreiem Medium inkubiert, um die durch im Serum enthaltene Wachstumsfaktoren verursachte basale Phosphorylierung der an der Signaltransduktion beteiligten Proteine möglichst gering zu halten. Vor der eigentlichen Behandlung mit Insulin wurden die Zellen für 60 min mit den PI3K-Inhibitoren oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle vorinkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert, elektrophoretisch auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PA-Gel) aufgetrennt und im Western-Blot auf phosphoryliertes und Gesamt-Akt untersucht.

Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, führt die Behandlung mit Insulin zu einer im Vergleich zur Kontrolle deutlich gesteigerten Phosphorylierung von Akt an Ser-473. Der PI3K-spezifische Inhibitor Wortmannin unterbindet dabei jegliche Phosphorylierung von Akt durch Insulin, während LY294002 den Insulin-Effekt bis auf eine geringe Restphosphorylierung abschwächt. Somit konnte gezeigt werden, dass Insulin in den benutzten Zellen die PI3K-abhängige Phosphorylierung von Akt induziert.

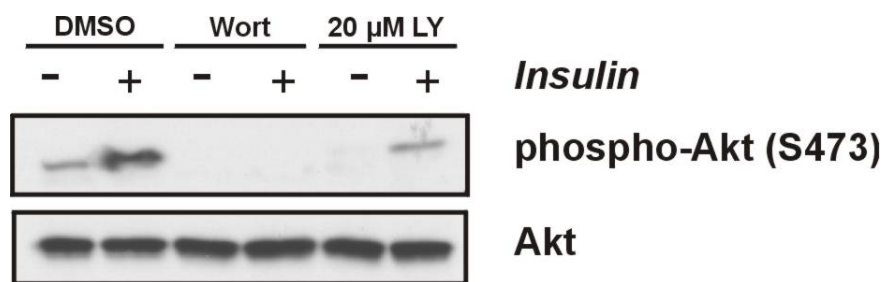


Abb. 3.1: Inkubation mit Insulin führt zu einer PI3K-abhängigen Phosphorylierung von Akt

Nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium wurden HepG2 humane Hepatomzellen mit Wortmannin (100 nM), LY294002 (20 µM) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 60 min präinkubiert, dann wie angegeben mit Insulin (100 nM) für 30 min behandelt und im Anschluss lysiert. Der Phosphorylierungsstatus von Akt wurde über Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern ermittelt.

Um den Effekt von Insulin auf FoxO-Transkriptionsfaktoren als Substrat der Ser/Thr-Kinase Akt zu untersuchen, wurde die bekanntermaßen durch Akt beeinflusste Lokalisation des Transkriptionsfaktors FoxO1a in der Zelle mikroskopisch verfolgt. Durch aktiviertes Akt wird im Zellkern lokalisiertes FoxO1a an den drei Aminosäureresten Thr-24, Ser-256 und Ser-319 phosphoryliert, was in einem Transport von FoxO1a ins Cytoplasma resultiert. So würde bei Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch Insulin eine verstärkte Lokalisation von FoxO im Cytoplasma zu erwarten sein, während Inhibierung des Signalweges durch PI3K-Inhibitoren zu einer deutlichen Lokalisation im Zellkern führen sollte.

Für den Versuch wurden die HepG2-Zellen mit Überexpressionsplasmiden für FoxO1a-EGFP-Fusionsproteine transfiziert. Dabei wurde neben einem für den FoxO1a-Wildtyp codierenden Plasmid auch ein für die FoxO1a-TSS-Ala-Mutante codierendes benutzt. Bei dieser Mutante sind die drei von aktiviertem Akt phosphorylierbaren Aminosäuren Thr-24, Ser-256 und Ser-319 des FoxO1a durch Mutagenese jeweils durch Alanin ersetzt, so dass diese Mutante nicht auf Akt-Signale reagiert und im Zellkern verbleibt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit Wortmannin oder DMSO präinkubiert und im Anschluss in Hank's balanced salt solution (HBSS) mit Insulin und Inhibitor/DMSO koinkubiert. Nach 30 min wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, wo das FoxO1a-EGFP-Fusionsprotein durch Anregung mit Licht des Wellenlängenbereichs von 450 bis 490 nm sichtbar gemacht wird. Es wurden pro Ansatz mindestens 10 verschiedene Aufnahmen gemacht, in denen die Lokalisation des Fusionsproteins bestimmt wurde. Abb. 3.2 zeigt einige beispielhafte Aufnahmen. Für die statistische Auswertung werden Zellen mit Fusionsproteinen überwiegend im Zellkern durch schwarze Balken dargestellt, während

überwiegende Lokalisation im Cytoplasma durch weiße Balken gezeigt wird. In beiden Zellkompartimenten lokalisiertes Fusionsprotein wird durch graue Balken dargestellt.

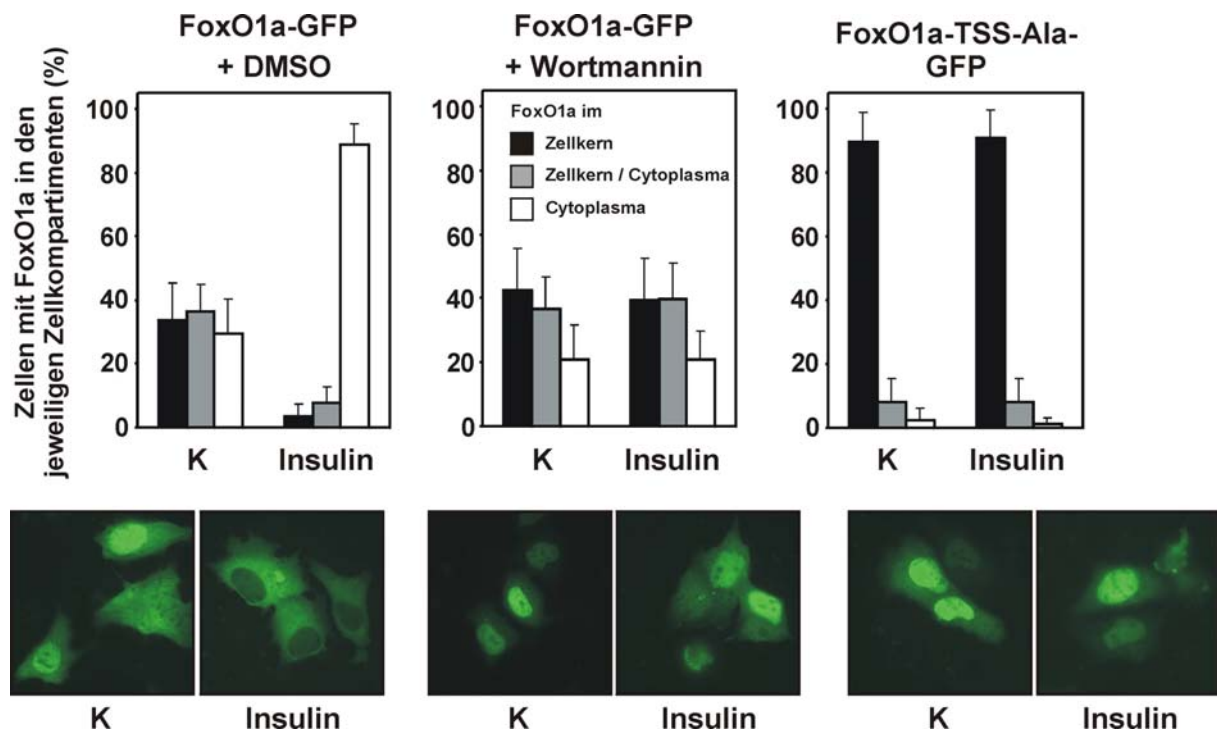


Abb. 3.2: Lokalisation von FoxO1a im Cytoplasma nach Behandlung von HepG2-Zellen mit Insulin. Aufhebung dieses Effektes durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin und die Mutante FoxO1a-TSS-Ala

HepG2-Zellen wurden mit FoxO1a-EGFP bzw. FoxO1a-TSS-Ala-EGFP Überexpressionsplasmiden transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 30 min in HBSS in Anwesenheit von 100 nM Insulin oder als unbehandelte Kontrolle (K) inkubiert und im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Der PI3K-Inhibitor Wortmannin (100 nM) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle wurden 30 min vor der Behandlung hinzugegeben und waren auch währenddessen zugegen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung.

Es zeigte sich, dass bei unbehandelten Zellen FoxO1a-EGFP-Fusionsprotein recht gleichmäßig über die Zelle verteilt war, wobei durch eine Inkubation mit Insulin über 90 % der betrachteten Zellen das Fusionsprotein vorwiegend im Cytoplasma enthielten. Auch hier konnte Wortmannin den Insulin-Effekt komplett hemmen. Noch deutlicher reagierte die FoxO1a-TSS-Ala-Mutante, bei welcher das Fusionsprotein zu 90 % im Zellkern lokalisiert blieb und nicht von Insulin beeinflusst wurde.

Es zeigte sich somit, dass das eingesetzte Zellkultursystem funktionierte und für weitere Versuche benutzt werden konnte.

3.2 Regulation der Synthese von Selenoprotein P über den Akt/FoxO-Signalweg

Die Regulation der Biosynthese von Selenoprotein P ist nur unvollständig verstanden. Neben der Notwendigkeit einer Selenquelle für die Synthese und den Einbau des Selenocysteins bei der Translation wurde gezeigt, dass TGF-beta offensichtlich die Biosynthese des Proteins in HepG2-Zellen unterbindet (Mostert et al., 1999). Desweiteren wurde die Hemmung der Aktivität des SeP-Promoters durch verschiedene Cytokine gezeigt (Dreher et al., 1997).

3.2.1 Einfluss von Selenit auf den Akt/FoxO-Signalweg

Es ist bekannt, dass Selenit als Selenquelle für die Translation von Selenoprotein P fungieren kann. Kürzlich konnte in HuH7 Hepatomzellen die Induktion der Phosphorylierung von Akt durch Selenit gezeigt werden (Lee et al., 2003). Dies würde bedeuten, dass das für die Selenoprotein P-Synthese benötigte Selenit eventuell auch in HepG2 Hepatomzellen den Akt/FoxO-Signalweg beeinflusst. Um dies zu überprüfen, wurden HepG2-Zellen für 24 h in serumfreiem Medium unter Zugabe von 0,2 mM Selenit während des gesamten Zeitraums oder für die letzte Stunde vor der Lyse inkubiert. Als Positivkontrolle für die Phosphorylierung wurde für 1 h vor der Lyse mit 100 nM Insulin inkubiert. Die Lysate wurden elektrophoretisch auf einem 10 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western-Blot auf phosphoryliertes und Gesamt-Akt untersucht.

Wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, führt allein die Behandlung mit Insulin, nicht aber Selenit zu einer im Vergleich zur Kontrolle deutlich gesteigerten Phosphorylierung von Akt.

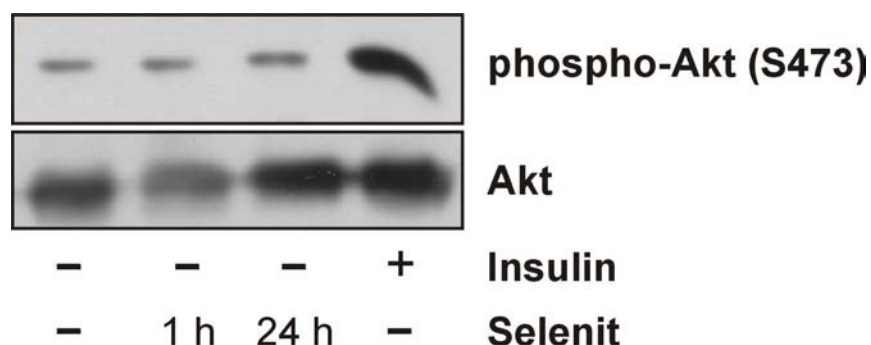


Abb. 3.3: Inkubation mit Selenit führt zu keiner Phosphorylierung von Akt

HepG2-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium inkubiert. Dabei erfolgte die Zugabe von 0,2 μ M Selenit für die angegebenen Zeiten vor der Lyse. Insulin (100 nM) wurde 1 h vor der Lyse ins Kulturmedium gegeben. Der Phosphorylierungsstatus von Akt wurde über Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern ermittelt.

Somit scheint Selenit in HepG2-Zellen keinen Einfluß auf den Akt/FoxO-Signalweg zu nehmen. Um dies zu verifizieren, sollte der Einfluß von Selenit auf einen FoxO-regulierten Promoter untersucht werden.

Dafür wurde ein Konstrukt verwendet, in welchem sechsmal hintereinander ein FoxO-responsives Element (**da**f16-**b**inding-**e**lement, DBE) vor das als Reportergen eingesetzte Gen der Glühwürmchen (*Photinus pyralis*)-Luciferase kloniert war ("6xDBE-luc"; Furuyama et al., 2000). Als Kontrollplasmid zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde pRL-SV40, das für Luciferase aus Seestiefmütterchen (*Renilla reniformis*) unter Kontrolle des viralen SV40-Promoters codiert, verwendet. 24 h nach der Transfektion der Zellen mit 6xDBE-luc, pRL-SV40 und Überexpressionsplasmiden für FoxO1a oder FoxO1a-TSS-Ala wurde für 18 h mit Selenit oder Insulin als Positivkontrolle behandelt und anschließend lysiert. Später wurde in den Lysaten nach Zugabe jeweiliger spezifischer Substrate für die beiden Luciferasen die enzymatische Aktivität über Messung der Chemolumineszenz bestimmt und die Werte der Glühwürmchen-Luciferase (6xDBE-luc) auf die Seestiefmütterchen-Luciferase (pRL-SV40) normiert.

Abbildung 3.4 zeigt die Ergebnisse des Versuchs. Der FoxO-responsive Promoter 6xDBE-luc reagiert sehr deutlich auf die Überexpression von FoxO1a im Vergleich zum Kontrollplasmid. Selenit hat keinen erkennbaren Einfluss, während Inkubation mit Insulin zu einer Verringerung der Promoteraktivität führt. Dies läßt sich mit der in Abb. 3.1 und 3.3 gezeigten durch Insulin induzierten Akt-Aktivierung und anschließender Verlagerung von FoxO1a ins Cytoplasma (Abb. 3.2) erklären. Die nicht durch Akt phosphorylierbare FoxO1a-TSS-Ala-Mutante zeigt eine im Vergleich zum Wildtyp fast vierfach erhöhte Promoteraktivität. Auch hier zeigt Selenit keine Beeinflussung der Promoteraktivität und auch Insulin hat keinen Effekt.

Somit kann für eine Behandlung von HepG2-Zellen mit Selenit keine Aktivierung des Akt/FoxO-Signalweges und keine damit verbundene negative Regulation von FoxO-Zielgenen nachgewiesen werden.

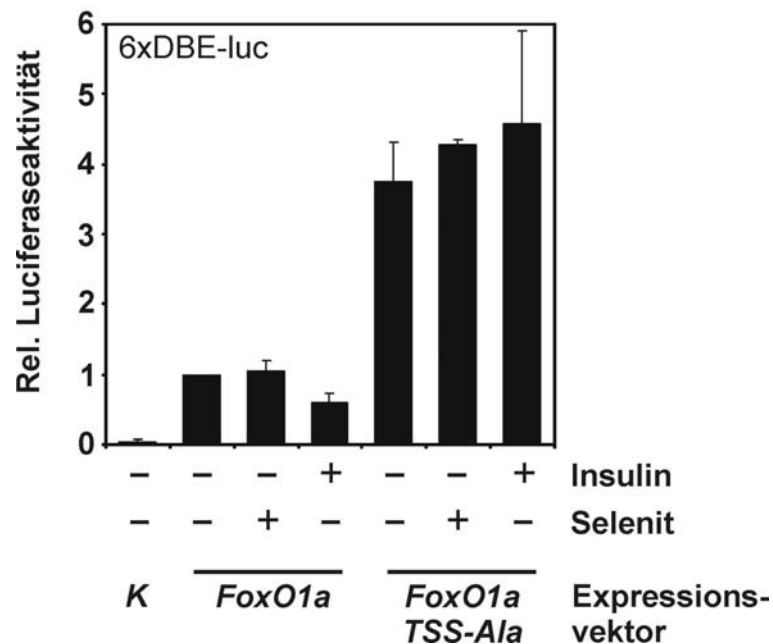


Abb. 3.4: Einfluss von Selenit und Insulin auf FoxO-abhängige Transkription

HepG2-Zellen wurden mit einem Promoter-Luciferase-Konstrukt (6xDBE-luc), welches sechsmal hintereinander die Konsensussequenz des daf-binding elements enthält, und FoxO1a bzw. FoxO1a-TSS-Ala Überexpressionsplasmiden (K: Kontrollplasmid, pCI-Neo) kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen wie angegeben für 18 h in Anwesenheit von 0,2 μ M Selenit oder 100 nM Insulin inkubiert und nach Lyse die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung.

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss von Selenit auf die Aktivität des Promoters des Selenoprotein P-Gens und die Synthese von SeP untersucht werden. Für die Optimierung der Versuche wurde TGF-beta als bekannter negativer Regulator eingesetzt. Dazu wurden HepG2-Zellen mit serumfreiem Medium für 24 h inkubiert und im Anschluss die Kulturüberstände abgenommen und später auf einem 10 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western-Blot auf den SeP-Gehalt untersucht. Wie Abbildung 3.5 A zeigt, war nur bei Anwesenheit von Selenit eine größere Menge an Selenoprotein P im Überstand zu detektieren. Der Blot zeigt das typische Bandenmuster von Selenoprotein P in HepG2-Zellen, welche mindestens zwei verschieden glykosylierte Formen in den Überstand sezernieren. Die 24-stündige Inkubation mit 10 ng/ml TGF-beta führt dabei zu einer deutlichen Abschwächung der Intensität der Banden.

Weiterhin sollte die Aktivität des Selenoprotein P-Promoters untersucht werden. Dafür wurde ein Konstrukt verwendet, in welchem der Selenoprotein P-Promoter vor ein Luciferase-Gen kloniert war (Mostert et al., 1999), welches von uns SeP-luc genannt wurde. 24 h nach der Transfektion der Zellen mit SeP-luc, pRL-SV40 und pEGFP-C1 Kontrollvektor wurde für 18

h behandelt und anschließend lysiert. In den Lysaten wurde später die Luciferaseaktivität gemessen.

In Abbildung 3.5 B ist zu erkennen, daß Zugabe von 0,2 μ M Selenit allein keinen Einfluß auf die Promoteraktivität hat, während bei zusätzlicher Inkubation mit 5 ng/ml TGF-beta eine sehr signifikante Verringerung der Promoteraktivität zu beobachten ist.

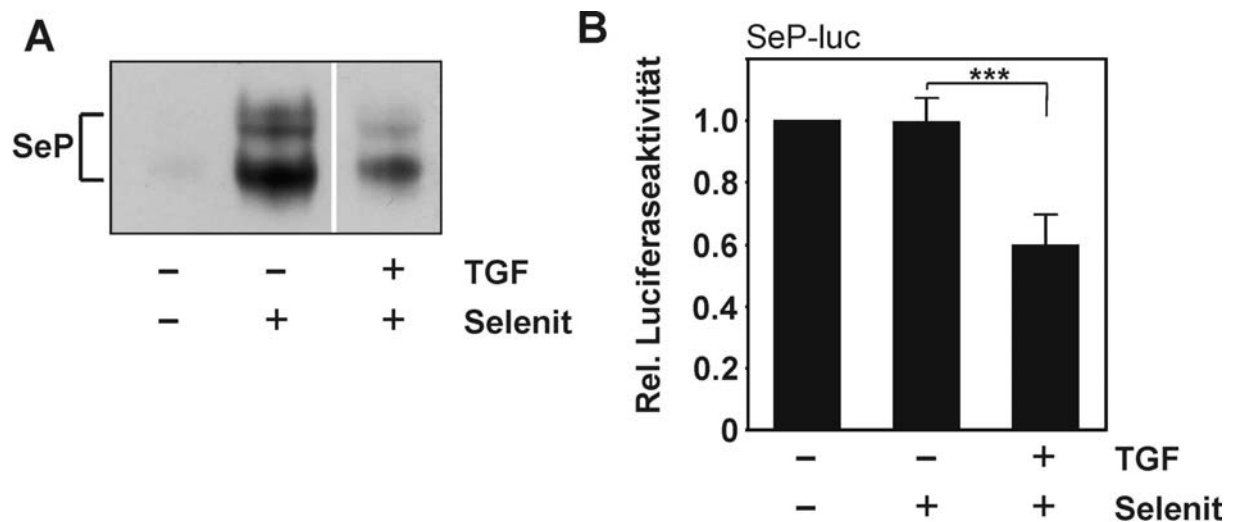


Abb. 3.5: Einfluss von TGF-beta und Selenit auf Selenoprotein P-Transkription und Translation

(A) HepG2-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium unter Zugabe von 0,2 μ M Selenit und 10 ng/ml TGF-beta inkubiert. Der Selenoprotein P-Gehalt der Überstände wurde über Western-Blot-Analyse ermittelt.

(B) HepG2-Zellen wurden mit einem Selenoprotein P Promoter-Luciferase Reportergen-Konstrukt (SeP-luc) und einem Kontroll-Expressionsvektor (pEGFP-C1) kotransfiziert, nach 24 h wie angegeben 0,2 μ M Selenit bzw. 5 ng/ml TGF-beta hinzugefügt und nach weiteren 18 h Inkubation lysiert. Später erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität in den Lysaten. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (***) ($P < 0,001$).

3.2.2 Regulation des Selenoprotein P-Promoters durch den Akt/FoxO-Signalweg

Nachdem gezeigt wurde, dass Selenit auf den Akt/FoxO-Signalweg und den Selenoprotein P-Promoter keinen Einfluss hat, wurde nun untersucht, ob FoxO1a-Überexpression die Aktivität des Selenoprotein P-Promoters beeinflusst, da in dem Promoter zwei potentielle FoxO-bindende Elemente (DBEs) identifiziert werden konnten. 24 h nach der Kotransfektion der HepG2-Zellen mit SeP-luc, pRL-SV40 und FoxO1a-EGFP-Überexpressionsvektor

(Kontrollvektor: pEGFP-C1) wurde für 18 h mit Selenit behandelt und anschließend lysiert. In den Lysaten wurde später die Luciferaseaktivität gemessen.

