

Aus dem Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung

an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leitung: Univ.-Prof. Dr. Jean Krutmann

**Modulation der Wirkung von FoxO-Transkriptionsfaktoren auf
Promotoren von FoxO-Zielgenen:
Einfluss antidiabetischer Pharmaka**

Dissertation

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

Andreas Dormann

2015

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

gez.:

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

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Lars-Oliver Klotz

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Stahl

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AFX	<i>ALL1-fused-gene from chromosome-X</i>
APC	Adenomatosis polyposis coli
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BIM	<i>Bcl2 interacting mediator of cell death</i>
bNIP3	<i>Bcl-2/adenovirus E1B19 kDa interacting protein 3</i>
CK1 α	Casein Kinase 1 α
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
Crm1	<i>Chromosome region maintenance 1</i>
DAF-16	<i>Abnormal dauer formation 16</i>
DBD	<i>DNA-binding-domain</i>
DBE	<i>DAF-16 family member-binding-element</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dsh	<i>dishellved</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FKHR	<i>forkhead in rhabdomyosarcoma</i>
FKHRL1	<i>forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1</i>
Fox	<i>forkhead box</i>
FoxO	<i>forkhead Box Gruppe O</i>
Fz	<i>frizzled</i>
G6Pase	Glucose-6-Phosphatase
GADD45	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein 45</i>
GLUT4	Glukosetransporter 4
GSK3	Glykogensynthasekinase 3
HDAC	Histon-Deacetylase

HepG2	Humane Hepatomzellen G2
HODE	<i>9-hydroxy and 13-hydroxy octadecadienoic acids</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HuH7	Humane Hepatomzellen H7
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor I</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IRS 1/2	Insulin-Rezeptor-Substrat 1/2
JNK	C-Jun- N-terminale Kinasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LiCl	Lithiumchlorid
LRP5/6-Rezeptor	<i>LDL receptor-related protein 5 or 6</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein Kinase</i>
MDM2	<i>murine double minute 2</i>
MLL-Gen	<i>myeloid/lymphoid</i>
MnSOD	Mangansuperoxid-Dismutase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NaCl	Natriumchlorid
NES	<i>nuclear export sequence</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
O-GlcNAc Transferase	O-linked N-Acetylglucosamin Transferase
PAX3	<i>paired boxed gene 3</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
PK2	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2</i>
PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PH-Domäne	<i>pleckstrin-homology-Domäne</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PIP ₃ , ₄ '	Phosphatidylinositol-3',4'-bisphosphat
PIP ₃ , ₄ ', ₅ '	Phosphatidylinositol-3',4',5'-triphosphat
PKB/Akt	Proteinkinase B/Akt
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PP2A	Proteinphosphatase 2A

PPAR	<i>peroxisomal proliferating-activated receptors</i>
PPREs	<i>PPAR responsive elements</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue</i>
RB	Retinoblastom
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RXR	Retinoid-X-Receptor
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SECIS	<i>Selenocystein insertion sequence</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SelP	Selenoprotein P
SH2	<i>SRC-homology 2</i>
SHIP1/2	<i>SH2-containing inositol phosphatase-1</i>
SOD1	Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase
SGK	<i>serum and glucocorticoide inducible kinase</i>
TA	<i>transactivation domain</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAG	Triacylglyzerid
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-Buffered saline</i>
TBS/T	TBS + Tween 20
TCF/LEF	<i>T-cell factor/lymphoid-enhancer binding factor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF β	<i>tumor growth factor β</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Utr	<i>untranslated region</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

1. Einleitung

1.1 Transkriptionsfaktoren	1
1.1.1 Aufbau FoxO-Proteine	1
1.1.2 Funktion und Zielgene der FoxO-Proteine	3
1.1.3 Regulation der FoxO-Proteine durch posttranslationale Modifikation	6
1.2 Der PPAR-Signalweg	11
1.3 Antidiabetika	12
1.3.1 Metformin	13
1.3.2 Troglitazon	14
1.4. Fragestellung	15