Es zeigte sich eine durch FoxO1a-Überexpression mehr als fünffach gesteigerte Aktivität des Selenoprotein P-Promoters (Abb.3.6). Auch bei diesem Versuch hatte die Zugabe von 0,2 μ M Selenit keinen Einfluß auf die induzierte Promoteraktivität.

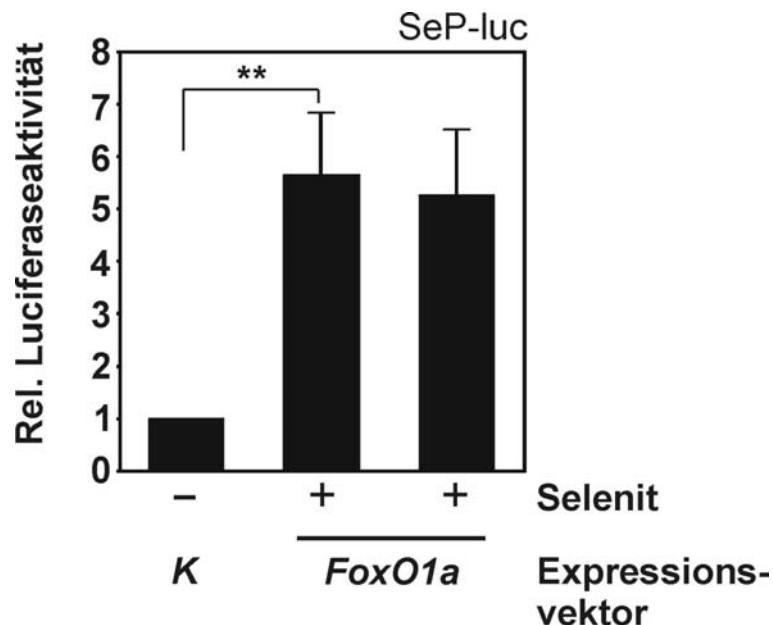


Abb. 3.6: FoxO1a-Überexpression induziert die Aktivität des Selenoprotein P-Promoters

HepG2-Zellen wurden mit einem Selenoprotein P Promoter-Luciferase Reportergen-Konstrukt (SeP-luc) und FoxO1a-EGFP Überexpressionsplasmid (K: Kontrollplasmid, pEGFP-C1) kotransfiziert. Nach 24 h wurde 0,2 μ M Selenit hinzugefügt und nach weiteren 18 h Inkubation lysiert. Später erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität in den Lysaten. Die Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (** $P < 0,01$).

Da FoxO1a-Überexpression einen stimulierenden Einfluss auf den Selenoprotein P-Promoter hat, sollte nun näher untersucht werden, welche Auswirkungen eine mit Deaktivierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren verbundene Zugabe von Insulin hat (vgl. Abb. 3.2). Desweiteren sollte auch der Einfluß der daueraktiven FoxO1a-TSS-Ala-Mutante untersucht werden. Die HepG2-Zellen wurden mit SeP-luc, pRL-SV40 und FoxO1a oder FoxO1a-TSS-Ala-Überexpressionsvektoren (Kontrollvektor: pCI-Neo) kotransfiziert. Nach 24 h wurde für weitere 18 h mit Insulin behandelt und anschließend die Luciferaseaktivität in den Lysaten gemessen.

Die Behandlung mit Insulin hatte sowohl für die Kontrolle als auch für die Überexpression von FoxO1a eine deutliche Abnahme der Promoteraktivität zur Folge (Abb. 3.7). Die Überexpression der FoxO1a-TSS-Ala-Mutante zeigt eine mehr als 11-fache Induktion der Promoteraktivität im Vergleich zur Kontrolle und eine Verdopplung im Vergleich zur Überexpression des FoxO1a-Wildtyps. Auffällig ist, dass die Mutante die deaktivierende Wirkung von Insulin auf den SeP-Promoter komplett aufhebt, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des ausschließlich durch FoxO kontrollierten Promoters (Abb. 3.4) steht.

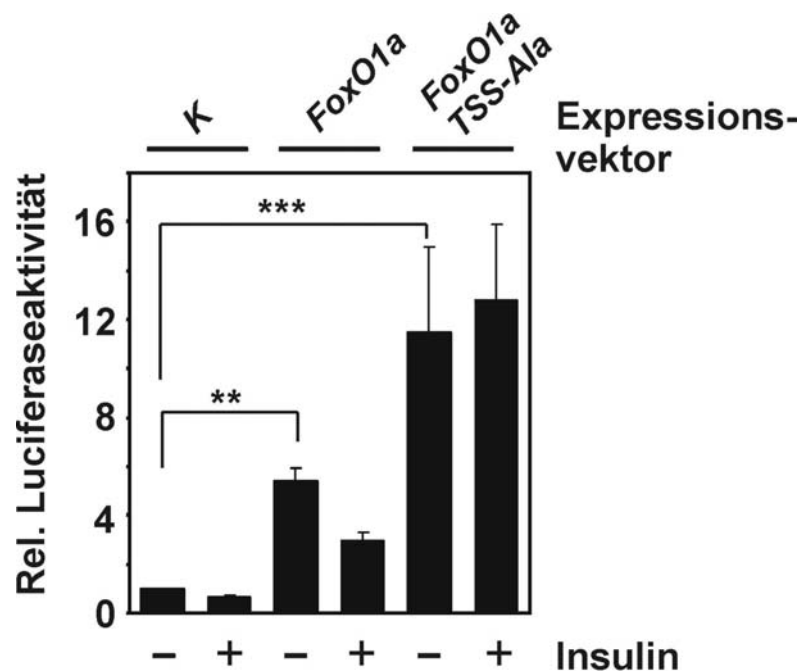


Abb. 3.7: Insulin senkt die Aktivität des Promoters von Selenoprotein P. Aufhebung dieses Effektes über die nicht durch Akt phosphorylierbare Mutante FoxO1-TSS-Ala

HepG2-Zellen wurden mit einem Selenoprotein P Promoter-Luciferase Reportergen-Konstrukt (SeP-luc) und FoxO1a bzw. FoxO1a-TSS-Ala Überexpressionsplasmiden (K: Kontrollplasmid, pCI-Neo) kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 18 h in Anwesenheit von 100 nM Insulin inkubiert und nach Lyse die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Der fehlende Effekt von Insulin auf die nicht Akt-responsive FoxO1a-TSS-Ala-Mutante lässt vermuten, dass der Effekt von Insulin auf den Selenoprotein P-Promoter über Akt läuft. Um dies weiter zu untersuchen, sollte die durch Insulin induzierte Phosphorylierung von Akt durch den PI3K-Inhibitor LY294002 unterbunden und dann der Einfluß auf die Aktivität des Selenoprotein P-Promoters untersucht werden. Gleichzeitig wurde auch der Effekt der Überexpression einer daueraktiven Akt-Mutante untersucht. Diese Mutante (myr-Akt) besitzt

eine Erkennungssequenz an welcher sie myristoyliert wird und danach konstitutiv an die Zellmembran bindet, wo sie phosphoryliert und somit aktiviert wird.

Die HepG2-Zellen wurden mit SeP-luc, pRL-SV40 und gegebenenfalls myr-Akt-Überexpressionsvektor (Kontrollvektor: pCI-Neo) kotransfiziert. Für den Versuch mit dem PI3K-Inhibitor wurde nach 24 h mit LY294002 oder DMSO für 60 min vorinkubiert, dann für 18 h mit Insulin behandelt, während der Inhibitor weiter zugegen war, und anschließend lysiert. Für den myr-Akt-Versuch wurde 24 h nach der Transfektion für 18 h mit Insulin inkubiert und dann lysiert. In den Lysaten wurde später die Luciferaseaktivität gemessen.

Dabei zeigte sich, dass die Abnahme der Promoteraktivität durch Behandlung mit Insulin von dem PI3K-Inhibitor LY294002 teilweise aufgehoben werden konnte (Abb. 3.8). Die Überexpression des daueraktiven myr-Akt zeigte den gleichen Effekt wie die alleinige Behandlung mit Insulin. Zusätzliche Inkubation mit Insulin bei myr-Akt-Überexpression zeigte eine weitere geringe Abnahme der Promoteraktivität, was wahrscheinlich durch die zusätzliche Aktivierung von endogenem Akt hervorgerufen wurde.

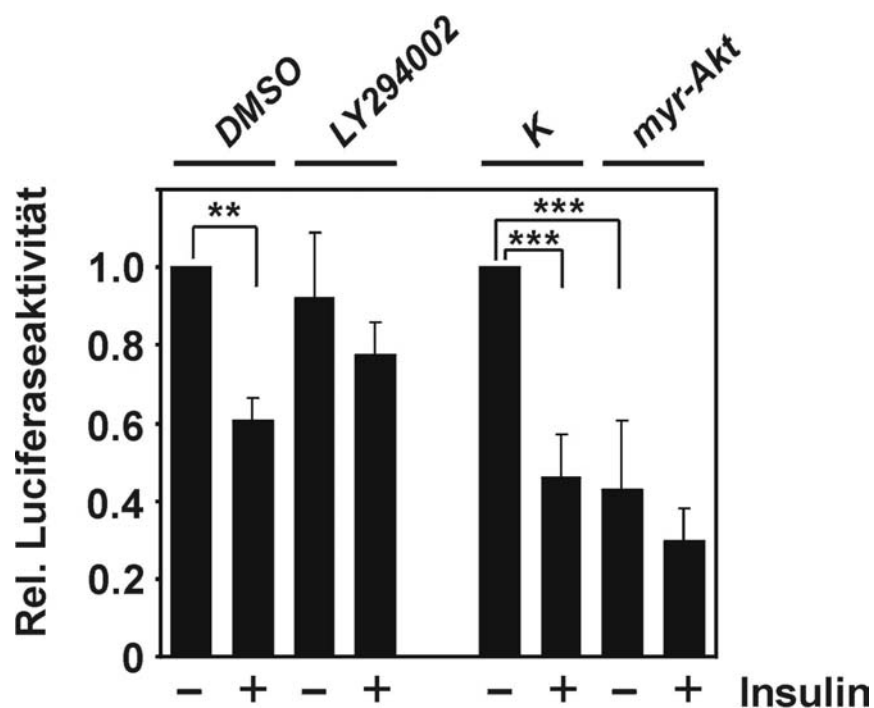


Abb. 3.8: Die Regulation des Selenoprotein P-Promoters wird über PI3K und Akt

HepG2-Zellen wurden mit SeP-luc (Balken 1-4) oder mit SeP-luc sowie einem myr-Akt Überexpressionsplasmid (K: Kontrollplasmid, pCI-Neo) transfiziert (Balken 5-8). Nach 24 h wurden die Zellen für 18 h in Anwesenheit von 100 nM Insulin inkubiert und nach Lyse die Luciferaseaktivität bestimmt. Der PI3K-Inhibitor LY294002 (50 μ M) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle wurden 60 min vor der Behandlung hinzugegeben und waren auch während der Behandlung präsent. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Somit konnte gezeigt werden, dass der Selenoprotein P-Promoter sowohl durch FoxO1a-Überexpression als auch durch Insulin über PI3K und Akt reguliert wird.

3.2.3 Untersuchung der FoxO-Bindeelemente des Selenoprotein P-Promoters

FoxO-bindende Elemente (DBE) besitzen die Konsensussequenz GTAAA(T/C)AA. Wie bereits erwähnt, enthält der Selenoprotein P-Promoter zwei potentielle DBE, von denen sich ein inverses Motif an der Position –351 bis –344 (DBE1) und ein klassisches Motif bei –115 bis –108 (DBE2) befinden (Abb. 3.9). Durch gezielte Punktmutation einer einzelnen Base in den beiden DBE sollte der Einfluß auf die durch FoxO1a-Überexpression induzierte Aktivität des Selenoprotein P-Promoters untersucht werden. Neben den einzelnen Mutanten (SeP-Mut1-luc, SeP-Mut2-luc) sollte auch eine Doppelmutante (SeP-Mut1/2-luc), sowie eine Deletionsmutante (SeP- Δ 234-luc), in welcher ein Großteil des Promoters inklusive DBE1 entfernt ist, erzeugt werden. Abbildung 3.9 stellt die verschiedenen Promoter-Varianten schematisch dar.

Zunächst wurde der Einfluß des DBE1 auf die Promoteraktivität untersucht. Dazu wurden bei FoxO1a-Überexpression oder Behandlung mit Insulin die Promoteraktivität der Mutante SeP-Mut1-luc und der gekürzten Variante SeP- Δ 234-luc mit dem Wildtyp-Promoter (SeP-luc) verglichen. Dazu wurden die HepG2-Zellen mit dem jeweiligen SeP-Promoter-Konstrukt, pRL-SV40 und FoxO1a Überexpressionsvektor (Kontrollvektor: pCI-Neo) kotransfiziert. Nach 24 h wurde für 18 h mit Insulin behandelt und anschließend lysiert. In den Lysaten wurde später die Luciferaseaktivität gemessen.

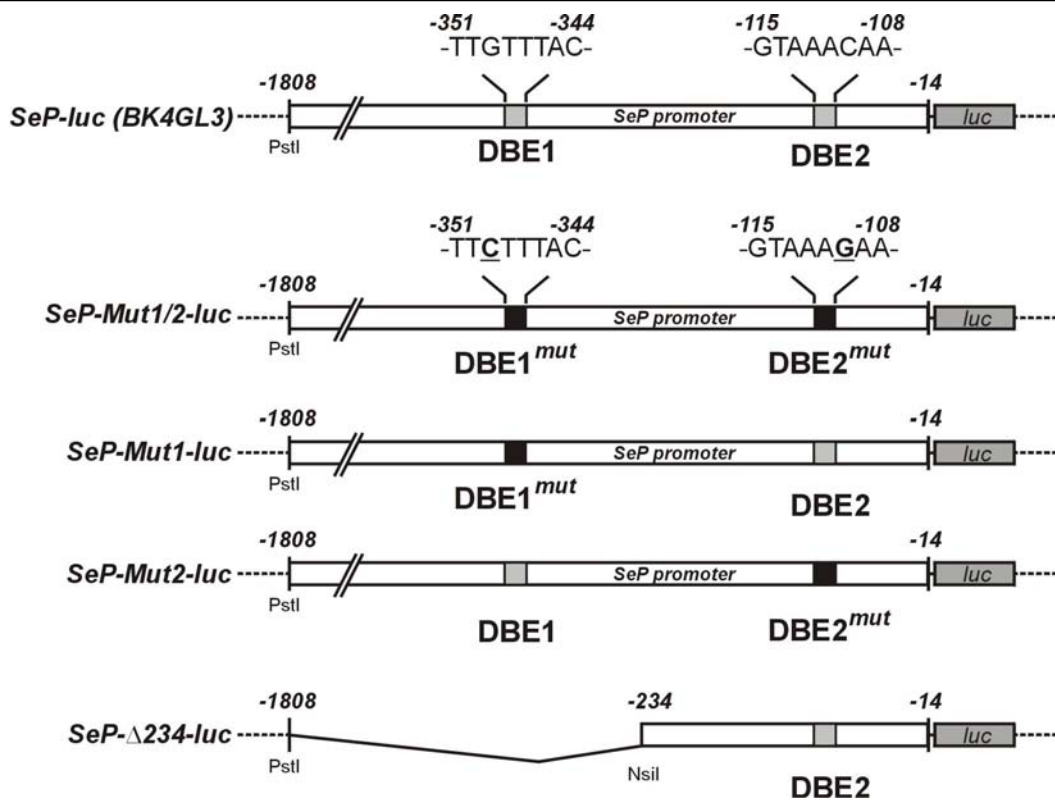


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten und durch Mutagenese erzeugten Selenoprotein P Promoter-Konstrukte

Der Selenoprotein P Promoter enthält zwei potentielle Bindestellen für FoxO-Transkriptionsfaktoren (daf16-binding-elements, DBE). Diese Bindeelemente wurden jeweils durch den Austausch eines Nukleotids mutiert oder das DBE1 durch Behandlung mit Restriktionsenzymen komplett entfernt.

Es zeigt sich, dass es bei Mutation oder Deletion des DBE1 in beiden Fällen zu einer im Vergleich zum Wildtyp leicht verringerten Induktion durch FoxO1a-Überexpression kommt (Abb. 3.10). Während FoxO1a-Überexpression bei SeP-luc noch zu einem 4 bis 5fachen Anstieg der Promoteraktivität führt, beträgt diese bei den DBE1-Varianten nur noch knapp mehr als das zweifache der Kontrolle. Der senkende Effekt von Insulin auf die Promoteraktivität wird nur im Falle von SeP-Δ234-luc im Vergleich zum Wildtyp-Promoter abgeschwächt, ist aber weiterhin signifikant. Somit bleibt der Selenoprotein P-Promoter auch ohne DBE1 weiterhin auf FoxO1a und Insulin responsiv.

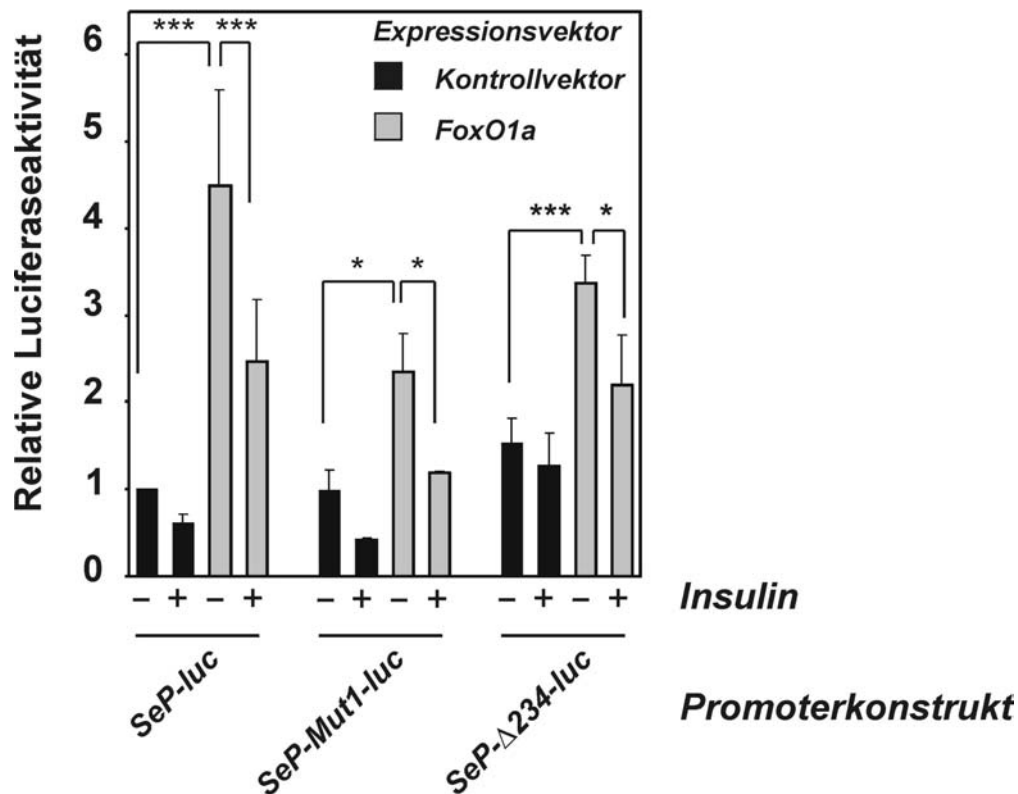


Abb. 3.10: Einfluss von DBE1 auf die Regulation der Selenoprotein P Promoteraktivität durch FoxO1a

HepG2-Zellen wurden mit den gezeigten Selenoprotein P Promoter-Luciferase Reportergen-Konstrukten und FoxO1a bzw. Kontrolle (pCI-Neo) Überexpressionsplasmiden kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen wie angegeben für 18 h in Anwesenheit von 100 nM Insulin inkubiert und nach Lyse die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$).

Um den Einfluß des DBE2 auf die Promoteraktivität zu untersuchen, wurden bei FoxO1a-Überexpression oder Behandlung mit Insulin die Promoteraktivität der Mutanten SeP-Mut2-luc und SeP-Mut1/2-luc mit dem Wildtyp-Promoter (SeP-luc) verglichen. Der Versuch wurde analog zu der Untersuchung des DBE1 durchgeführt.

Der Einfluss des DBE2 ist dabei sehr deutlich, wie es Abbildung 3.11 zu entnehmen ist. Die Mutation des DBE2 führte zu einer im Vergleich zum Wildtyp deutlichen Verringerung der basalen Promoteraktivität und zu einer nur noch sehr geringen Induktion durch FoxO1a-Überexpression. Dabei reagiert die Doppelmutante SeP-Mut1/2-luc deutlich weniger auf Behandlung mit Insulin als SeP-Mut2-luc.

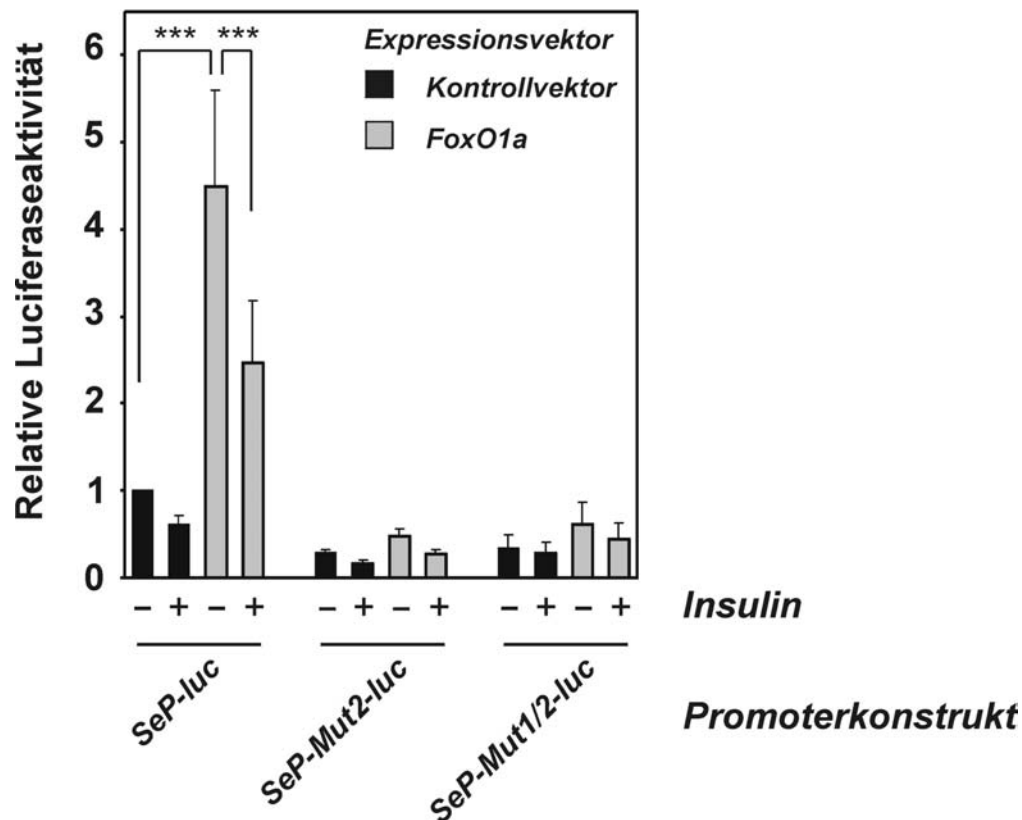


Abb. 3.11: Einfluss von DBE2 auf die Regulation der Selenoprotein P Promoteraktivität durch FoxO1a

HepG2-Zellen wurden mit den gezeigten Selenoprotein P Promoter-Luciferase Reporter-Gen-Konstrukten und FoxO1a bzw. Kontrolle (pCI-Neo) Überexpressionsplasmiden kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen wie angegeben für 18 h in Anwesenheit von 100 nM Insulin inkubiert und nach Lyse die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (*** $P < 0,001$).

Somit kann dem DBE2 eine zentrale Bedeutung in der Regulation des Selenoprotein P-Promoter durch FoxO1a zugeordnet werden, während das DBE1 nur von geringerem Einfluss ist.

3.2.4 Regulation der Selenoprotein P-mRNA-Synthese durch FoxO1a

Nach der Untersuchung des Selenoprotein P-Promoters, war nun von Interesse, ob die Regulation über den Akt/FoxO-Signalweg auch auf das direkte Produkt der Transkription, die mRNA, übertragbar war. Dafür wurde eine Rattenleberzelllinie, welche in ihren Eigenschaften den humanen HepG2-Zellen sehr ähnlich ist, benutzt. Diese H4IIE-C3 Hepatomzellen (FKHR-ER-CC-Zellen) waren stabil mit einem Plasmid transfiziert, das für

FoxO1a, welches mit der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors fusioniert war, codierte (Abb. 3.12). Diese Bindedomäne wird von dem Hitzeschockprotein Hsp90 erkannt und dadurch das gesamte Fusionsprotein maskiert. Somit lag überexprimiertes FoxO1a in einem inaktiven Zustand in der Zelle vor. Die Maskierung konnte aber durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen aufgehoben werden, so dass das freie FoxO1a-Fusionsprotein nun im Zellkern an die DNA der Zielgen-Promotoren binden und die Transkription aktivieren konnte.

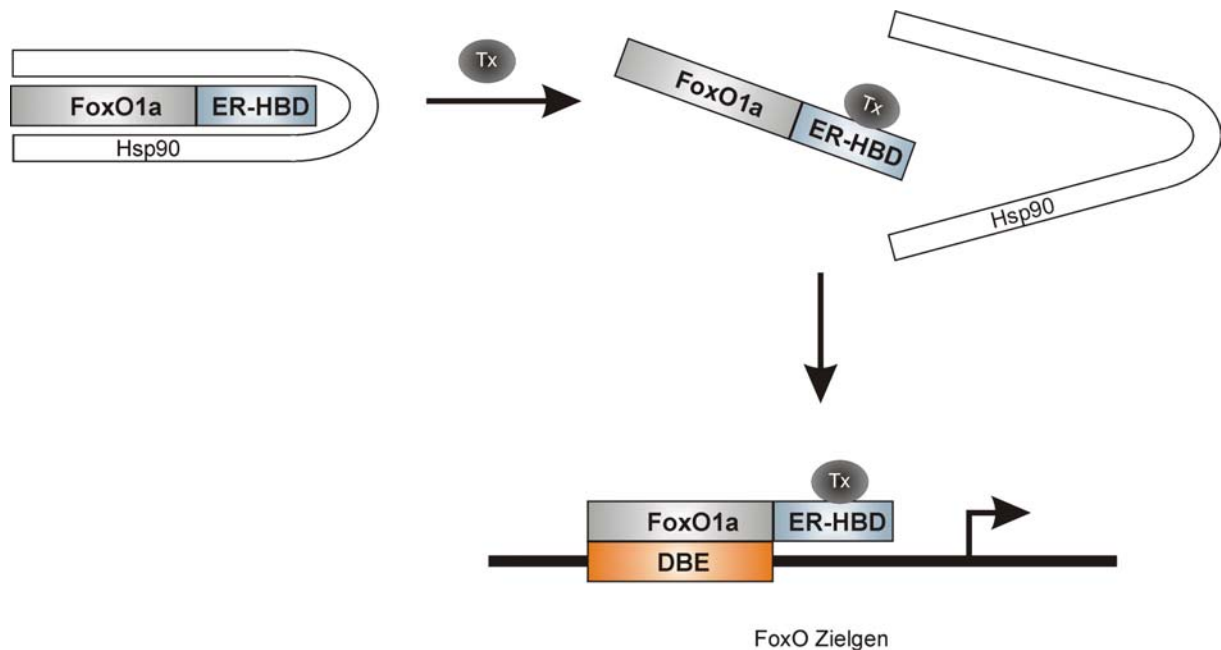


Abb. 3.12: Ein durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen induzierbares FoxO1a-Fusionsprotein (nach Orth et al., 2004)

H4IIE-Zellen wurden mit einem FoxO1a-Östrogenrezeptor (ER)-Hormonbindedomäne (HBD)-Konstrukt stabil transfiziert (FKHR-ER-CC-Zellen). Das gebildete Fusionsprotein wird in der Zelle von dem Hitzeschockprotein Hsp90 maskiert und dadurch inaktiviert. Erst bei Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (Tx) wird das Fusionsprotein demaskiert und kann dann im Zellkern an FoxO-Zielgene binden.

Zuerst wurde zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft, ob durch Freisetzung des FoxO1a-Fusionsproteins mit Tamoxifen eine Regulation der mRNA erkennbar ist. Dafür wurden FKHR-ER-CC-Zellen auf serumfreies Medium gesetzt und für die angegebenen Zeiten mit 4-Hydroxytamoxifen oder Ethanol als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trizol-Reagenz lysiert, die RNA isoliert, quantifiziert und mittels RT-PCR mit spezifischen Primern auf den Gehalt an Selenoprotein P und GAPDH mRNA untersucht.

Wie in Abbildung 3.13 zu sehen ist, führte Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen zu einer signifikanten Steigerung der Selenoprotein P mRNA im Vergleich zu den Kontrollen.

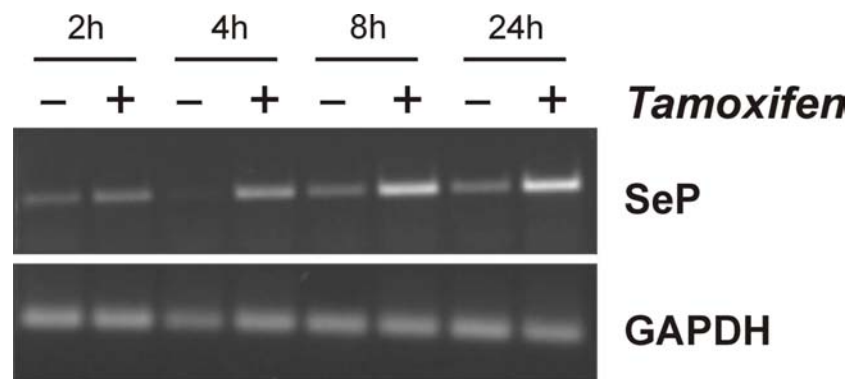


Abb. 3.13: Zeitlicher Verlauf der Selenoprotein P-mRNA-Synthese nach Demaskierung von FoxO1a

FKHR-ER-CC-Zellen wurden in serumfreiem Medium nach Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (1 μ M) oder Ethanol (Lösungsmittelkontrolle, “-“) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und über RT-PCR der Gehalt an mRNA von Selenoprotein P (SeP) und Glyceraldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Kontrolle bestimmt.

Es wurde gezeigt, dass FoxO-Transkriptionsfaktoren in Folge einer Akt-abhängigen Phosphorylierung deaktiviert und aus dem Kern transportiert werden. Nun sollte an H4IIE-Zellen überprüft werden, welchen Einfluss die Behandlung mit Insulin auf die Phosphorylierung von Akt und FoxO-Transkriptionsfaktoren hat. Die H4IIE-Zellen wurden vor dem Versuch über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Vor der eigentlichen Behandlung wurden die Zellen für 60 min mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle vorinkubiert. Nach der 30-minütigen Behandlung mit Insulin in HBSS, wobei der Inhibitor bzw. DMSO weiter zugegen waren, wurden die Zellen lysiert, elektrophoretisch auf einem 10 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western-Blot auf die Phosphorylierung von FoxO1a, FoxO3a und Akt untersucht.

Abbildung 3.14 zeigt nach der Behandlung mit Insulin im Vergleich zur Kontrolle eine starke Phosphorylierung von Akt an Ser-473 und von FoxO1a/3a an Thr-24/32. Dabei wurde die Phosphorylierung von Akt und den FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Insulin durch den PI3K-spezifischen Inhibitor Wortmannin komplett aufgehoben. Somit konnte gefolgert werden, dass die Behandlung der H4IIE-Zellen mit Insulin zu einer PI3K-abhängigen Phosphorylierung von Akt und FoxOs führt, was eine Inaktivierung und Relokalisation der letzteren zur Folge hätte. Dies konnte auch bei Insulin-Behandlung von FKHR-EGFP-transfizierten H4IIE-Zellen in Analogie zu Abb. 3.2 unter dem Fluoreszenzmikroskop in der Tat beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

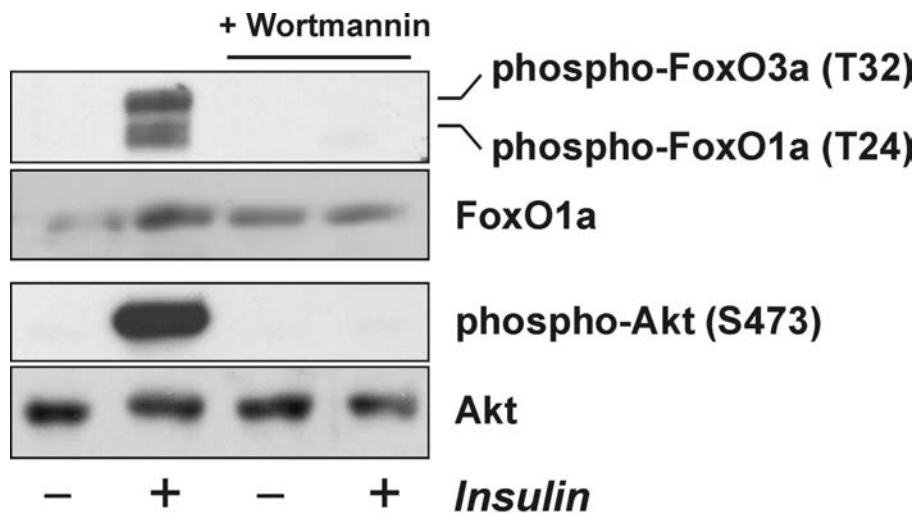


Abb. 3.14: PI3K-abhängige Phosphorylierung von Akt und FoxO nach Behandlung mit Insulin

H4IIE-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium mit Wortmannin (100 nM) oder DMSO (als Lösungsmittelkontrolle) für 60 min präinkubiert, dann wie angegeben Insulin (100 nM) für 30 min hinzugegeben und im Anschluss lysiert. Der Phosphorylierungsstatus von Akt und FoxOs wurde über Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern ermittelt.

Nachdem eine durch Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen herbeigeführte Freisetzung von FoxO1a zu einer Induktion der Synthese an Selenoprotein P-mRNA führte, sollte nun untersucht werden, ob FoxO-Deaktivierung durch Insulin die Menge von Selenoprotein P-mRNA senkt. Zusätzlich sollte der Effekt von Selenit-Zugabe auf die mRNA untersucht werden. Dafür wurden FKHR-ER-CC-Zellen auf serumfreies Medium gesetzt und für 24 h mit Selenit, Insulin, 4-Hydroxytamoxifen oder Ethanol (als Lösungsmittelkontrolle) inkubiert. Anschließend wurde RNA isoliert und mittels RT-PCR der Gehalt an Selenoprotein P-, Glukose 6-Phosphatase- und GAPDH-mRNA untersucht.

Analog zu Ab. 3.13 führte Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen zu einer signifikanten Steigerung der Selenoprotein P-mRNA-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3.15). Während die Behandlung mit Selenit keine Veränderung verursachte, zeigte sich durch Inkubation mit Insulin eine deutliche Abnahme der Selenoprotein P mRNA-Synthese, sowohl im induzierten, als auch im normalen Zustand. Glukose-6-Phosphatase, welche als bekanntes FoxO-Zielgen in Leberzellen als Kontrolle genommen wurde, zeigte das gleiche Verhalten wie Selenoprotein P.

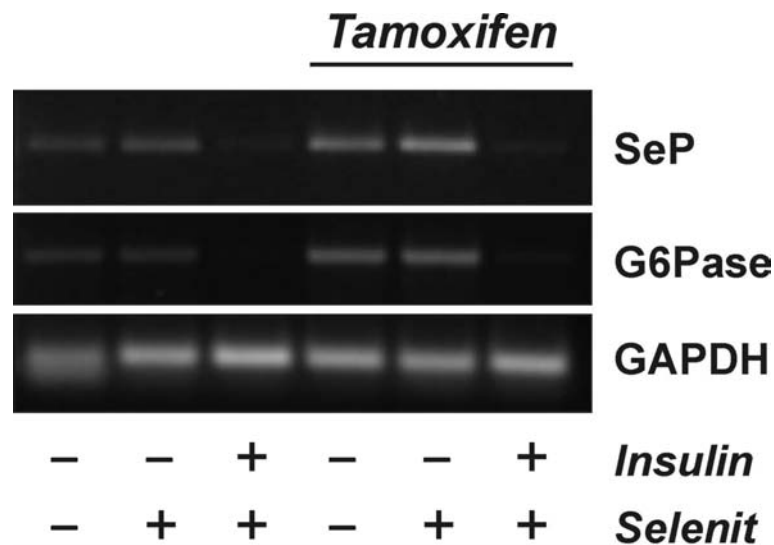


Abb. 3.15: Gehalt an Selenoprotein P-mRNA nach Behandlung mit Insulin

FKHR-ER-CC-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium nach Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (1 μ M) oder Ethanol (Lösungsmittelkontrolle, “-“) inkubiert. Wo angegeben waren 0,2 μ M Selenit bzw. 100 nM Insulin während der Inkubation zugegen. Anschließend wurde die RNA isoliert und über RT-PCR der Gehalt an mRNA von Selenoprotein P (SeP), Glukose 6-Phosphatase (G6Pase) und Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Kontrolle bestimmt.

3.2.5 Regulation der Selenoprotein P-Synthese durch Insulin/FoxO1a

Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Biosynthese von Selenoprotein P durch FoxO1a und Insulin auf Ebene der Transkription erfolgt (Abb. 3.15). Es sollte nunmehr untersucht werden, wie sich dies auf Proteinebene auswirkt.

Dazu wurden HepG2-Zellen mit serumfreiem Medium unter Zugabe von Selenit und Insulin für 24 h inkubiert, im Anschluss die Kulturüberstände abgenommen und später auf einem 10 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western-Blot auf den SeP-Gehalt untersucht. Abbildung 3.16 zeigt, dass nur bei Anwesenheit von Selenit eine größere Menge an Selenoprotein P im Überstand zu detektieren ist. Die densitometrische Auswertung zeigt, daß im Vergleich zu der mit Selenit inkubierten Kontrolle die Bandenintensität ohne Zusatz von Selenit deutlich unter 10 % liegt. Die 24-stündige Inkubation mit Insulin führte zu einer fast 50 %igen Abnahme der Bandenintensität und damit der Proteinmenge.

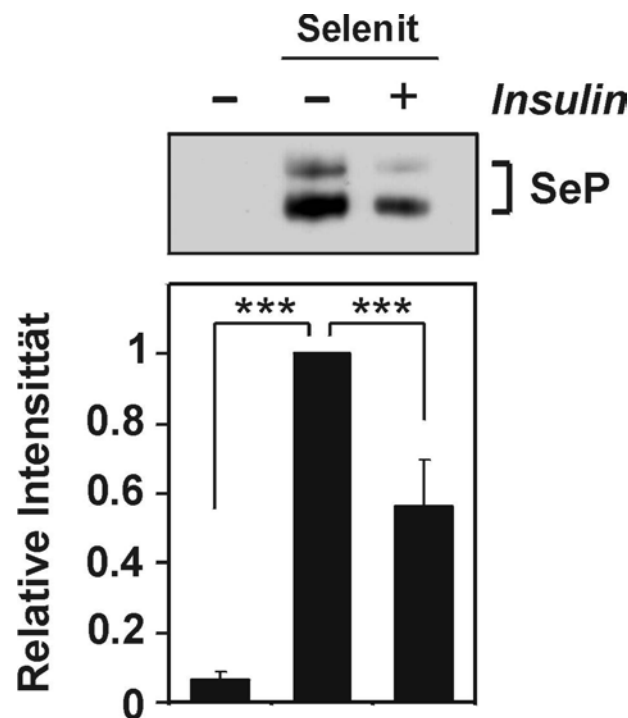


Abb. 3.16: Regulation des Selenoprotein P-Gehalts in HepG2-Zellkulturüberständen

HepG2-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium unter Zugabe von 0,2 μ M Selenit und Insulin (100 nM) inkubiert. Der Selenoprotein P-Gehalt der Überstände wurde über Western-Blot-Analyse ermittelt. Die Daten zur densitometrischen Auswertung sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (** $P < 0,001$).

Nach der Bestätigung, dass der Gehalt an Selenoprotein P in den HepG2-Überständen durch Insulin beeinflusst wird, sollte nun untersucht werden, ob dies über den PI3K/Akt/FoxO-Signalweg geschieht.

Die HepG2-Zellen wurden mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 60 min vorinkubiert, dann in Gegenwart des Inhibitors oder DMSO auf selenithaltiges, serumfreies Medium gesetzt und für 24 h mit oder ohne Insulin behandelt. Danach wurden die Kulturüberstände abgenommen und später auf einem 10 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western-Blot auf den SeP-Gehalt untersucht.

Dabei zeigte sich, dass Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 zu einer deutlichen Steigerung der Selenoprotein P-Sekretion in den Überstand führt (Abb. 3.17 A). Dies würde sich durch das Blockieren jeglicher basaler PI3K-Aktivität und der damit verbundenen Aktivierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren erklären lassen. Gleichzeitig konnte auch gezeigt werden, dass die Senkung der Synthese von Selenoprotein P durch Insulin mit LY294002 verhindert wird.

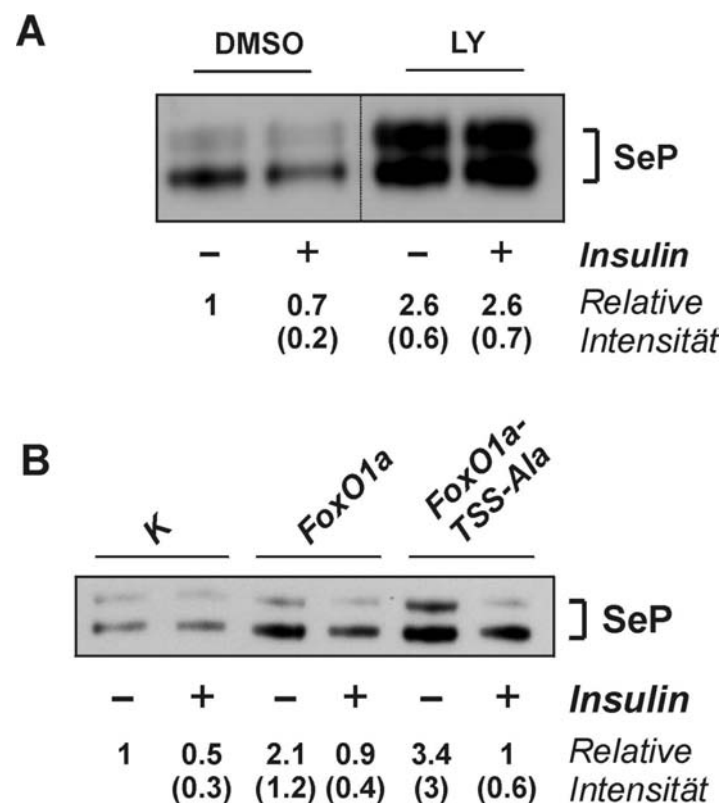


Abb. 3.17: PI3K und FoxO1a regulieren den Gehalt an Selenoprotein P in HepG2-Überständen

(A) HepG2-Zellen wurden für 24 h in selenithaltigem (0,2 µM), serumfreiem Medium unter Zugabe von Insulin (100 nM) inkubiert. Der PI3K-Inhibitor LY294002 (50 µM) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle wurden 60 min vor der Behandlung hinzugegeben und waren durchweg präsent. Der Selenoprotein P-Gehalt der Überstände wurde über Western-Blot-Analyse ermittelt.

(B) HepG2-Zellen wurden mit FoxO1a bzw. FoxO1a-TSS-Ala Überexpressionsplasmiden (K: Kontrollplasmid, pCI-Neo) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen in selenithaltigem (0,2 µM), serumfreiem Medium unter Zugabe von Insulin (100 nM) für weitere 24 h inkubiert. Die Überstände wurden über Western-Blot-Analyse auf ihren Selenoprotein P-Gehalt untersucht.