2 Material und Methoden

2.1 Eukaryontische Zellkultur	
2.1.1 Stammhaltung und Anzucht der Zelllinien	16
2.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien	16
2.1.3 Mykoplasmentest	17
2.1.4 Behandlung	17
2.1.5 Transiente Transfektion	18
2.2 Prokaryotische Zellkultur	
2.2.1 Anzucht von <i>Escherichia Coli</i>	19
2.2.2 DNA-Präparation mittels Maxi-Kit	20
2.3 Analytik	
2.3.1 Proteinbestimmung	
2.3.2.1 SDS-Page	21
2.3.2.2 Western-Blot	23
2.3.2.3 Immundetektion	23
2.3.3 RNA-Isolation	24
2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese	25

2.3.5 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time PCR)	26
2.3.6 Luciferase Assay	27
3. Ergebnisse	
3.1 Modulation der Aktivität der Promotoren von FoxO-Zielgenen durch FoxO-Überexpression in HepG2-Zellen	28
3.2 Modulation der Promotoren von FoxO-Zielgenen bei FoxO-Überexpression in HuH7-Zellen	31
3.3 Einfluss einer Überexpression der FoxO-Isoformen auf deren Zielgene auf mRNA-Ebene	35
3.4 Modulation der Wirkung der FoxO-Transkriptionsfaktoren auf die Promotoren der Zielgene mittels Behandlung mit	
3.4.1 Metformin	37
3.4.2 Troglitazon	39
3.4.3 GW9662	41
4. Diskussion	
4.1 Bedeutung der unterschiedlichen FoxO-Isoformen für Selp/G6Pase/MnSOD	44
4.2 Einfluss des Beta-Catenins in Hepatomzelllinien	48
4.3 Bedeutung der FoxO-Kaskade auf Antidiabetika	49
5. Zusammenfassung	54
6. Literaturverzeichnis	55
7. Anhang	72

1. Einleitung

Stoffwechselerkrankungen, wie z. B. der Diabetes mellitus, spielen heutzutage eine immer größere Rolle in der westlichen Welt. Weltweit litten zur Jahrtausendwende mehr als 165 Millionen Menschen an dieser Erkrankung. Ihre Zahl wird bis in das Jahr 2030 Schätzungen zufolge auf über 360 Millionen Menschen angestiegen sein (Quinn, 2001; Wild et al., 2004). Neusten Erkenntnissen nach könnten bei diesen Erkrankungen die FoxO-Transkriptionsfaktoren einen großen Einfluss besitzen, da sie zahlreiche Prozesse im Zellstoffwechsel modulieren (Nakae et al., 2002; Tzivion et al., 2011).

1.1 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind in jeder Körperzelle unverzichtbar für eine fein abgestimmte Regulation der Transkription. Ihre Funktionsweisen sind sehr unterschiedlich, da sie beispielsweise die Aktivierung oder Deaktivierung eines Promotors bewirken können. Nach erfolgter Bindung an den DNA-Strang bilden sie zumeist aber einen Startpunkt für die RNA-Polymerase, von wo diese mit der Transkription des jeweiligen Zielgens beginnen kann. Innerhalb der Transkriptionsfaktoren gibt es drei verschiedene Gruppen. Dazu zählen die Helix-Turn-Helix-, die Zink-Finger- und die Leucin-Zipper-Motive (Walter, 2003).

1.1.1 Aufbau der FoxO-Proteine

Die Transkriptionsfaktoren der Fox-Familie sind hoch konserviert und bei nahezu allen Eukaryonten nachgewiesen. Vor der Entdeckung beim Menschen wurden forkhead box-Gene bei *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* gefunden (Weigel et al., 1989; Ogg et al., 1997). Über die Jahre wurden beim Menschen mindestens 43 verschiedene Fox-Faktoren identifiziert. Dies führte dazu, dass im Jahr 2000 eine Nomenklatur für alle menschlichen Fox-Transkriptionsfaktoren erstellt wurde. Aus dem Begriff Forkhead-Box entstand die Abkürzung Fox. Aktuell gibt es 17 Unterklassen der Fox-Transkriptionsfaktoren beim Menschen, angefangen bei FoxA bis zu FoxQ (Kaestner et al., 2000, Obsil und Obsilova, 2011).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der FoxO-Familie, welche vier Faktoren umfasst.