Unter repräsentativen Bildern stehen die Mittelwerte der densitometrischen Daten aus vier voneinander unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung (in Klammern).

Zur Untersuchung des Einflusses von FoxO1a auf die Produktion von Selenoprotein P wurden HepG2-Zellen mit FoxO1a oder FoxO1a-TSS-Ala-Überexpressionsvektoren (Kontrollvektor: pCI-Neo) transfiziert, 24 h nach der Transfektion auf selenithaltiges, serumfreies Medium gesetzt und für weitere 24 h mit Insulin behandelt. Danach wurden die Kulturüberstände abgenommen und später auf einem 10 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western-Blot auf den SeP-Gehalt untersucht.

Die Überexpression der FoxO1a-Konstrukte führte in beiden Fällen zu einer deutlichen Steigerung der Selenoprotein P-Menge in den Überständen (Abb. 3.17 B). Dabei zeigte eine densitometrische Untersuchung, dass FoxO1a im Durchschnitt zu mehr als einer Verdopplung und FoxO1a-TSS-Ala zu mehr als einer Verdreifachung des Selenoprotein P im Überstand führten. Die auftretenden starken Standardabweichungen lassen sich durch deutliche Schwankungen in der Transfektionseffizienz bei den verschiedenen Versuchen erklären. Auch bei diesem Versuch führte die Behandlung mit Insulin sowohl für die Kontrolle, als auch für die Überexpression von FoxO1a zu einer deutlichen Abnahme der Selenoprotein P-Sekretion in die Überstände. Erstaunlicherweise zeigte sich bei Überexpression der FoxO1a-TSS-Ala-Mutante keine Aufhebung des Insulin-Effektes, wie es bei den Untersuchungen der Promoteraktivität (Abb. 3.8) gesehen wurde. Dies läßt sich dadurch erklären, dass bei den Versuchen zur Untersuchung des Promoters nur transfizierte Zellen zu der Messung der Luciferaseaktivität beigetragen haben, während bei der Untersuchung der Überstände alle Zellen zu dem Ergebnis beitragen. Wenn man nun berücksichtigt, dass die Transfektionseffizienz in den Versuchen mit HepG2-Zellen bei maximal 20 % lag, würde das bedeuten, dass mindestens 80 % der Zellen die FoxO1a-TSS-Ala-Mutante nicht exprimierten und die Behandlung mit Insulin somit weiterhin die Selenoprotein P-Sekretion minderte.

3.2.6 Regulation der Produktion von Selenoprotein P in Astrocytomzellen

Untersuchungen mit einer Selenoprotein P Knockout-Maus haben gezeigt, dass der Selen-Gehalt im Plasma und peripheren Organen gesenkt war. Zusätzlich zeigten die Mäuse neurologische Probleme wie Bewegungsstörungen und epileptische Anfälle (Schomburg et al., 2003). Auch wenn die Leber als wichtigste Quelle von Selenoprotein im Plasma gilt, haben neuere Studien mit einem leberspezifischen Knockout der Selenocystein-tRNA gezeigt, dass das Gehirn nicht auf Selenoprotein P aus der Leber angewiesen ist, sondern seinen Selenbedarf aus anderen Quellen deckt (Schweizer et al., 2005).

Es stellt sich die Frage, ob Selenoprotein P in Gehirnzellen, nach dem gleichen Mechanismus wie in Leberzellen reguliert wird. Dafür wurden als Modell für Astrocyten, welche im Gehirn u.a. eine Versorgungsfunktion für Neuronen einnehmen, MOG-G-CCM Astrocytomzellen untersucht. Da Astrocytomzellen nicht auf Insulin reagieren, wurde zuerst die basale Akt-Phosphorylierung untersucht.

MOG-G-CCM-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium inkubiert, um die basale Phosphorylierung der an der Signaltransduktion beteiligten Proteine möglichst gering zu halten. Dann wurden die Zellen für 60 min mit den PI3K-Inhibitoren Wortmannin, LY294002 oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, elektrophoretisch auf einem 10 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western-Blot auf phosphoryliertes und Gesamt-Akt untersucht.

Abbildung 3.18 A zeigt, dass die basale Phosphorylierung von Akt trotz längerer Inkubation in serumfreiem Medium sehr deutlich ist und durch die spezifischen PI3K-Inhibitoren komplett aufgehoben wird. Die basale Aktivität von Akt ist ein für viele Astrocytome bekanntes Phänomen (Knobbe et al., 2002).

Es sollte nun überprüft werden, ob die basale Phosphorylierung von Akt auch einen Einfluss auf die Lokalisierung von FoxO1a in den Zellen hat. Dafür wurden MOG-G-CCM-Zellen mit einem Überexpressionsplasmid für das FoxO1a-EGFP-Fusionsprotein transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit Wortmannin oder DMSO präinkubiert und im Anschluss in Hank's balanced salt solution (HBSS) mit Inhibitor/DMSO für weitere 30 min inkubiert.

Wie in den beispielhaften fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3.18 B zu sehen ist, war FoxO1a auch ohne zusätzliche Behandlung zur Aktivierung von Akt bereits nahezu komplett im Cytoplasma lokalisiert. Die Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin bewirkte eine Translokation von FoxO1a in den Zellkern.

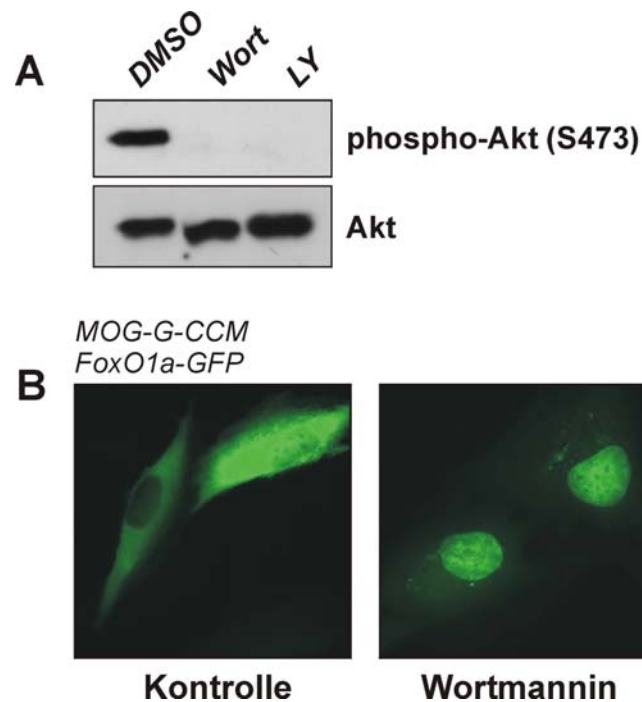


Abb. 3.18: Humane MOG-G-CCM Astrocytomzellen zeigen eine basale Akt-Aktivierung

(A) Nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium wurden MOG-G-CCM-Zellen mit Wortmannin (100 nM), LY294002 (20 μ M) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 60 min inkubiert und im Anschluss lysiert. Der Phosphorylierungsstatus von Akt wurde über Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern ermittelt (n = 3).

(B) MOG-G-CCM-Zellen wurden mit FoxO1a-EGFP Überexpressionsplasmid transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 30 min in HBSS inkubiert und im Anschluß unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Der PI3K-Inhibitor Wortmannin (100 nM) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle wurden 30 min vor der Behandlung hinzugegeben und waren auch währenddessen zugegen. Die Abbildung zeigt für n = 2 Versuche repräsentative Bilder.

Somit sorgt eine basale Akt-Aktivierung in MOG-G-CCM-Zellen dafür, dass sich FoxO1a hauptsächlich im Cytoplasma befindet, was letztendlich zu einer verminderten Transkription und Translation von FoxO-Zielgenen führen sollte. Da die Regulation von Selenoprotein P durch FoxO1a in Leberzellen nachgewiesen werden konnten, wurde nun die Regulation des Proteins über den Akt/FoxO-Signalweg in Astrocytomzellen untersucht. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die von uns benutzten MOG-G-CCM-Zellen Selenoprotein P nicht in

den Überstand sezernieren, sondern unglykolisiert in der Zelle halten, wobei auch nur ein einziges Fragment entsteht (Steinbrenner et al., 2006).

MOG-G-CCM-Zellen wurden mit den PI3K-Inhibitoren Wortmannin, LY294002 oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle teilweise unter Zugabe von Selenit für 24 h inkubiert und anschließend lysiert und im Western-Blot auf den SeP-Gehalt untersucht.

Dabei wurde Selenoprotein P durch beide PI3K-Inhibitoren sehr deutlich hochreguliert, wobei der Effekt von LY294002 stärker als der von Wortmannin war (Abb. 3.19 A). Erstaunlicherweise waren die SeP-Mengen unabhängig von der Zugabe von Selenit.

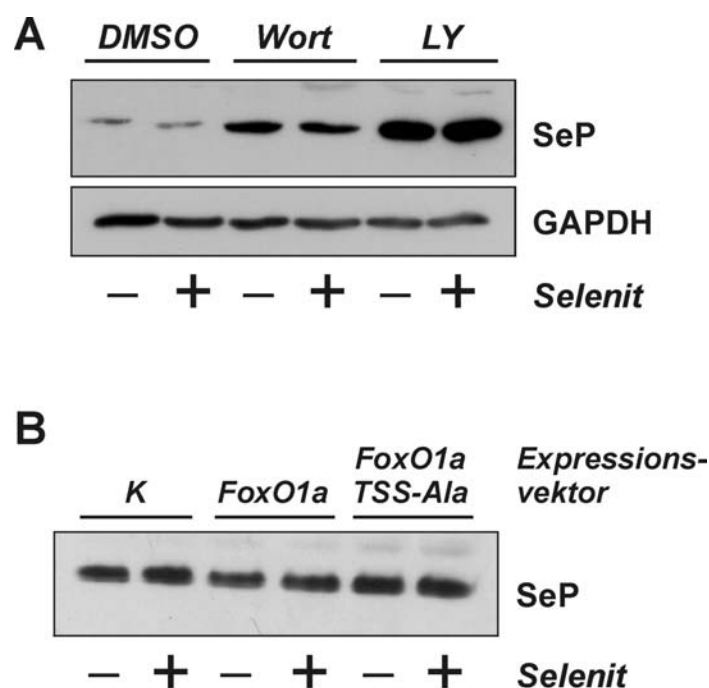


Abb. 3.19: Regulation von Selenoprotein P in MOG-G-CCM-Zellen

(A) MOG-G-CCM-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium unter Zugabe von Selenit (0,2 μ M) mit den PI3K-Inhibitoren Wortmannin (100 nM), LY294002 (20 μ M) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Der Selenoprotein P-Gehalt der Lysate wurde über Western-Blot-Analyse ermittelt.

(B) HepG2-Zellen wurden mit FoxO1a bzw. FoxO1a-TSS-Ala Überexpressionsplasmiden (K: Kontrollplasmid, pCI-Neo) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen in serumfreiem Medium unter Zugabe von Selenit (0,2 μ M) für weitere 24 h inkubiert. Die Lysate wurden über Western-Blot-Analyse auf ihren Selenoprotein P-Gehalt untersucht.

Die gezeigten Daten sind repräsentativ für n = 3 voneinander unabhängige Experimente.

Abschließend sollte geklärt werden, ob Überexpression von FoxO1a oder der FoxO1a-TSS-Ala-Mutante die Regulation von Selenoprotein P beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurden MOG-G-CCM-Zellen mit FoxO1a oder FoxO1a-TSS-Ala-Überexpressionsvektoren (Kontrollvektor: pCI-Neo) transfiziert und 24 h nach der Transfektion auf serumfreies Medium gesetzt und für weitere 24 h mit Selenit behandelt. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate später auf den SeP-Gehalt untersucht.

Die Überexpression der beiden FoxO1a-Konstrukte führte in keinem Fall zu einer Änderung der Selenoprotein P-Menge in den Lysaten, wobei auch die Anwesenheit von Selenit wiederum keinen Einfluss zeigte (Abb. 3.19 B). Dieses Ergebnis ist sehr unerwartet, da die Lokalisation von FoxO1a und die Proteinmenge an Selenoprotein P beide eindeutig PI3K-abhängig reguliert wurden und die Transfektionseffizienz im Bereich von 30 % bis maximal 50 % lag. Somit liegt nahe, dass FoxO1a in MOG-G-CCM-Zellen im Unterschied zu Hepatomzellen keinen Einfluss auf die Regulation von SeP hat.

3.3 Aktivierung des Akt/FoxO-Signalweg durch Kupfer- und Zinkionen

Neben der Identifikation neuer Zielgene ist bei der Untersuchung von zellulären Signalwegen auch die Identifikation neuer Faktoren, die zur Aktivierung führen, von Bedeutung. In Fibroblasten und HeLa-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass Kupfer-Ionen PI3K-abhängig Akt phosphorylieren (Ostrakovitch et al., 2002). Es sollte untersucht werden, ob diese Ergebnisse auch auf humane HepG2 Hepatomzellen und MOG-G-CCM-Astrocytomzellen übertragbar sind. Desweiteren sollte untersucht werden, wie der über Akt regulierte Transkriptionsfaktor FoxO1a und dessen Zielgene auf Behandlung mit Schwermetallionen reagieren.

Neben den Effekten von Kupfer(II)-Ionen wurden auch Zink(II)-Ionen, welche isoelektronisch zu Kupfer(I)-Ionen sind, untersucht. Zuerst wurde die toxische Wirkung verschiedener Konzentrationen der Metallionen auf HepG2-Zellen untersucht. Dafür wurden HepG2-Zellen für 60 min mit den Schwermetallionen in HBSS inkubiert, gewaschen und vor Bestimmung der Viabilität für 6 oder 24 h in serumfreiem Medium gehalten.

Wie Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, führte Behandlung mit 10 bzw. 100 μM Zinksulfat, sowie 10 μM Kupfersulfat sogar zu einer verstärkten Proliferation bzw. einer verringerten Apoptose der Zellen. Behandlung mit 50 μM und 100 μM Kupfersulfat war jedoch nach 24 h bzw. 6 h Postinkubation für die Zellen toxisch.

Tabelle 3.1: Einfluss der Inkubation mit Schwermetallionen auf die Viabilität von HepG2-Zellen

HepG2 humane Hepatomzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an CuSO_4 bzw. ZnSO_4 in HBSS für 60 min inkubiert und im Anschluss für 6 oder 24 h in serumfreiem Medium gehalten. Danach wurden Zellviabilitäten mit Hilfe von Neutralrot bestimmt.

		6 h Postinkubation	24 h Postinkubation
Kontrolle		1 ^a	1
ZnSO₄	10 μM	1,33 $\pm$ 0,17 ^b	1,40 $\pm$ 0,07
	100 μM	1,36 $\pm$ 0,15	1,27 $\pm$ 0,13
CuSO₄	10 μM	1,15 $\pm$ 0,13	1,18 $\pm$ 0,10
	50 μM	0,84 $\pm$ 0,18	0,47 $\pm$ 0,17
	100 μM	0,38 $\pm$ 0,33	0,25 $\pm$ 0,18

^a Die Werte der unbehandelten Zellen wurden als Kontrolle gleich eins gesetzt.

^b Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung.

Somit empfahl es sich, für eine längere Inkubation der Zellen weniger als 50 μM Kupfersulfat zu verwenden. Für kürzere Inkubationszeiten ist dies nicht zu beachten. Daher wurde die direkte Aktivierung der Signalwege zum Vergleich auch mit 100 μM Kupfersulfat untersucht.

Zur Untersuchung der Aktivierung von Akt durch Schwermetallionen in HepG2-Zellen wurden diese für 60 min in HBSS mit je 10 und 100 μM Zink- oder Kupfersulfat inkubiert. Vor der eigentlichen Behandlung wurden die Zellen für 30 min mit den PI3K-Inhibitoren Wortmannin, LY294002 oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle vorinkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert, elektrophoretisch auf einem 10 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western-Blot auf phosphoryliertes und Gesamt-Akt untersucht.

In Abbildung 3.20 ist zu sehen, dass Akt nach Inkubation mit 100 μM nicht aber durch 10 μM Zinksulfat stark phosphoryliert wurde. Bei der Behandlung mit Kupfersulfat reichten schon 10 μM für eine starke Phosphorylierung von Akt aus. Die PI3K-Inhibitoren hoben diese Phosphorylierung komplett auf.

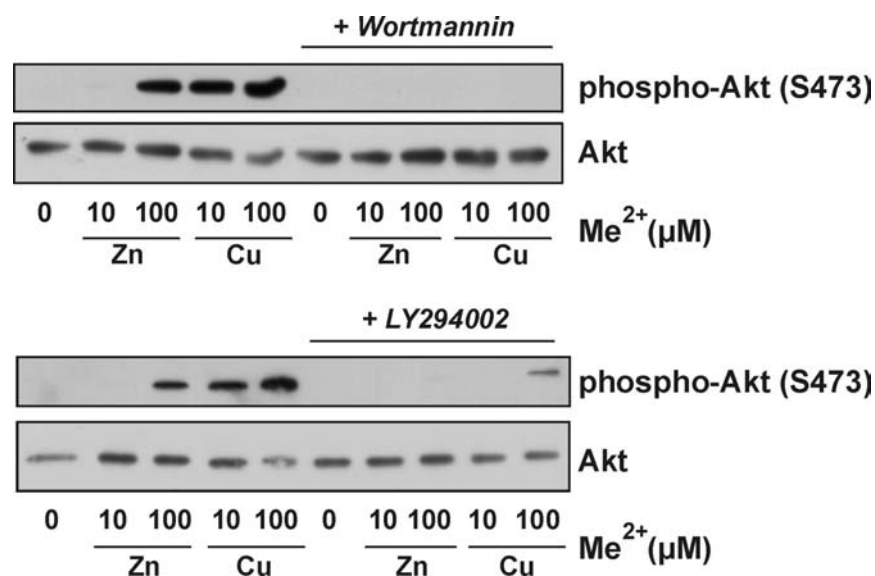


Abb. 3.20: Inkubation mit Schwermetallionen führt zu einer PI3K-abhängigen Phosphorylierung von Akt in HepG2-Zellen

HepG2 humane Hepatomzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an CuSO_4 bzw. ZnSO_4 in HBSS für 60 min inkubiert und im Anschluss lysiert. Die PI3K-Inhibitoren Wortmannin (100 nM), LY294002 (20 μM) oder DMSO (Lösungsmittelkontrolle) wurden für 30 min präinkubiert und waren auch während der Behandlung zugegen. Der Phosphorylierungsstatus von Akt wurde über Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern ermittelt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente.

Da HepG2-Zellen mit einer deutlichen Phosphorylierung von Akt auf die Inkubation mit Schwermetallionen reagierten, sollten auch MOG-G-CCM-Zellen untersucht werden. Diese besitzen eine deutliche basale Phosphorylierung von Akt (s. Abb. 3.18 A), und es war von Interesse, ob diese durch Inkubation mit Schwermetallionen weiter verstärkt wird.

MOG-G-CCM-Zellen wurden dafür über Nacht mit serumfreiem Medium inkubiert und dann für 30 min mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin oder DMSO (als Lösungsmittelkontrolle) vorinkubiert. Die Behandlung mit Schwermetallionen erfolgte für 60 min unter gleichzeitiger Anwesenheit von Wortmannin bzw. DMSO. Nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert, elektrophoretisch auf einem 10 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western-Blot auf phosphoryliertes Akt untersucht. Der Nachweis von GAPDH diente als Kontrolle für die Gelbeladung.

Es zeigte sich die erwartete basale Phosphorylierung in der Kontrolle und bei der Behandlung mit 10 μM Zinksulfat, die aber durch Behandlung mit 100 μM Zinksulfat oder 10 μM Kupfersulfat deutlich verstärkt werden konnte. Gleichzeitige Behandlung mit Wortmannin führte zur Auslöschung jeglicher Phosphorylierung von Akt.

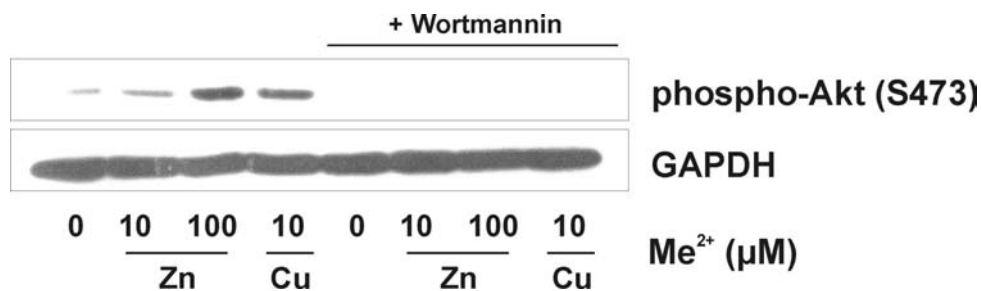


Abb. 3.21: Inkubation mit Schwermetallionen führt zu einer PI3K-abhängigen Phosphorylierung von Akt in MOG-G-CCM-Zellen

Nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium wurden humane MOG-G-CCM Astrocytomzellen mit den angegebenen Konzentrationen an CuSO_4 bzw. ZnSO_4 in HBSS für 60 min inkubiert und im Anschluss lysiert. Der PI3K-Inhibitor Wortmannin (100 nM) oder DMSO (als Lösungsmittelkontrolle) wurden für 30 min präinkubiert und waren auch während der Behandlung zugegen. Der Phosphorylierungsstatus von Akt wurde über Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern ermittelt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente.

Neben der Phosphorylierung von Akt ist auch die Aktivierung anderer Signalwege durch die Inkubation mit Schwermetallionen bekannt. In diesem Zusammenhang war von Interesse, wie die MAP-Kinasen ERK1/2 auf Behandlung mit Schwermetallionen reagieren, und ob die

Effekte durch die spezifischen Inhibitoren für MEK1/2, PD98059 und U0126, rückgängig gemacht werden können. ERK1 und 2 sind direkte Substrate der Kinasen MEK1 und 2.

Die HepG2-Zellen wurden für 60 min in HBSS mit je 10 und 100 μM Zink- oder Kupfersulfat inkubiert. Vor der eigentlichen Behandlung wurden die Zellen für 30 min mit den MEK1/2-Inhibitoren PD98059, U0126 oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle vorinkubiert, welche auch während der Behandlung zugegen waren.

Inkubation mit 100 μM Zinksulfat oder 10 μM Kupfersulfat führte zu einer leichten, 100 μM Kupfersulfat hingegen zu einer sehr intensiven Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 3.22). Die MEK1/2-Inhibitoren führte zu einer deutlichen Abschwächung der Phosphorylierung.

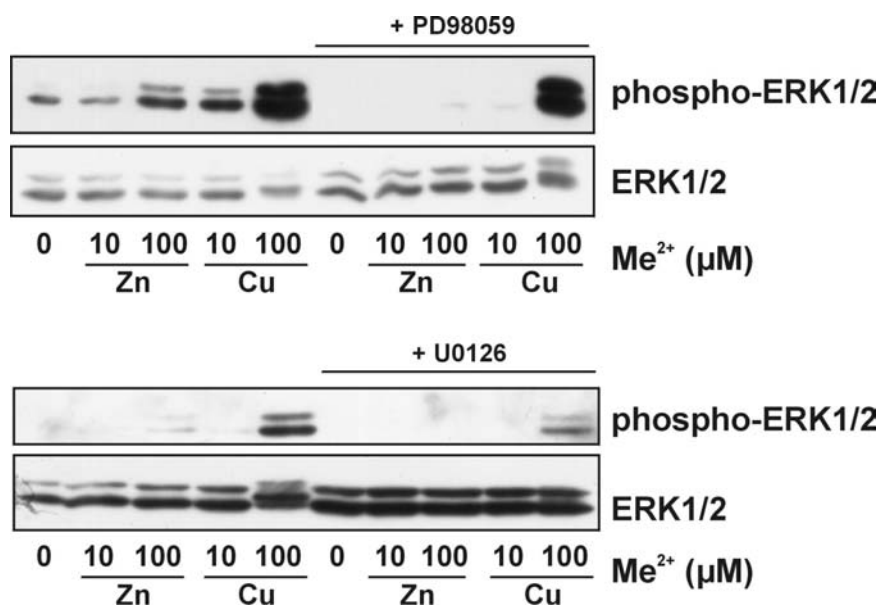


Abb. 3.22: Inkubation mit Schwermetallionen führt zu einer MEK1/2-abhängigen Phosphorylierung von ERK1/2 in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an CuSO_4 bzw. ZnSO_4 in HBSS für 60 min inkubiert und im Anschluss lysiert. Die MEK1/2-Inhibitoren PD98059 (50 μM), U0126 (10 μM) oder die Lösungsmittelkontrolle DMSO wurden für 30 min präinkubiert und waren auch während der Behandlung zugegen. Der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 wurde über Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern ermittelt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n \geq 2$ voneinander unabhängige Experimente.

Eine Phosphorylierung von Akt sollte auch zu einer nachfolgenden Phosphorylierung von Akt-Substraten führen. Im Western-Blot wurde ein Antikörper verwendet, welcher die Konsensussequenz, welche von Akt phosphoryliert wird, erkennt. Zusätzlich wurde die Phosphorylierung der bekannten Akt-Substrate Glycogensynthasekinase-3 (GSK3) sowie FoxO1a und FoxO4 untersucht.

Die Induktion der Phosphorylierung von Akt-Substraten durch Schwermetallionen in HepG2-Zellen wurde nach Inkubation der Zellen für 60 min in HBSS mit je 10 und 100 μM Zink- oder Kupfersulfat analysiert, indem Zelllysate elektrophoretisch auf einem 10 %igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western-Blot auf phosphorylierte Akt-Substrate, phosphorylierte GSK3, phosphorylierte FoxO1a und FoxO4 und Gesamt-FoxO1a untersucht wurden.

Wie Abbildung 3.23 A zeigt, führt Inkubation mit 10 bzw. 100 μM Kupfersulfat, sowie mit 100 μM Zinksulfat zu einer starken Phosphorylierung der Akt-Substrate. Bei der Untersuchung von GSK3 zeigten sich die gleichen Effekte, nur dass hier 100 μM Kupfersulfat wider Erwarten nur eine schwache Phosphorylierung hervorrief, die mit der durch 10 μM Zinksulfat vergleichbar ist (Abb. 3.23 B). Eine deutliche Phosphorylierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren an Ser-256 (FoxO1a) und Ser-193 (FoxO4) wird mit 100 μM Zinksulfat oder 10 μM Kupfersulfat erreicht, wobei diese durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin nahezu aufgehoben wird (Abb. 3.23 C).

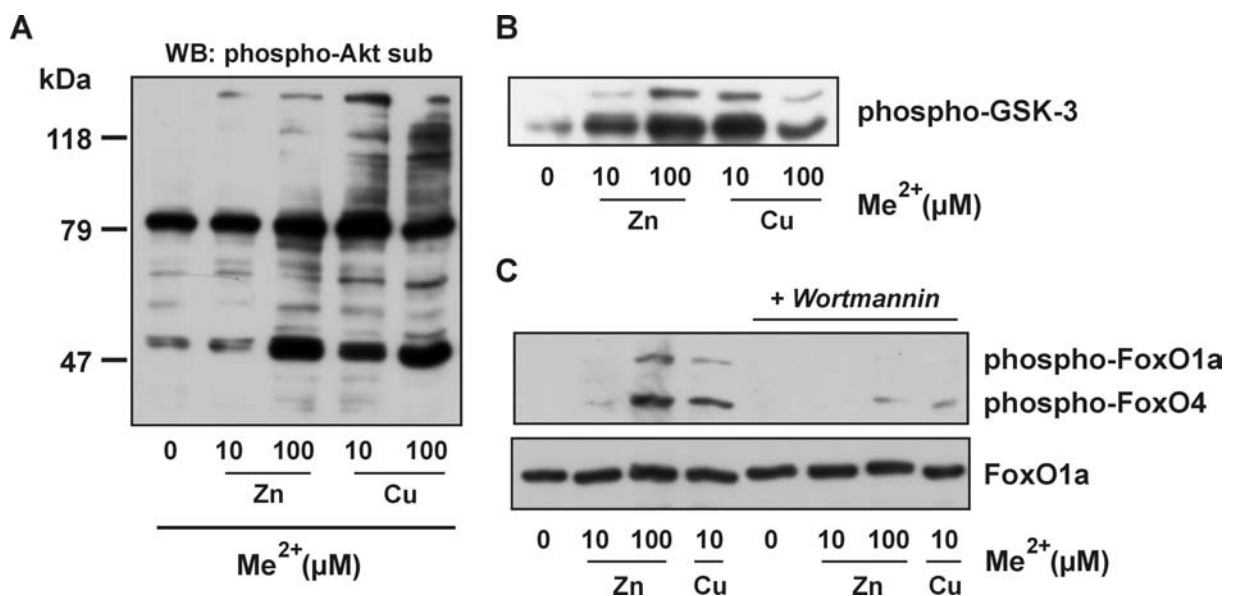


Abb. 3.23: Inkubation mit Schwermetallionen führt zur Phosphorylierung von Akt-Substraten

HepG2-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an CuSO_4 bzw. ZnSO_4 in HBSS für 60 min inkubiert und im Anschluss lysiert. Der PI3K-Inhibitor Wortmannin (100 nM) oder die Lösungsmittelkontrolle DMSO wurden für 30 min präinkubiert und waren auch während der Behandlung zugegen. Der Phosphorylierungsstatus von Akt-Substraten mit dem Motiv (R/K)X(R/K)XX(T*/S*) (A), Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3, B) und FoxO1a/FoxO4 (C) wurde über Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern ermittelt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n = 2$ (A und B) oder $n = 3$ (C) voneinander unabhängigen Experimenten.

Die somit nachgewiesene Induktion der Phosphorylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Schwermetallionen sollte auch zu einer Änderung der FoxO-Lokalisation in der Zelle führen.

HepG2-Zellen wurden mit Überexpressionsplasmiden für FoxO1a-EGFP oder FoxO1a-TSS-Ala-EGFP transfiziert, 24 h später für 30 min mit Wortmannin oder DMSO präinkubiert und im Anschluss in HBSS mit Schwermetallionen bzw. Insulin und Inhibitor oder DMSO koinkubiert. Nach 30 min wurde die subzelluläre Lokalisation des FoxO1a-EGFP-Fusionsproteins fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Pro Ansatz wurde die Lokalisation des Fusionsproteins in mindestens 10 verschiedenen mikroskopischen Sichtfeldern bestimmt. In Abbildung 3.24 sind einige beispielhafte Aufnahmen und die statistische Auswertung der Versuche gezeigt.

Dabei werden Zellen mit überwiegend im Zellkern befindlichem Fusionsprotein durch schwarze Balken dargestellt, während überwiegende Lokalisation im Cytoplasma durch weiße Balken angezeigt wird. In beiden Zellkompartimenten lokalisiertes Fusionsprotein wird durch graue Balken dargestellt.

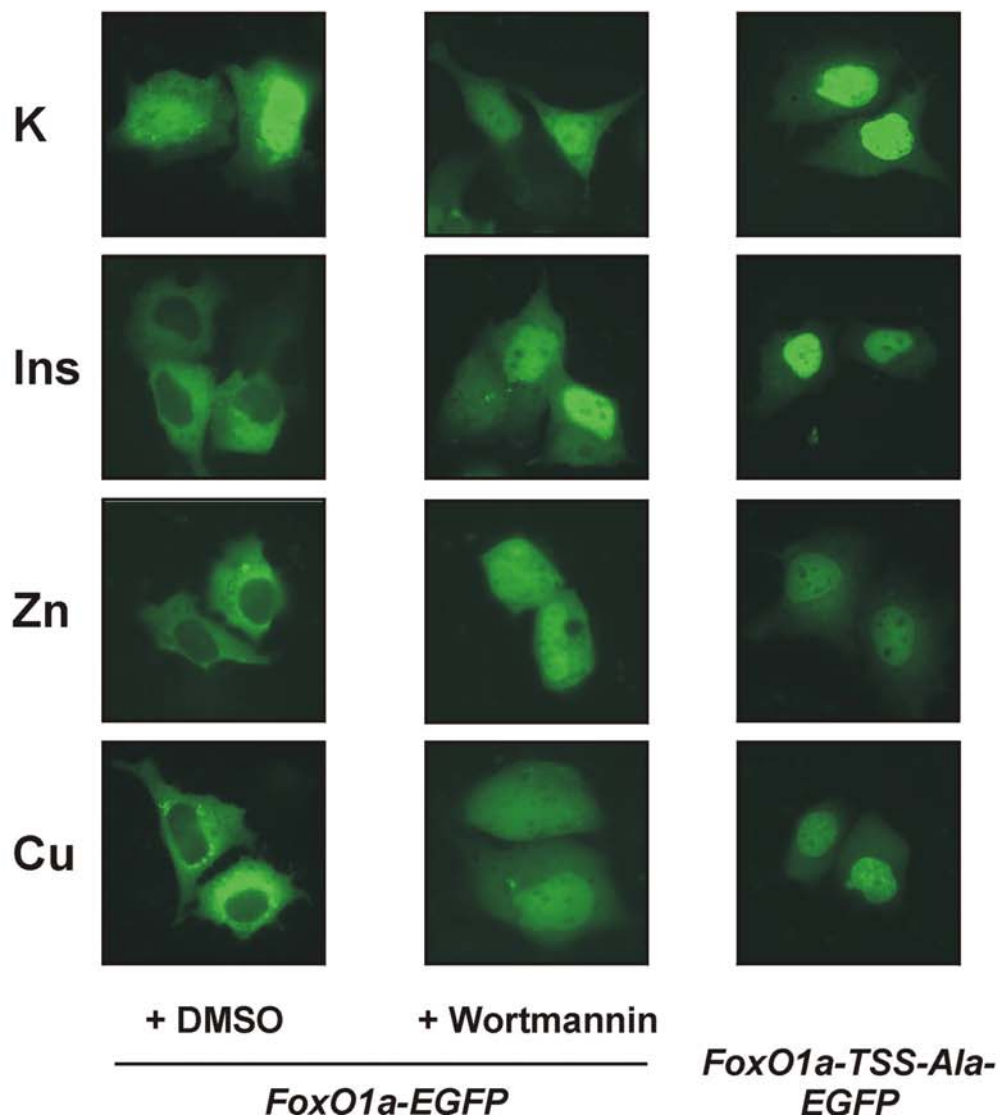
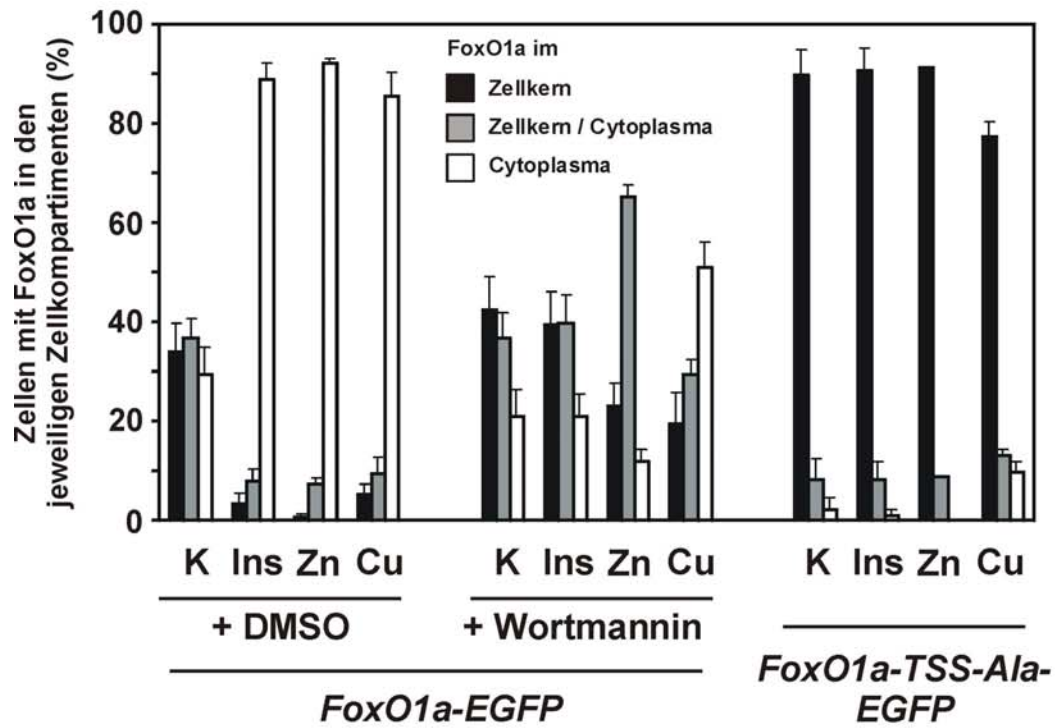


Abb. 3.24: Relokalisation von FoxO1a nach Behandlung mit Schwermetallionen. Aufhebung dieses Effektes durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin und die Mutante FoxO1-TSS-Ala

HepG2-Zellen wurden mit FoxO1a-EGFP bzw. FoxO1a-TSS-Ala-EGFP Überexpressionsplasmiden transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 30 min in HBSS in Anwesenheit von CuSO₄ (10 µM), ZnSO₄ (50 µM) oder Insulin (100 nM) inkubiert und im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Der PI3K-Inhibitor Wortmannin (100 nM) und DMSO (Lösungsmittelkontrolle) wurden 30 min vor der Behandlung hinzugegeben und waren auch währenddessen zugegen. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ± SEM (n = 2 für Zn/FoxO1a-TSS-Ala).

Es zeigt sich, dass FoxO1a-EGFP-Fusionsprotein in unbehandelten Zellen recht gleichmäßig über die Zelle verteilt ist, wobei nach Inkubation mit Zinksulfat und Kupfersulfat bis zu 90 % der betrachteten Zellen das Fusionsprotein vorwiegend im Cytoplasma enthielten. Die Inkubation mit Wortmannin führt zwar zu einer kompletten Aufhebung des Effekts der Positivkontrolle Insulin und kann eines Großteils des Effekts für die Behandlung mit Zinksulfat hemmen. Im Falle von Kupfersulfat kann Wortmannin jedoch die nukleäre Lokalisation von FoxO1a nur zu etwa 50 % regenerieren. Weniger deutlich ist dies bei der FoxO1a-TSS-Ala-Mutante, bei welcher das Fusionsprotein bei Kontrolle, Insulin- und Zinksulfat-Behandlung in 90 % der analysierten Zellen im Zellkern lokalisiert ist. Bei der Behandlung mit Kupfersulfat ist das FoxO1a-TSS-Ala-EGFP zu 80 % im Zellkern lokalisiert. Somit konnte gezeigt werden, dass FoxO1a nach Behandlung mit Schwermetallionen ins Cytoplasma wandert, wobei dieser Effekt vollständig bzw. größtenteils (bei Kupfersulfat) über PI3K verläuft.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, wie sich die durch Behandlung mit Schwermetallen hervorgerufene Translokation von FoxO1a auf die Regulation von FoxO-Zielgenen auswirkt. Dafür wurde in Versuchen zur Promoteraktivität das für die Glukoneogenese in der Leber essentielle FoxO-Zielgen Glukose-6-Phosphatase untersucht. Es wurde ein Konstrukt verwendet, in welchem der Glukose 6-Phosphatase-Promoter vor ein Luciferase-Gen kloniert war (G6Pase-luc; Schmoll et al., 1999). 24 h nach der Transfektion der Zellen mit G6Pase-luc und pRL-SV40 wurde für 60 min mit Wortmannin oder DMSO (Lösungsmittelkontrolle) vorinkubiert, dann in Anwesenheit von Wortmannin bzw. DMSO für 8 h mit Kupfersulfat oder Insulin in serumfreiem Medium behandelt, lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt.

Sowohl 10 als auch 25 µM Kupfersulfat sowie Insulin führten zu einer deutlichen Reduktion der G6Pase-Promoteraktivität (Abb. 3.25). Dieser Effekt konnte mit dem PI3K-Inhibitor

Wortmannin jedoch nur für Insulin wieder aufgehoben werden. Kupfersulfat scheint den G6Pase-Promoter somit unabhängig von PI3K zu regulieren

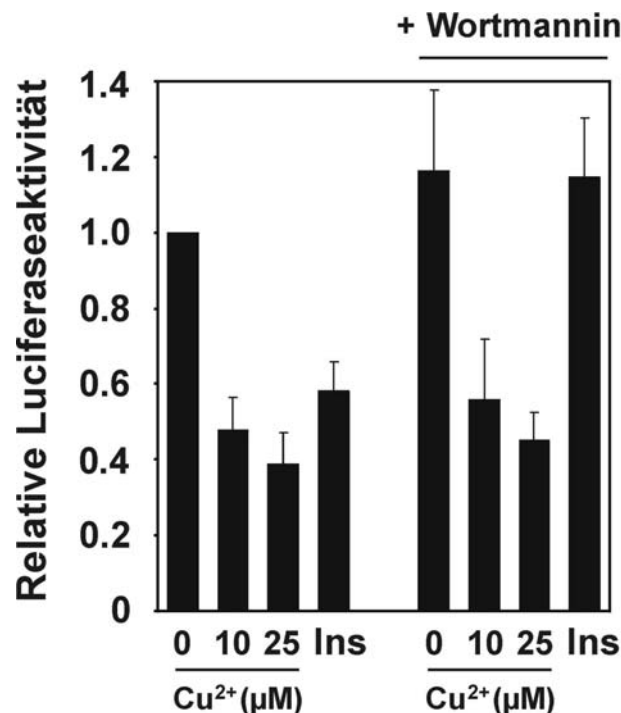


Abb. 3.25: Cu^{2+} reguliert den G6Pase-Promoter unabhängig von PI3K

HepG2-Zellen wurden mit einem Glukose 6-Phosphatase Promoter-Luciferase Reporter-Gen-Konstrukt (G6Pase-luc) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und dann für 8 h in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen CuSO_4 oder Insulin (100 nM) inkubiert und nach Lyse die Luciferaseaktivität bestimmt. Der PI3K-Inhibitor Wortmannin (100 nM) und DMSO (Lösungsmittelkontrolle) wurden 60 min vor der Behandlung hinzugegeben und waren auch während der Behandlung präsent. Die Daten sind Mittelwerte aus vier voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM.

Kupfer-Ionen werden gut durch Aminosäuren komplexiert. Um diese Komplexbildung zu verhindern, wurden die Inkubationen mit Schwermetallionen normalerweise in HBSS durchgeführt. Nun sollte der Einfluss einer Komplexbildung durch das Tripeptid Gly-Gly-His (GGH) sowie von Zellkulturmedium auf die Aktivierung von Akt und im Falle des Mediums der Einfluss auf die Modulation des G6Pase-Promoters durch Kupfersulfat untersucht werden. HepG2-Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Direkt vor der Behandlung der Zellen wurden Kupfersulfat und GGH gemischt. Die Zellen wurden mit Kupfersulfat, den Kupfersulfat-GGH-Komplexen oder Insulin in HBSS oder mit Kupfersulfat in serumfreiem Medium für 30 min behandelt und im Western-Blot auf phosphoryliertes und Gesamt-Akt untersucht.

Es zeigte sich mit einer Konzentrationen von 25 μM Kupfersulfat in HBSS eine starke Phosphorylierung von Akt, welche durch vorherige Inkubation mit 25 μM GGH komplett aufgehoben wurde (Abb. 3.26 A). Bei Inkubation mit 25 μM GGH und 50 μM Kupfersulfat zeigte sich wieder eine sehr starke Phosphorylierung von Akt, was auf einen 1:1-Komplex aus Cu^{2+} und GGH schließen lässt. Wurde in serumfreiem Medium inkubiert, fand sich mit 50 μM Kupfersulfat keine Phosphorylierung von Akt, während diese bei Inkubation mit 500 μM Kupfersulfat deutlich hervortrat. Da das Medium Aminosäuren in Konzentrationen von mehreren 100 μM enthält, sind diese Beobachtungen durch Komplexbildung von Kupfersulfat durch Aminosäuren erklärbar.

Zur Untersuchung der Aktivität des FoxO-regulierbaren G6Pase-Promoters nach Inkubation mit Cu^{2+} wurden HepG2-Zellen mit G6Pase-luc, pRL-SV40 und pEGFP-C1 Kontrollvektor kotransfiziert. Nach 24 h wurde entweder für 1 h in HBSS mit Kupfersulfat und dann für 17 h ohne Kupfersulfat in serumfreiem Medium, oder für 18 h mit Kupfersulfat oder Insulin in serumfreiem Medium behandelt und anschließend die zelluläre Luciferaseaktivität bestimmt.

Wie aus Abbildung 3.26 B hervorgeht, hemmt Kupfersulfat sowohl in komplexierter (DMEM), wie auch in „freier“ Form (HBSS) die Aktivität des G6Pase-Promoters. Aufgrund der unterschiedlichen Effekte einer Behandlung und in DMEM gelöstem Cu^{2+} wird gefolgert, dass dieser Effekt unabhängig von Akt ist. Um dies weiter zu untersuchen, sollten FoxO1a und FoxO1a-TSS-Ala überexprimiert werden. Wenn Akt einen Einfluss auf die Regulation hätte, dann müsste dieser Effekt durch die FoxO1a-Mutante aufgehoben werden.

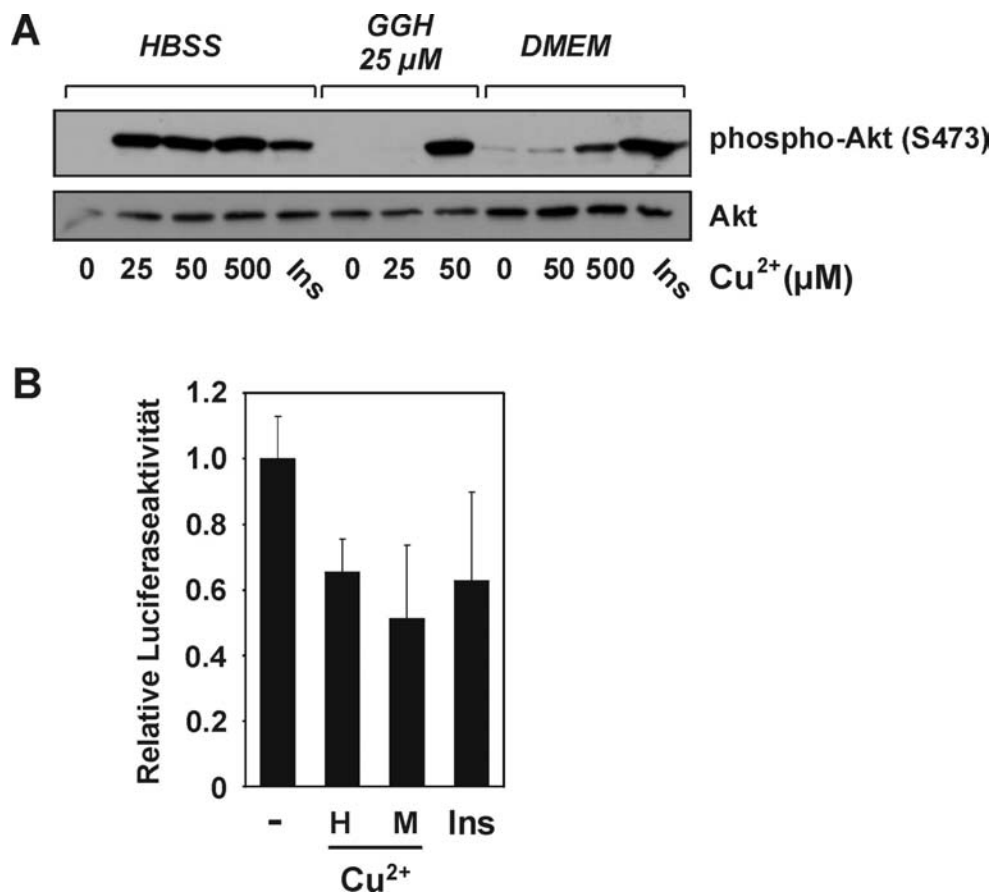


Abb. 3.26: Komplextiertes CuSO₄ senkt die Aktivität des G6Pase-Promoters unabhängig von Akt

(A) Nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium wurden HepG2-Zellen in HBSS, HBSS mit Zusatz des Tripeptids Gly-Gly-His (GGH) oder serumfreiem Medium (DMEM) mit den angegebenen Konzentrationen an CuSO₄ oder Insulin (100 nM) für 30 min inkubiert und im Anschluss lysiert. Der Phosphorylierungsstatus von Akt wurde über Western-Blot-Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern ermittelt.

(B) HepG2-Zellen wurden mit einem Glukose 6-Phosphatase-Promoter-Luciferase-Reporterkonstrukt (G6Pase-luc) und pEGFP-C1 kotransfiziert. Nach 24 h wurde mit CuSO₄ (10 μ M) für 1 h in HBSS und dann in serumfreiem DMEM ohne Zusatz von CuSO₄ für 17 h (H), oder mit CuSO₄ (10 μ M) oder Insulin (100 nM) für 18 h in serumfreiem DMEM (M) inkubiert, gefolgt von Bestimmung der zellulären Luciferaseaktivität. Die Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung.

Es ist bekannt, dass FoxO1a-Überexpression die Aktivität des G6Pase-Promoters beeinflusst, da der Promoter mehrere FoxO-bindende Elemente enthält. HepG2-Zellen wurden mit G6Pase-luc, pRL-SV40 und mit Überexpressionsvektoren für FoxO1a-EGFP bzw. FoxO1a-TSS-Ala-EGFP (Kontrollvektor: pEGFP-C1) kotransfiziert. Nach 24 h wurde entweder für 1h in HBSS mit Kupfersulfat und dann für 17 h ohne Kupfersulfat in serumfreiem Medium, oder für 18 h mit Kupfersulfat oder Insulin in serumfreiem Medium behandelt und anschließend lysiert. In den Lysaten wurde später die Luciferaseaktivität bestimmt.

Es zeigte sich eine durch FoxO1a-Überexpression drastisch gesteigerte Aktivität des G6Pase-Promoters, welche durch die Mutante noch weiter gesteigert wurde (Abb.3.27). Die Behandlungen mit Kupfersulfat oder Insulin führten beim FoxO1-Wildtyp in allen Fällen zu einer deutlichen Abnahme der Promoteraktivität. Dies konnte von der nicht durch Akt phosphorylierbaren FoxO1a-TSS-Ala-Mutante allerdings nur im Falle von Insulin wieder rückgängig gemacht werden. Somit beruht der Effekt von Kupfersulfat auf den G6Pase-Promotor nicht auf einer Aktivierung des Akt/FoxO-Signalweges.

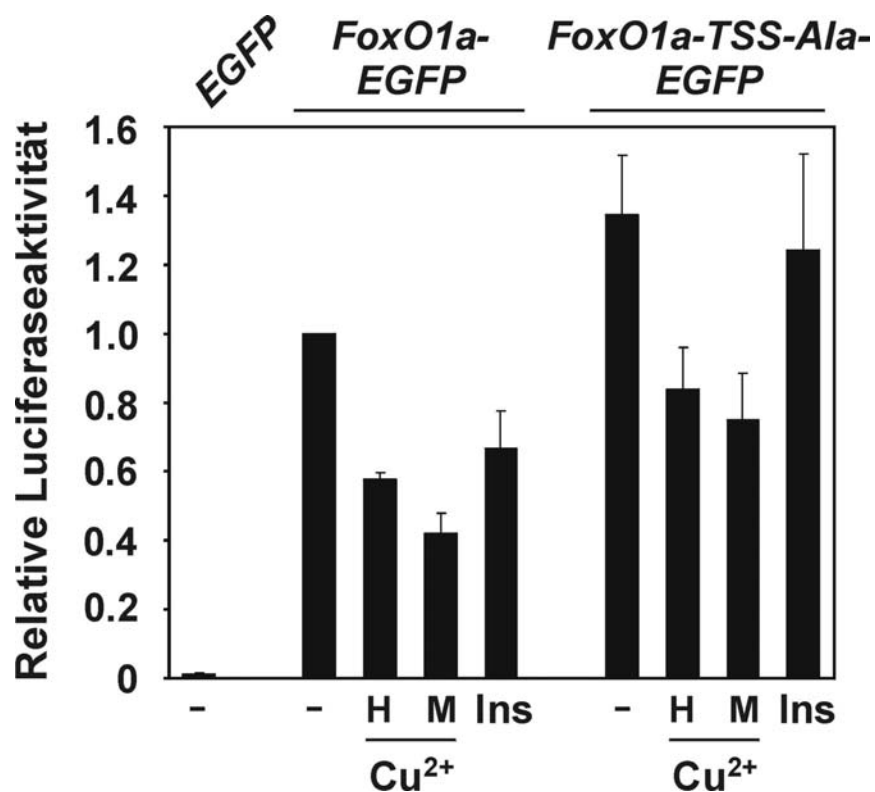


Abb. 3.27: Cu²⁺ reguliert den G6Pase-Promoter unabhängig von PI3K

HepG2-Zellen wurden mit einem Glukose 6-Phosphatase-Promoter-Luciferase-Reportergenkonstrukt (G6Pase-luc) und FoxO1a-EGFP, FoxO1a-TSS-Ala-EGFP Überexpressionsplasmiden oder pEGFP-C1-Kontrollvektor (EGFP) kotransfiziert. Nach 24 h wurde mit CuSO₄ (10 µM) für 1 h in HBSS und dann in serumfreiem DMEM ohne Zusatz von CuSO₄ für 17 h (H), oder mit CuSO₄ (10 µM) oder Insulin (100 nM) für 18 h in serumfreiem DMEM (M) inkubiert und dann lysiert. Später erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität in den Lysaten. Die Daten sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Selenoprotein P durch FoxO1a reguliert wird, sollte nun untersucht werden, wie der SeP-Promoter auf eine Behandlung mit Schwermetallionen reagiert. Dafür wurde 24 h nach der Kotransfektion der HepG2-Zellen mit

SeP-luc, pRL-SV40 und FoxO1a-EGFP-Überexpressionsvektor (Kontrollvektor: pEGFP-C1) für 18 h mit den Schwermetallionen in selenithaltigem, serumfreiem Medium inkubiert und anschließend lysiert. In den Lysaten wurde später die Luciferaseaktivität gemessen.

Es zeigte sich, dass die Selenoprotein P Promoteraktivität bereits durch die geringen Konzentrationen von 2,5 bzw. 5 μM Kupfersulfat sehr deutlich abgeschwächt wird (Abb. 3.28). Dies fand sich auch im Falle der FoxO1a-Überexpression. Interessanterweise führte Inkubation mit 10 bzw. 25 μM Zinksulfat zwar auch zu einer bis zu 40 %igen Verringerung der Promoteraktivität, was aber bei FoxO1a-Überexpression aufgehoben wurde.

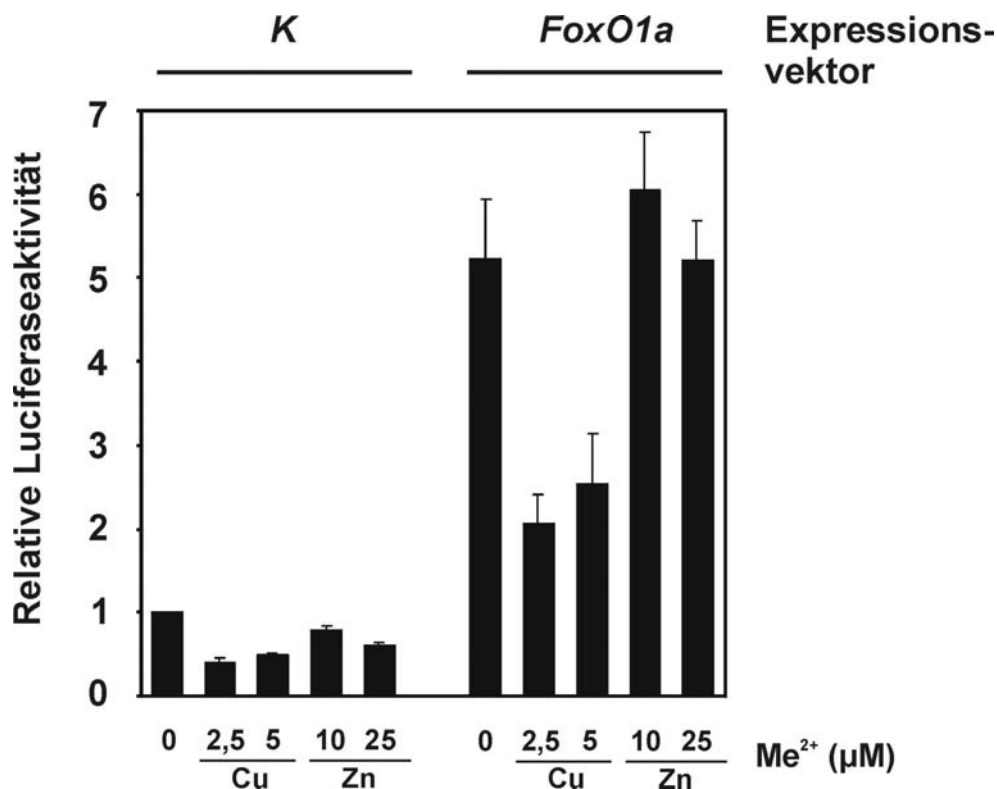


Abb. 3.28: Metallionen regulieren den SeP-Promoter

HepG2-Zellen wurden mit einem Selenoprotein P-Promoter-Luciferase-Reportergenkonstrukt (SeP-luc) und FoxO1a-EGFP Überexpressionsplasmid (K: Kontrollplasmid, pEGFP-C1) kotransfiziert. Nach 24 h wurde mit CuSO_4 oder ZnSO_4 für 18 h in selenithaltigem, serumfreiem DMEM inkubiert und dann lysiert. Später erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität in den Lysaten. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardabweichung.

Da diese Versuche in DMEM durchgeführt wurden und eine Phosphorylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren über Akt daher unwahrscheinlich ist, wird die Folgerung gezogen, dass die Regulation des SeP-Promoters durch Cu^{2+} unabhängig von dem PI3K/Akt/FoxO-Signalweg erfolgt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit G6Pase-luc bzw. noch deutlicher mit 6xDBE-luc gefunden (ohne Abbildung). In beiden Fällen führte Behandlung mit Zinksulfat bei gleichzeitiger FoxO1a-Überexpression zu einer Stimulation der Promoteraktivität (ohne Abbildung).

Die Effekte von Kupfersulfat auf die Promotoren von FoxO-Zielgenen scheinen also unabhängig von PI3K und Akt über andere Signalwege zu erfolgen.

4. Diskussion

4.1 Einfluss von Selenit auf den Akt/FoxO-Signalweg

Unterschiedliche Arbeitsgruppen haben berichtet, dass Inkubation von Zellen mit Selenit zu einer gesteigerten Phosphorylierung und Aktivierung von Akt führt (Yoon et al., 2002; Lee et al., 2003). Dabei wurden auch menschliche Hepatomzellen untersucht, wobei es sich aber nicht um HepG2, sondern um HuH7 handelte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass Selenit keinen Einfluss auf die Aktivierung des Akt/FoxO-Signalwegs in humanen HepG2 Hepatomzellen hat. So wurde bei Inkubation von HepG2-Zellen mit Selenit keine Änderung der Phosphorylierung von Akt beobachtet (siehe Abb. 3.3). Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen mag zwar dadurch erklärt werden, dass unterschiedliche Zelllinien benutzt und verschiedene Selenitkonzentrationen (0,1 bis 0,2 μM versus 2 μM bei Yoon et al., 2002), sowie leicht unterschiedliche Inkubationszeiten eingehalten wurden; sie weist aber vor allen Dingen darauf hin, dass es sich bei einer möglichen Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch Selenit keinesfalls um ein allgemeingültiges Phänomen handelt.

Dies wird bestätigt durch Versuche zur Inkubation von HepG2-Zellen mit Selenit und der Analyse hinsichtlich eines Einflusses dieser Behandlung auf die Regulation eines transfizierten Promoter-Luciferasekonstrukts (6xDBE-luc), welches nur Bindestellen für FoxO-Transkriptionsfaktoren enthält. Auch hierbei zeigte sich nur durch Behandlung mit Insulin, nicht aber durch Selenit, eine über Akt und FoxO vermittelte Verringerung der Promoteraktivität (siehe Abb. 3.4). Untersuchungen mit einem Luciferase-Konstrukt für den Promoter von Selenoprotein P (SeP-luc), für welchen die Regulation über Akt und FoxO im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, bestätigten diese Ergebnisse (Abb. 3.5 B und 3.6). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Anwesenheit von Selenit per se Akt und FoxO beeinflusst.

Umgekehrt konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass der Akt/FoxO-Signalweg die Selenhomöostase durch Modulation der Sekretion von Selenoprotein P, dem Haupt-Plasmaprotein, reguliert.

4.2 Regulation von Selenoprotein P durch FoxO-Transkriptionsfaktoren

Da ein cDNA-Microarray erste Hinweise auf die Regulation von Selenoprotein P durch FoxO-Transkriptionsfaktoren gab (Tran et al., 2002), wurde diese Regulation im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

4.2.1 Beeinflussung des SeP-Promoters durch den Akt/FoxO-Signalweg

Die durchgeführten Untersuchungen am Selenoprotein P-Promoter zeigten, dass eine Überexpression von FoxO1a die Aktivität des Promoters um mehr als 400 % und die Überexpression der daueraktiven Mutante FoxO1a-TSS-Ala sogar um mehr als 1000 % steigert (s. Abb. 3.7). Die Behandlung mit Insulin führt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer ca. 50 %igen Abnahme der Promoteraktivität, wobei dieser Effekt im Falle der nicht auf Akt reagierenden FoxO1a-TSS-Ala-Mutante nicht auftritt. Behandlung mit Insulin führt bei der Mutante tendentiell sogar zu einer Steigerung der Promoteraktivität um etwa 10 % im Vergleich zur Kontrolle. Ähnliches wurde auch mit 6xDBE-luc (Abb. 3.4) beobachtet.

Zur weiteren Verifizierung des Effektes von Insulin kann durch Überexpression eines dauerhaft aktiven myr-Akt die Phosphorylierung und somit Deaktivierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren erfolgen. Dies resultiert in einer Abnahme der SeP-Promoteraktivität von fast 60 %, wobei gleichzeitige Inkubation mit Insulin diesen Effekt geringfügig verstärkt (Abb. 3.8). Dies lässt sich eventuell durch eine Aktivierung von endogenem Akt erklären. Der spezifische PI3K-Inhibitor LY294002 hebt zwar den Insulin-Effekt zur Hälfte auf, führt aber alleine schon zu einer minimalen Abnahme der Promoteraktivität. Dies steht im Kontrast zu den später besprochenen Ergebnissen aus Western-Blots auf SeP.

Durch Analyse des SeP-Promoters konnten zwei mögliche Bindestellen für FoxO-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Dabei befindet sich das erste an der Position –351 bis –344 (DBE1) und das zweite an der Position –115 bis –108 (DBE2) in unmittelbarer Nähe der TATA-Box, die als Signal zur Definition der Transkriptionsstartstelle dient.

Mutationen der beiden DBE führten zu einer Verringerung der durch Überexpression von FoxO1a hervorgerufenen Induktion des SeP-Promoters. Dabei war der Effekt einer Mutation von DBE1 zwar deutlich aber im Vergleich zu einer Mutation von DBE2 nur gering (s. Abb. 3.10 und 3.11). Obgleich Mutation von DBE1 auch einen deutlich abschwächenden Einfluss auf die durch FoxO1a induzierte Promoteraktivität hat, reicht die Mutation des DBE2 alleine schon aus, um die basale Promoteraktivität um 60 % zu senken. Dies ist ungefähr die Größenordnung, in welcher auch die Überexpression von myr-Akt Einfluss nimmt. Daraus lässt sich schließen, dass durch die Mutation einer einzelnen Base die Bindung von FoxO-Transkriptionsfaktoren aufgehoben ist. Dem widerspricht zum Teil, dass Insulin trotzdem deutlich die Promoteraktivität dieses sogenannten SeP-Mut2-luc-Konstrukts verringert (Abb. 3.11).

Dies lässt sich zum einen dadurch erklären, dass Insulin nicht ausschließlich über FoxO auf den SeP-Promoter wirkt (wie es von Schmoll et al. (2000) für den Promoter der Glucose 6-Phosphatase gezeigt wurde), sowie durch die Tatsache, dass DBE2 nur gut ein halbes Dutzend Basen von der TATA-Box entfernt ist und somit die Mutation noch weitere Proteine des Transkriptionsapparats beeinflussen könnte, was dann zu einer insgesamt reduzierten Transkription führte. Die Tatsache, dass DBE2 allerdings zwischen Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Hund, Rind) konserviert ist, während die 5'- und 3'-Nachbarschaft zu DBE2 stark variiert, spricht dafür, dass es sich bei den Effekten der Mutation von DBE2 um mehr als unspezifische Hemmung der Transkription handelt. Die Mutation von DBE1 und DBE2 zusammen zeigt nur noch eine geringe Reaktion auf die Behandlung mit Insulin oder die Überexpression von FoxO1a. Dass diese Effekte nicht komplett aufgehoben werden, könnte daran liegen, dass durch den Austausch einer einzelnen Base in einem DBE noch eine suboptimale Bindestelle und somit eine sehr geringe restliche Bindeaffinität von FoxO-Transkriptionsfaktoren zu dieser Sequenz besteht.

Interessanterweise hat eine verkürzte Variante des Selenoprotein P-Promoters, welcher das DBE1 fehlt und welche erst bei Base -234 beginnt, eine um 50 % höhere basale Aktivität. Dies lässt vermuten, dass in dem entfernten Abschnitt des Promoters, welcher von Base -1808 bis -235 geht, mehrere Repressorelemente vorhanden sind, an die Transkriptionsfaktoren binden können, welche die Transkription reduzieren. Da es sich bei DBE1 um ein in der Abwesenheit von Wachstumsfaktoren aktivierendes Element handelt, müssen dafür andere Sequenzen verantwortlich sein. Bisher wurde nur ein die SMAD-Transkriptionsfaktoren bindendes Element an der Position -1797 des SeP-Promoters näher untersucht (Mostert et al.,

2001). Dieses Element vermittelt die TGF-beta induzierte Repression der Promoteraktivität über SMAD 3 und 4 und spielt daher nur bei Entzündungsprozessen eine Rolle.

4.2.2 Regulation von SeP mRNA und Protein in Leberzellen

Die Ergebnisse für die Regulation von SeP-mRNA und -Protein decken sich mit denen, welche für den SeP-Promoter erhalten wurden. So werden die Spiegel sowohl von mRNA wie auch des Proteins in Überständen von HepG2-Zellen durch Behandlung mit Insulin abgeschwächt und durch Überexpression von FoxO1a angehoben. Für die Anwesenheit von Selenit zeigt sich bei der Analyse der mRNA, dass kein deutlicher Einfluss besteht. Für die Synthese des Proteins in HepG2-Zellen hingegen ist Selenit als Selenquelle notwendig.

Der spezifische PI3K-Inhibitor LY294002 sorgte dafür, dass bei Behandlung mit Insulin der Gehalt an SeP in den Überständen der Zellen nicht reduziert wurde. Gleichzeitig wurde durch Behandlung mit LY294002 die Proteinmenge von SeP in den Überständen sehr deutlich erhöht. Dies steht im Gegensatz zu den Experimenten auf Promoterebene, bei denen der Inhibitor die Promoteraktivität sogar minimal verringerte. Eine Erklärung besteht in der unterschiedlichen Behandlung der Zellen bei den Promoterversuchen: Hier werden die Zellen mit verschiedenen Plasmiden transfiziert und bis zur Lyse insgesamt für 42 h in serumfreiem Medium inkubiert.

4.2.3 Regulation von Selenoprotein P in Astrocytomzellen

Während die Leber als das Organ fungiert, welches den Hauptanteil des Selenoprotein P im Blutplasma liefert und dadurch andere Organe mit Selen versorgt, wird das Gehirn unabhängig von hepatischem SeP versorgt (Schweizer et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Astrocytomzellen, welche im Gehirn als Schutz und Versorger für Neuronen dienen, scheinbar eine andere Regulation für SeP als in der Leber vorliegt. In MOG-G-CCM-Astrocytomzellen liegt SeP intrazellulär in einer nicht glykosylierten Form vor, und die Expression findet unabhängig von externen Selenquellen auf einem konstanten Niveau statt (Steinbrenner et al., 2006a). Zwar konnte durch Inkubation mit den spezifischen PI3K-Inhibitoren eine sehr deutliche Steigerung der Proteinmenge in den Lysaten erreicht werden, dies fand aber auch ohne eine zusätzliche Selenquelle statt (s. Abb. 3.19 A).

Somit stellt sich die Frage, woher die Zellen das zusätzliche Selenit nehmen, um die deutlich größere Menge an SeP zu synthetisieren. Um dies zu verstehen, müsste untersucht werden, ob das detektierte SeP überhaupt die vermutete Menge an Selen enthält oder ob anstelle von Selenocystein doch andere Aminosäuren enthalten sind. Eine Verifizierung unter Einsatz von radioaktivem Selen, welches dann im Protein detektiert werden könnte, war jedoch außerhalb der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit. Seltsamerweise hat die Überexpression von FoxO1a keinen Einfluss auf die Proteinmenge von SeP (s. Abb. 3.19 B). Dies lässt sich bei dem FoxO1a-Wildtyp durch die in MOG-G-CCM-Zellen hohe basale Phosphorylierung von Akt erklären, wodurch der Transkriptionsfaktor deaktiviert wird. Für die daueraktive Mutante FoxO1a-TSS-Ala kann dies aber nicht der Fall sein, so dass es sich hier um eine andere PI3K-abhängige Regulation von SeP als in Hepatomzellen handeln könnte.

Die aus dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse über die Regulation von Selenoprotein P in Leberzellen sind schematisch in Abbildung 4.1 zusammengefasst.

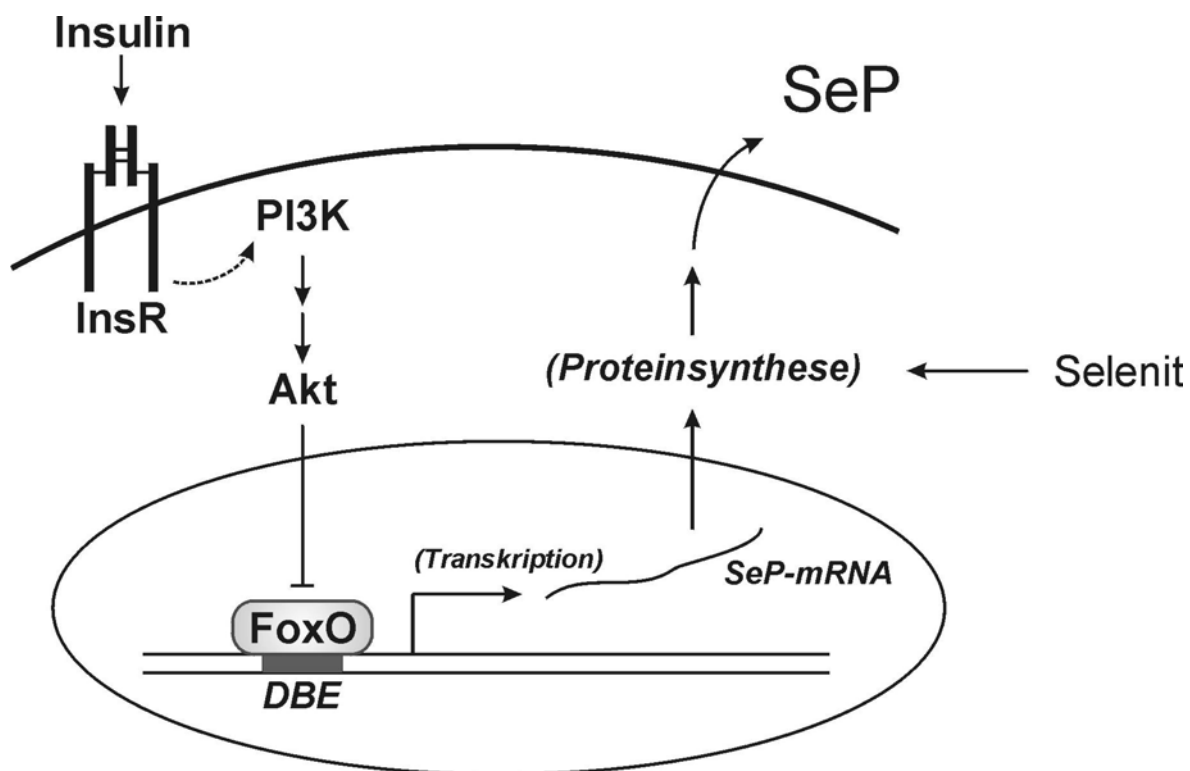


Abb. 4.1: Schema zur Regulation von Selenoprotein P über FoxO in HepG2-Zellen

Der Transkriptionsfaktor FoxO1a stimuliert die Expression von SeP auf Ebene der Transkription. Durch Phosphorylierung über die Ser/Thr-Kinase Akt wird FoxO1a deaktiviert. Dieser Effekt kann durch Behandlung mit Insulin PI3K-abhängig vermittelt werden. Abkürzungen: DBE, daf16-binding-element; InsR, Insulin-Rezeptor; PI3K, Phosphoinositid 3'-Kinase; SeP, Selenoprotein P

4.2.4 Konsequenzen der Regulation von SeP über Insulin in Leberzellen

Selenoprotein P erhöht den Schutz vor Oxidantien auf verschiedene Wegen. So befindet sich das erste Selenocystein im Molekül in einer Domäne, die eine Peroxidaseaktivität aufweist (Takebe et al., 2002). Des weiteren versorgt die Leber andere Gewebe mit SeP, wodurch in diesen z.B. die Aktivität der Glutathionperoxidase, welche verschiedene Peroxide reduziert, gesteigert wird (Steinbrenner et al., 2006a/b). Somit ist die Regulation dieses Proteins in der Leber von großer Bedeutung für den Schutz des Organismus vor Oxidantien.

Bisher sind mit MnSOD und Catalase zwei Enzyme mit antioxidativen Eigenschaften, welche über FoxO-Transkriptionsfaktoren reguliert werden, bekannt (Kops et al, 2002; Nemoto & Finkel, 2002). Im Gegensatz zu SeP handelt es sich hierbei um zwei intrazelluläre Enzyme, deren enzymatische Aktivität auf die Dismutation ihrer spezifischen Substrate Superoxid und Wasserstoffperoxid beschränkt ist. SeP wäre somit das dritte antioxidative Enzym, welches über FoxO reguliert wird. Dabei ist es aber zusätzlich im Blutplasma vorhanden und besitzt durch die Aktivierung anderer antioxidativer Selenoenzyme ein viel breiteres Substratspektrum.

Wie in der Einleitung besprochen, sind der Insulin-Signalweg und FoxO-Transkriptionsfaktoren von entscheidender Bedeutung für die Alterung von verschiedenen Organismen (Kenyon, 2005), wobei der Bekämpfung von oxidativem Stress eine entscheidende Rolle zukommt. Somit wäre es naheliegend, dass Selenoprotein P auch an diesen Effekten beteiligt ist. Neuere Studien zeigten, dass Überexpression des Hormons Klotho zu einer längeren Lebensdauer bei Mäusen führt (Kurosu et al., 2005). Klotho schwächte in Zellkulturstudien die Wirkung von Insulin ab, was zu einer FoxO-abhängigen Erhöhung der MnSOD-Expression führte (Yamamoto et al., 2005). Es wäre interessant zu untersuchen, ob durch Inkubation mit Klotho auch eine Induktion der SeP-Sekretion zu beobachten wäre.

Die Theorie der „caloric restriction“ die besagt, dass Einschränken der Nahrungsaufnahme eine lebensverlängernde Wirkung hat, steht im Zusammenhang mit der Tatsache, dass das Altern von Organismen über den Insulin-Signalweg reguliert wird. In diesem Sinne würden verringerte Insulinspiegel im Plasma zu einer verstärkten Aktivität von FoxO-

Transkriptionsfaktoren in insulin sensitiven Geweben führen, wodurch auch reaktive Sauerstoffspezies effektiver entfernt werden könnten. Es wäre interessant festzustellen, inwiefern sich der Glucose- und der Selengehalt in der Nahrung von Mäusen auf deren Lebensdauer auswirken. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass „caloric restriction“ in der Leber eher die Sensitivität auf Insulin erhöht. Entscheidend ist in dem Fall eher, dass der Knockout des Insulinrezeptors im Fettgewebe die Lebenserwartung erhöht und somit auch der Effekt von „caloric restriction“ wahrscheinlich zusätzlich über andere Organe ausgeübt wird, so dass es fraglich ist, ob die vorgeschlagene Diät bei Mäusen wirklich Einfluss auf den SeP-Gehalt im Plasma nehmen würde.

Eine andere Möglichkeit den Zusammenhang zwischen Insulin und Selenstoffwechsel zu untersuchen, wäre die Bestimmung des SeP-Gehalts im Blutplasma von Diabetikern. Diese sollten durch ein fehlendes Ansprechen auf Insulin nach Mahlzeiten höhere SeP-Konzentrationen im Blut haben als gesunde Menschen.

4.3 Kupfer und Zink zeigen insulinmimetische Effekte

Nachdem in unserer Arbeitsgruppe bereits bei verschiedenen Zelltypen gezeigt werden konnte, dass Kupferionen den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren (Ostrakhovitch et al., 2002), wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob dieser Effekt auch in Hepatom- und Astrocytomzellen zu beobachten ist. Des weiteren sollte untersucht werden, ob FoxO-Proteine und die Promotoren von FoxO-Zielgenen über diesen Signalweg beeinflusst werden.

So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl in HepG2-, wie auch in MOG-G-CCM-Zellen, der PI3K/Akt-Signalweg durch Kupfer- und Zinkionen in HBSS aktiviert wird. Dies konnte auch für verschiedene Substrate von Akt gezeigt werden. Dabei wurden die FoxO-Transkriptionsfaktoren näher betrachtet, und es zeigte sich, dass diese nicht nur durch Kupfer und Zink phosphoryliert wurden, sondern dass FoxO1a auch eine schnelle Translokation ins Cytoplasma zeigte. Dieser Effekt war vergleichbar mit dem von Insulin und wurde durch die nicht auf Akt sensitive Mutante FoxO1a-TSS-Ala aufgehoben. Somit zeigen Kupfer und Zink insulinmimetische Effekte auf FoxO-Transkriptionsfaktoren.

Weitere Untersuchungen wurden mit einem Promoterkonstrukt des FoxO-Zielgens Glucose 6-Phosphatase (G6Pase) durchgeführt. G6Pase ist ein typisches Enzym der Leber, da es den abschließenden Schritt der Gluconeogenese katalysiert. Es zeigte sich, dass Kupferionen den gleichen inhibierenden Effekt wie Insulin auf den G6Pase-Promoter haben, dieser aber im Gegensatz zu Insulin nicht über den spezifischen PI3K-Inhibitor aufgehoben werden konnte. Dies zeigt, dass Kupferionen scheinbar auch PI3K-unabhängig einen Signalweg aktivieren, welcher die Aktivität des G6Pase-Promoters senkt.

Es ist bekannt, dass Kupferionen durch Aminosäuren komplexiert werden können. Dies geschieht zum Beispiel durch das Gly-Gly-His-Motiv, welches auch in Proteinen, wie dem Prion-Protein (Garnett & Viles, 2003), an der Komplexierung von Kupferionen beteiligt ist. Wir untersuchten in diesem Zusammenhang, welchen Einfluss ein Gly-Gly-His-Tripeptid (GGH) auf die Phosphorylierung von Akt durch Kupferionen ausübt. Dabei zeigte sich, dass ein 1:1 Komplex von Kupferionen und GGH die durch Kupferionen erzeugte starke Phosphorylierung von Akt nahezu komplett auslöscht. Bei einem doppelten Überschuss an Kupferionen zeigte sich wieder eine starke Phosphorylierung von Akt. Dies lässt vermuten, dass Kupferionen durch die Bildung eines 1:1-Komplexes mit GGH Akt nicht mehr aktivieren können. Ein Verhältnis von einem Kupferion zu zwei GGH-Molekülen im Komplex kann ausgeschlossen werden, da bei je 25 μM Kupferionen und GGH die dann „freien“ 12,5 μM Kupferionen immer noch für eine starke Phosphorylierung von Akt ausreichen würden.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht geklärt, wie der PI3K/Akt-Signalweg überhaupt von Kupferionen aktiviert wird. Bisher konnte nur die Beteiligung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) ausgeschlossen werden (Ostrakhovitch et al., 2002). Interessanterweise konnte in DMEM auch keine Aktivierung von Akt durch die ansonsten benutzten Konzentrationen von 10-100 μM Kupfersulfat gesehen werden. Erst durch deutliche höhere Konzentrationen (500 μM) lässt sich eine Phosphorylierung von Akt beobachten. Dies kann auch in diesem Fall an der Komplexierung von Kupferionen durch im Medium vorhandene Aminosäuren erklärt werden.

Die Verringerung der Aktivität des G6Pase-Promoters durch Inkubation mit Kupferionen erfolgte sowohl in HBSS, wie auch in DMEM, und damit unabhängig von der Aktivierung von Akt. Zusätzlich zum PI3K-Inhibitor Wortmannin konnte auch die nicht durch Akt phosphorylierbare Mutante FoxO1a-TSS-Ala nicht den Effekt von Kupfersulfat aufheben.

Alle diese Effekte zeigen, dass Kupfersulfat die Transkription der G6Pase unabhängig von dem PI3K/Akt/FoxO-Signalweg reguliert. Kupferionen regulieren somit die Promoteraktivität der G6Pase über einen anderen Signalweg. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass der G6Pase-Promoter im Allgemeinen auch über cAMP (Schmoll et al., 1999), den MEK/ERK-Signalweg (Schmoll et al., 2001) und über den Transkriptionsfaktor NFkappaB (Grempler et al., 2004) reguliert werden kann.

Auch der in dieser Arbeit als FoxO-Zielgen identifizierte SeP-Promoter reagierte auf eine Behandlung mit Kupfer mit einer deutlichen Abschwächung der Aktivität. Dabei war erstaunlich, dass mit nur 2,5 μ M Kupfersulfat eine stärkere Inhibition erreicht wurde als mit 5 μ M Kupfersulfat. Da andere getestete Promotoren auch immer mit einer Verringerung der Aktivität nach Behandlung mit Kupfersulfat reagierten (ohne Abbildung), stellte sich die Frage, ob Kupferionen allgemein inhibierend auf die Luciferasekonstrukte wirken. Dies wird allerdings durch Versuche einer anderen Gruppe am Selenoprotein W-Promoter widerlegt, da hierbei eine Behandlung mit Kupfer zu einer Steigerung der Promoteraktivität führt (Amantana et al., 2002). Erste Versuche zeigten, dass durch Behandlung mit Kupferionen auch mRNA und Protein des Selenoprotein P verringert werden (ohne Abbildung), was den Ergebnissen aus den Promoterversuchen entspricht.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen Kupfer- und Selenhomöostase über die Regulation von SeP durch Kupferionen nachgewiesen werden. Obwohl Kupfer insulinmimetische Effekte besitzt, erfolgt die Regulation von SeP durch Kupfer aber scheinbar unabhängig von Akt.

5. Zusammenfassung

Der Akt/FoxO-Signalweg reguliert in menschlichen Zellen das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose. Durch FoxO-Transkriptionsfaktoren induzierte Stimulation der Synthese antioxidativer Enzyme sorgt dabei für einen Schutz der Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies, die zur oxidativen Schädigung von Biomolekülen führen und somit Zelltod oder Karzinogenese Vorschub leisten können. Die Identifizierung neuer Zielgene sowie bisher unbekannter Stimuli zur Aktivierung dieses Signalweges sind daher von großem Interesse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit dem Gen des Selenoproteins P ein neues Zielgen des Akt/FoxO-Signalweges identifiziert werden. Selenoprotein P ist ein Protein, welches sowohl für den Selentransport aus der Leber in extrahepatische Gewebe verantwortlich ist, als auch selber antioxidative Eigenschaften besitzt. Es wurde auf Ebene der Promoteraktivität, der Transkription sowie auf Proteinebene nachgewiesen, dass der Transkriptionsfaktor FoxO1a die Biosynthese von Selenoprotein P in Leberzellen stimuliert. Dabei wurden im Selenoprotein P-Promoter zwei FoxO-bindende Elemente identifiziert und deren Einfluss auf die Promoter-Aktivität analysiert. Es konnte auch gezeigt werden, dass in Leberzellen die Produktion von Selenoprotein P durch Insulin, welches durch Aktivierung von Akt zur Hemmung der transkriptionellen Aktivität von FoxO1a führt, stark abgeschwächt wird. Diese Daten sprechen für eine Verknüpfung des Insulinstoffwechsels mit der Selenhomöostase über die Regulation der Produktion von Selenoprotein P durch die Leber.

Die Versorgung des Gehirns mit Selen erfolgt unabhängig von der Leber. In humanen Astrocytomzellen konnte eine Regulation der Produktion von Selenoprotein P über die Phosphoinositid 3'-Kinase (PI3K) festgestellt werden, wobei im Unterschied zur Leber FoxO1a nicht beteiligt zu sein scheint.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem nachgewiesen, dass Behandlung von Hepatom- oder Astrocytomzellen mit Cu^{2+} oder mit Zn^{2+} zur Aktivierung von Akt über PI3K führt. Sowohl Kupfer- als auch Zinkionen haben somit insulinmimetische Wirkung. Entsprechend führte Inkubation von Hepatomzellen mit Cu^{2+} oder Zn^{2+} zur Inaktivierung von FoxO1a. In Übereinstimmung damit führte Inkubation von Hepatomzellen mit Cu^{2+} zu einer Abschwächung von Promoteraktivitäten des als FoxO-Zielgen bekannten Gens der Glucose 6-Phosphatase und des hier als Zielgen nachgewiesenen Gens des Selenoproteins P. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese negative Regulation FoxO-responsiver Promotoren durch Cu^{2+} auch unabhängig von PI3K und Akt erfolgt. Die Regulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Kupferionen und die Modulation der Expression des im Selenstoffwechsel zentralen Selenoproteins P durch FoxO1a legen einen Zusammenhang zwischen Kupfer- und Selenhomöostase nahe.

6.Literatur

Akesson B, Bellew T, Burk RF (1994)

Purification of selenoprotein P from human plasma
Biochim. Biophys. Acta **1204**: 243-249

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996a)

Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1
EMBO J. **15**: 6541-6551

Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P (1996b)

Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase
FEBS Lett. **399**: 333-338

Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M (1997)

3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase
Curr. Biol. **7**: 776-789

Amantana A, Vorachek WR, Butler JA, Costa ND, Whanger PD (2002)

Effect of copper, zinc and cadmium on the promoter of selenoprotein W in glial and myoblast cells
J. Inorg. Biochem. **91**: 356-362

Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC (1998)

Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily
Genomics **47**: 187-199

Balendran A, Casamayor A, Deak M, Paterson A, Gaffney P, Currie R, Downes CP, Alessi DR (1999)

PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2
Curr. Biol. **9**: 393-404

Barthel A, Schmoll D, Krüger KD, Bahrenberg G, Walther R, Roth RA, Joost HG (2001)

Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **285**: 897-902

Biggs WH 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. (1999)

Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 7421-7426

Biggs WH 3rd, Cavenee WK, Arden KC (2001)

Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse
Mamm. Genome **12**: 416-425

Blain SW, Massague J. (2002)

Breast cancer banishes p27 from nucleus
Nat. Med. **8**: 1076-1078

Bluher M, Kahn BB, Kahn CR (2003)

Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue
Science **299**: 572-574

Brigelius-Flohé R (1999)

Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases
Free Radic. Biol. Med. **27**: 951-965

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999)

Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor
Cell **96**: 857-868

Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB (2002)

14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport
J. Cell Biol. **156**: 817-828

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004)

Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase
Science **303**: 2011-2015

Burgering BM (2006)

FoxO transcription factors and the control of oxidative stress
[DOI:10.1240/sav_gbm_2006_m_001578]

Burk RF, Hill KE (1994)

Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein
J. Nutr. **124**: 1891-1897

Burk RF, Hill KE, Awad JA, Morrow JD, Kato T, Cockell KA, Lyons PR (1995)

Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P
Hepatology **21**: 561-569

Burk RF, Hill KE, Motley AK, Hu M, Austin LM (2004)

Deletion of selenoprotein P disrupts selenium homeostasis in the mouse
FASEB J. **18**: A849

Burk RF, Hill KE (2005)

Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis
Annu. Rev. Nutr. **25**: 215-235

Cantley LC (2002)

The phosphoinositide 3-kinase pathway
Science **296**: 1655-1657

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998)

Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation
Science **282**: 1318-1321

Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA (2003)

Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a
Science **301**: 215-218

Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR (1986)

The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA
EMBO J. **5**: 1221-1227

Clancy DJ, Gems D, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L (2002)

Dietary restriction in long-lived dwarf flies
Science **296**: 319

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995)

Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B
Nature **378**: 785-789

Cryns V, Yuan J (1998)

Proteases to die for
Genes Dev. **12**: 1551-1570

Damen JE, Liu L, Rosten P, Humphries RK, Jefferson AB, Majerus PW, Krystal G (1996)

The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 1689-1693

Datta K, Franke TF, Chan TO, Makris A, Yang SI, Kaplan DR, Morrison DK, Golemis EA, Tschlis PN (1995)

AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation.
Mol. Cell. Biol. **15**: 2304-2310

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997)

Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery
Cell **91**: 231-241

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999)

Cellular survival: a play in three Akts
Genes Dev. **13**: 2905-2927

Desurmont M (1983)

Carcinogenic effect of metals
Sem. Hop. **59**: 2097-2099

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998)

Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization
Genes Dev. **12**: 3499-3511

Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2000)

Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1
Curr. Biol. **10**: 1201-1204

Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, Coffe PJ (2002)

FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity
J. Cell. Biol. **156**: 531-542

Dreher I, Jakobs TC, Köhrle J (1997)

Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. Response of selenoprotein P expression to cytokines in liver cells
J. Biol. Chem. **272**: 29364-29371

Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, Burgering BM (2004)

FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK
EMBO J. **23**: 4802-4812

Fagegaltier D, Hubert N, Yamada K, Mizutani T, Carbon P, Krol A (2000)

Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation
EMBO J. **19**: 4796-4805

Flohé L, Günzler WA, Schock HH (1973)

Glutathione peroxidase: a selenoenzyme
FEBS Lett. **32**: 132-134.

Frescas D, Valenti L, Accili D (2005)

Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes
J. Biol. Chem. **280**: 20589-20595

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC (1998)

Phosphoinositide kinases
Annu. Rev. Biochem. **67**: 481-507

Fukuoka M, Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Umemura S, Fukamizu A (2003)

Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation
Int. J. Mol. Med. **12**: 503-508

Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N (2002)

FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress
J. Biol. Chem. **277**: 26729-26732

Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N (2000)

Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues
Biochem. J. **349**: 629-634

Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, Hisatsune H, Nishikawa S, Nakayama K, Nakayama K, Ikeda K, Motoyama N, Mori N (2004)

Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice
J. Biol. Chem. **279**: 34741-34749

Garnett AP, Viles JH (2003)

Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism
J. Biol. Chem. **278**: 6795-6802

Giannakou ME, Goss M, Junger MA, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L (2004)

Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body
Science **305**: 361

Green DR, Reed JC (1998)

Mitochondria and apoptosis
Science **281**: 1309-1312

Greer EL, Brunet A (2005)

FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression
Oncogene **24**: 7410-7425

Grempler R, Kienitz A, Werner T, Meyer M, Barthel A, Ailett F, Sutherland C, Walther R, Schmoll D (2004)

Tumor necrosis factor alpha decreases glucose-6-phosphatase gene expression by activation of nuclear factor kappaB
Biochem. J. **382**: 471-479

Gromer S, Eubel JK, Lee BL, Jacob J (2005)

Human selenoproteins at a glance
Cell. Mol. Life Sci. **62**: 2414-2437

Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T (1999)

Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence
J. Biol. Chem. **274**: 17184-17192

Henderson ST, Johnson TE (2001)

daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*
Curr. Biol. **11**: 1975-1980

Herrman JL (1977)

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

Hill KE, Lloyd RS, Yang JG, Read R, Burk RF (1991)

The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame
J. Biol. Chem. **266**: 10050-10053

Hill KE, Lloyd RS, Burk RF (1993)

Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein P mRNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 537-541

Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Atkins JF, Gesteland RF, Burk RF (2003)

Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse
J. Biol. Chem. **278**: 13640-13646

Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Burk RF (2004)

Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene
J. Nutr. **134**: 157-161

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003)

IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice
Nature **421**: 182-187

Honda Y, Honda S (1999)

The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*
FASEB J. **13**: 1385-1393

Hosaka T, Biggs WH 3rd, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK, Arden KC (2004)

Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**: 2975-2980

Hribal ML, Nakae J, Kitamura T, Shutter JR, Accili D (2003)

Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors
J. Cell. Biol. **162**: 535-541

Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM, Tindall DJ (2005)

Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**: 1649-1654

Hwangbo DS, Gershman B, Tu MP, Palmer M, Tatar M (2004)

Drosophila dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body
Nature **429**: 562-566

Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000)

Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase
Nature **403**: 795-800

Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP (2003)

FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics
J. Biol. Chem. **278**: 35959-35967

Johnson TE (1990)

Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging
Science **249**: 908-912

Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000)

Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors
Genes Dev. **14**: 142-146

Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993)

A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type
Nature **366**: 461-464

Kenyon C (2005)

The plasticity of aging: insights from long-lived mutants
Cell **120**: 449-460

Kim S, Jung Y, Kim D, Koh H, Chung J (2000)

Extracellular zinc activates p70 S6 kinase through the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway
J. Biol. Chem. **275**: 25979-25984

Klotz LO, Schieke SM, Sies H, Holbrook NJ (2000)

Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts.
Biochem. J. **352**: 219-225

Klotz LO, Kröncke KD, Buchczyk DP, Sies H (2003)

Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress
J. Nutr. **133**: 1448-1451

Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G (2002)

Pten signaling in gliomas
Neuro-oncol. **4**: 196-211

Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM (1999)

Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B
Nature **398**: 630-634

Kops GJ, Medema RH, Glassford J, Essers MA, Dijkers PF, Coffe PJ, Lam EW, Burgering BM (2002a)

Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors
Mol. Cell. Biol. **22**: 2025-2036

Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffe PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM (2002b)

Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress
Nature **419**: 316-321

Kryukov GV, Gladyshev VN (2000)

Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity of selenoprotein genes and expression of a protein containing 17 selenocysteine residues
Genes Cells. **5**: 1049-1060

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN (2003)

Characterization of mammalian selenoproteomes
Science **300**: 1439-1443

Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI (1997)

Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing
Nature **390**: 45-51

Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M (2005)

Suppression of aging in mice by the hormone Klotho
Science **309**: 1829-1833

Laemmli, UK (1970)

Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227**: 680-685

Lee BJ, Worland PJ, Davis JN, Stadtman TC, Hatfield DL (1989)

Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA

J. Biol. Chem. **264**: 9724-9727

Lee SS, Kennedy S, Tolonen AC, Ruvkun G (2003a)

DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism

Science **300**: 644-647

Lee YC, Tang YC, Chen YH, Wong CM, Tsou AP (2003b)

Selenite-induced survival of HuH7 hepatoma cells involves activation of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway and Rac1

J. Biol. Chem. **278**: 39615-39624

Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS (2003)

Fox's in development and disease

Trends Genet. **19**: 339-344

Leonard SS, Harris GK, Shi X (2004)

Metal-induced oxidative stress and signal transduction

Free Radic. Biol. Med. **37**: 1921-1942

Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM (2002)

PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest

Nat. Med. **8**: 1153-1160

Liang J, Slingerland JM (2003)

Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression.

Cell Cycle **2**: 339-345

Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C (1997)

daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*

Science **278**: 1319-1322

Lobanov AV, Delgado C, Rahlfs S, Novoselov SV, Kryukov GV, Gromer S, Hatfield DL, Becker K, Gladyshev VN (2006)

The Plasmodium selenoproteome

Nucleic Acids Res. **34**: 496-505

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951)

Protein measurement with the Folin phenol reagent

J. Biol. Chem. **193**: 265-275

Ma S, Hill KE, Caprioli RM, Burk RF (2002)

Mass spectrometric characterization of full-length rat selenoprotein P and three isoforms shortened at the C terminus. Evidence that three UGA codons in the mRNA open reading frame have alternative functions of specifying selenocysteine insertion or translation termination

J. Biol. Chem. **277**: 12749-12754

Ma S, Hill KE, Burk RF, Caprioli RM (2003)

Mass spectrometric identification of N- and O-glycosylation sites of full-length rat selenoprotein P and determination of selenide-sulfide and disulfide linkages in the shortest isoform

Biochemistry **42**: 9703-9711

Martin-Romero FJ, Kryukov GV, Lobanov AV, Carlson BA, Lee BJ, Gladyshev VN, Hatfield DL (2001)

Selenium metabolism in *Drosophila*: selenoproteins, selenoprotein mRNA expression, fertility, and mortality

J. Biol. Chem. **276**: 29798-29804

Marygold SJ, Leever SJ (2002)

Growth signaling: TSC takes its place

Curr. Biol. **12**: 785-787

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM (2000)

AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1

Nature **404**: 782-787

Mercurio F, Manning AM (1999)

Multiple signals converging on NF-kappaB

Curr. Opin. Cell Biol. **11**: 226-232

Modur V, Nagarajan R, Evers BM, Milbrandt J (2002)

FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer

J. Biol. Chem. **277**: 47928-47937

Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1996)

A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*

Nature **382**: 536-539

Mostert V, Lombeck I, Abel J (1998)

A novel method for the purification of selenoprotein P from human plasma

Arch. Biochem. Biophys. **357**: 326-330

Mostert V, Dreher I, Köhrle J, Abel J. (1999)

Transforming growth factor-beta1 inhibits expression of selenoprotein P in cultured human liver cells

FEBS Lett. **460**: 23-26

Mostert V, Wolff S, Dreher I, Köhrle J, Abel J (2001)

Identification of an element within the promoter of human selenoprotein P responsive to transforming growth factor-beta

Eur. J. Biochem. **268**: 6176-6181

Motsenbocker MA, Tappel AL (1982)

A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma

Biochim. Biophys. Acta **719**: 147-153

Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L (2004)

Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors

Cell **116**: 551-563

Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS (1996)

Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine

Cell **84**: 889-897

Mustacich D, Powis G (2000)

Thioredoxin reductase
Biochem. J. **346**: 1-8

Nakae J, Park BC, Accili D (1999)

Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway
J. Biol. Chem. **274**: 15982-15985

Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D (2001)

The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression
J. Clin. Invest. **108**: 1359-1367

Nakae J, Biggs WH 3rd, Kitamura T, Cavenee WK, Wright CV, Arden KC, Accili D. (2002)

Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1
Nat. Genet. **32**: 245-253

Nemoto S, Finkel T (2002)

Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway
Science **295**: 2450-2452

Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1997)

The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*
Nature **389**: 994-999

Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA (2005)

JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**: 4494-4499

Orth HM, Krüger KD, Schmoll D, Grempler R, Scherbaum WA, Joost HG, Bornstein SR, Barthel A (2004)

Cellular models for the analysis of signaling by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR (Foxo1a)
Regul. Pept. **121**: 19-24

Ostrakhovitch EA, Lordnejad MR, Schliess F, Sies H, Klotz LO (2002)

Copper ions strongly activate the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway independent of the generation of reactive oxygen species
Arch. Biochem. Biophys. **397**: 232-239

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB (1999)

NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase
Nature **401**: 82-85

Plas DR, Thompson CB (2003)

Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome
J. Biol. Chem. **278**: 12361-12366

Potente M, Urbich C, Sasaki K, Hofmann WK, Heeschen C, Aicher A, Kollipara R, DePinho RA, Zeiher AM, Dimmeler S (2005)

Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization
J. Clin. Invest. **115**: 2382-2392

Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR (2002)

A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR.
Cancer Cell **2**: 81-91

Read R, Bellew T, Yang JG, Hill KE, Palmer IS, Burk RF (1990)

Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum
J. Biol. Chem. **265**: 17899-17905

Reed JC (1998)

Bcl-2 family proteins
Oncogene **17**: 3225-3236

Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P (1999)

Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B
J. Biol. Chem. **274**: 17179-17183

Rena G, Prescott AR, Guo S, Cohen P, Unterman TG (2001)

Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting
Biochem. J. **354**: 605-612

Rena G, Woods YL, Prescott AR, Peggie M, Unterman TG, Williams MR, Cohen P (2002)

Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion
EMBO J. **21**: 2263-2271

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973)

Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase
Science **179**: 588-590

Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E, Takahashi K (1999)

Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p
J. Biol. Chem. **274**: 2866-2871

Saito Y, Sato N, Hirashima M, Takebe G, Nagasawa S, Takahashi K (2004)

Domain structure of bi-functional selenoprotein P
Biochem. J. **381**: 841-846

Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989)

Molecular cloning: A laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Samet JM, Graves LM, Quay J, Dailey LA, Devlin RB, Ghio AJ, Wu W, Bromberg PA, Reed W (1998)

Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals
Am. J. Physiol. **275**: 551-558

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2004)

Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy
Cell **117**: 399-412

Schieke SM, Briviba K, Klotz LO, Sies H (1999)

Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation
FEBS Lett. **448**: 301-303

Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompaker R, Kops GJ, Lam EW, Burgering BM, Medema RH (2002)

Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D
Mol. Cell. Biol. **22**: 7842-7852

Schmoll D, Wasner C, Hinds CJ, Allan BB, Walther R, Burchell A (1999)

Identification of a cAMP response element within the glucose- 6-phosphatase hydrolytic subunit gene promoter which is involved in the transcriptional regulation by cAMP and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells
Biochem. J. **338**: 457-463

Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, Walther R, Unterman TG (2000)

Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity
J. Biol. Chem. **275**: 36324-36333

Schmoll D, Grempler R, Barthel A, Joost HG, Walther R (2001)

Phorbol ester-induced activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal-regulated kinase kinase and extracellular-signal-regulated protein kinase decreases glucose-6-phosphatase gene expression
Biochem. J. **357**: 867-873

Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohé L, Sendtner M, Köhrle J (2003)

Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues
Biochem. J. **370**: 397-402

Schwarz K, Foltz CM (1958)

Factor 3 activity of selenium compounds
J. Biol. Chem. **233**: 245-251

Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE (2004)

Selenium and brain function: a poorly recognized liaison
Brain Res. Brain Res. Rev. **45**: 164-178

Schweizer U, Streckfuss F, Pelt P, Carlson BA, Hatfield DL, Köhrle J, Schomburg L (2005)

Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply
Biochem. J. **386**: 221-226

Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR (2000)

Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability
Genes Dev. **14**: 2501-2514.

Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massague J (2004)

Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation
Cell **117**: 211-223

Sies H, Arteel GE (2000)

Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics
Free Radic. Biol. Med. **28**: 1451-1455

Srinivasan G, James CM, Krzycki JA (2002)

Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA
Science **296**: 1459-1462

Stadtman ER (2004)

Role of oxidant species in aging
Curr. Med. Chem. **11**: 1105-1112

Steinbrenner H, Alili L, Bilgic E, Sies H, Brenneisen P (2006 a)

Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage
Free Radic. Biol. Med. **40**: 1513-1523

Steinbrenner H, Bilgic E, Alili L, Sies H, Brenneisen P (2006 b)

Selenoprotein P protects human endothelial cells from oxidative stress-induced cell death by induction of glutathione peroxidase
Free Radic. Res. (in revision)

Steinert P, Bachner D, Flohé L (1998)

Analysis of the mouse selenoprotein P gene
Biol. Chem. **379**: 683-691

Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ (2004)

The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors
Mol. Cell **14**: 395-403

Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y (2005)

JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3
J. Cell Biol. **170**: 295-304

Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi K (2002)

A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P
J. Biol. Chem. **277**: 41254-41258

Tang TT, Dowbenko D, Jackson A, Toney L, Lewin DA, Dent AL, Lasky LA (2002)

The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor
J. Biol. Chem. **277**: 14255-14265

Taskov K, Chapple C, Kryukov GV, Castellano S, Lobanov AV, Korotkov KV, Guigo R, Gladyshev VN (2005)

Nematode selenoproteome: the use of the selenocysteine insertion system to decode one codon in an animal genome?
Nucleic Acids Res. **33**: 2227-2238

Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS (2001)

A mutant Drosophila insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function
Science **292**: 107-110

Tatar M, Bartke A, Antebi A (2003)

The endocrine regulation of aging by insulin-like signals
Science **299**: 1346-1351

Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ Jr, DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME (2002)

DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein
Science **296**: 530-534

Traulsen H, Steinbrenner H, Buchczyk DP, Klotz LO, Sies H (2004)

Selenoprotein P protects low-density lipoprotein against oxidation
Free Radic. Res. **38**: 123-128

Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka K, Masuyama N, Gotoh Y (2004)

JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins
EMBO J. **23**: 1889-1899

van der Horst A, Tertoolen LG, de Vries-Smits LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM (2004)

FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1)
J. Biol. Chem. **279**: 28873-28879

Vivanco I, Sawyers CL (2002)

The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer
Nat. Rev. Cancer **2**: 489-501

Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ (1998)

The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival
Biochem. J. **333**: 291-300

Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC (1999)

Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD
Science **284**: 339-343

Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ (2000)

Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival
J. Biol. Chem. **275**: 14624-14631

Witkiewicz-Kucharczyk A, Bal W (2006)

Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis
Toxicol. Lett. **162**: 29-42

Wu W, Graves LM, Jaspers I, Devlin RB, Reed W, Samet JM (1999)

Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals
Am. J. Physiol. **277**: 924-931

Wu W, Wang X, Zhang W, Reed W, Samet JM, Whang YE, Ghio AJ (2003)

Zinc-induced PTEN protein degradation through the proteasome pathway in human airway epithelial cells
J. Biol. Chem. **278**: 28258-28263

Xuan Z, Zhang MQ (2005)

From worm to human: bioinformatics approaches to identify FOXO target genes
Mech. Ageing Dev. **126**: 209-215

Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M (2005)

Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho
J. Biol. Chem. **280**: 38029-38034

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995)

Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death
Cell **80**: 285-291

Yang L, Xie S, Jamaluddin MS, Altuwaijri S, Ni J, Kim E, Chen YT, Hu YC, Wang L, Chuang KH, Wu CT, Chang C (2005)

Induction of androgen receptor expression by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt downstream substrate, FOXO3a, and their roles in apoptosis of LNCaP prostate cancer cells
J. Biol. Chem. **280**: 33558-33565

Yeagley D, Guo S, Unterman T, Quinn PG (2001)

Gene- and activation-specific mechanisms for insulin inhibition of basal and glucocorticoid-induced insulin-like growth factor binding protein-1 and phosphoenolpyruvate carboxykinase transcription. Roles of forkhead and insulin response sequences
J. Biol. Chem. **276**: 33705-33710

Yoon SO, Park SJ, Chung AS (2002)

Selenite inhibits apoptosis via activation of the PI3-K/Akt pathway
Ann. N. Y. Acad. Sci. **973**: 221-223

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002)

Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression
Free Radic. Biol. Med. **33**: 337-349

Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powell DR, Le J, Klotsas A, Matika R, Xiao X, Franks R, Heidenreich KA, Sajan MP, Farese RV, Stolz DB, Tso P, Koo SH, Montminy M, Unterman TG (2006)

FoxO1 Regulates Multiple Metabolic Pathways in the Liver: Effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression
J. Biol. Chem. **281**: 10105-10117

Zhao X, Gan L, Pan H, Kan D, Majeski M, Adam SA, Unterman TG (2004)

Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms
Biochem. J. **378**: 839-849

Zheng WH, Kar S, Quirion R (2000)

Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells
J. Biol. Chem. **275**: 39152-39158

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC (2001)

Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells
Nat. Cell Biol. **3**: 245-252

Danksagung

Herrn PD Dr. Lars-Oliver Klotz danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, dem mir entgegengebrachten Vertrauen, sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein sehr großes Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Christian Ganter danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Dr. Helmut Sies danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut, sowie sein Interesse an meinen Ergebnissen.

Bei Herrn PD Dr. Andreas Barthel (Medizinische Klinik I, BG Kliniken Bergmannsheil, Ruhr-Universität, Bochum) bedanke ich mich für die gute Kooperation.

Dr. Holger Steinbrenner danke ich für die kompetente Einführung in die Selenoprotein-Thematik und die stete Hilfsbereitschaft bei allen meinen Fragen.

Bei den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Klotz möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, interessante Diskussionen und Geduld bei Laborfragen bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinen Labornachbarn Lirija Alili, Dr. Claudia von Montfort, Dr. Juliane Beier, Dr. Stefanie Galban und Friedi Döpp für die nette Atmosphäre im Labor und die gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Peter Brenneisen, Dr. Dominik Stuhlmann, Bahar Cat, Dragana Mitic und den anderen Mitgliedern der AG Brenneisen danke ich für die Hilfe bei vielen Kleinigkeiten und die „Adoption“ bei Gruppenfeiern.

Bei Andrea Borchardt und Elisabeth Sauerbier möchte ich mich für die Einführung in die Zellkultur, Hilfestellung bei den alltäglichen Problemen im Labor und die Organisation unseres wöchentlichen Seminars bedanken.

Yasemin Ince, Dr. Niloofar Ale-Agha und Anne Kiene möchte ich besonders für die Motivationshilfe gegen Ende der Arbeit danken.

Marlies Scholtes möchte ich für die Unterstützung bei allen organisatorischen Fragen danken und Thomas Becher für seine Hilfe bei Computerproblemen und der Bewältigung der Datenmengen.

Des weiteren bedanke ich mich bei allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Lehrstuhls für ihre ständige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt Alya, da sie mir den nötigen Halt gab und mich unermüdlich motivierte. Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die für mich auch in schwierigen Situationen Verständnis zeigten und mich unterstützten.

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

Düsseldorf, den 03.05.2006

(Philippe Walter)