FoxO1a (auch bezeichnet als FKHR, Forkhead in rhabdomyosarcoma), FoxO3a (oder FKHRL1, forkhead in rhabdomyosarcoma-like protein 1), FoxO4 (alternativ AFX, acute leukemia fusion protein located in chromosome X) und FoxO6. Die in dieser Aufzählung fehlenden Faktoren, FoxO2 und FoxO5, stellten sich nach der ursprünglichen Festlegung als Homologe von FoxO3a heraus.

Zur Lokalisation ist festzuhalten, dass FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 generell in jeder menschlichen Zelle nachweisbar sind, wenn auch in unterschiedlicher Konzentration (Ogg et al., 1997; Furuyama et al., 2000; Calnan und Brunet, 2008). FoxO6 ist vermehrt im zentralen Nervensystem (ZNS) vorhanden, wo ihm eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Funktion des ZNS zukommt (Jacobs et al., 2003).

Trotz des ubiquitären Vorkommens lassen sich jedoch gewisse Unterschiede in der Verteilung feststellen. Der Faktor FoxO1a wird vermehrt im Fettgewebe, FoxO3a im Gehirn und FoxO4 im Muskel exprimiert (Furuyama et al., 2000). Neuere Untersuchungen bei Mäusen zeigen jedoch, dass FoxO1a auch vermehrt im Ovar vorkommt, FoxO3a in allen Zellen in ähnlicher und FoxO4 im Skelettmuskel die höchste Konzentration erreicht (Biggs et al., 2001).

Neben den verschiedenen Expressionen sind auch bei den drei oben erwähnten Faktoren Spleißvarianten bekannt (Yang et al., 2002). Die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA erfolgt über einen hochkonservierten Bereich, welcher aus 100 Aminosäuren besteht. Die Bindestelle innerhalb der Transkriptionsfaktoren besteht aus einem Helix-Turn-Helix-Motiv, welches sich aus jeweils drei α -Helices sowie drei β -Faltblättern am N-Terminus und zwei klassischen Loops oder *butterfly like wings* am C-Terminus zusammensetzt (Clark et al., 1993). Variationen sind fehlende β -Faltblätter und Loops oder weitere α -Helices. Der zweite Loop der *butterfly like wings* ist für die eigentliche Bindung an die DNA zuständig (Tsai et al., 2007). Der Ort der Bindung an die DNA wird als DBE (DAF-16 family member-binding-element) bezeichnet und hat die Konsensussequenz 5'-TTGTTTAC-3' (Furuyama et al., 2000; Biggs et al., 2001).

Alle Faktoren haben einen ähnlichen Aufbau, unterscheiden sich aber in der Anzahl der Aminosäuren. Die unterschiedlichen Elemente sind folgendermaßen vom N- zum C-Terminus angeordnet. Zuerst kommt die hochkonservierte Bindestelle DBD (DNA-binding-domain), mit deren Hilfe die FoxO-Faktoren an der DNA binden. Als nächstes folgen die NLS- (Nuclear localization sequence) sowie NES- (Nuclear export sequence) Regionen, welche für die Lokalisation der Faktoren innerhalb der Zelle von Bedeutung sind. Zum Abschluss folgt der TA- (Transactivation domain) Bereich am C-Terminus (siehe Abb. 1) (Greer und Brunet, 2005; Obsil und Obsilova, 2008). Die Bindungseigenschaften der Transkriptionsfaktoren an

der DNA und damit deren Funktionen lassen sich mit posttranslationalen Veränderungen wie Phosphorylierung, Acetylierung oder Ubiquitinylierung modulieren. Diese Modifikationen können die Aktivität der einzelnen Faktoren verändern und somit einen direkten Einfluss auf die Expression der FoxO-Zielgene nehmen (Matsuzaki et al., 2003; Plas und Thompson, 2003; Tsai et al., 2007).

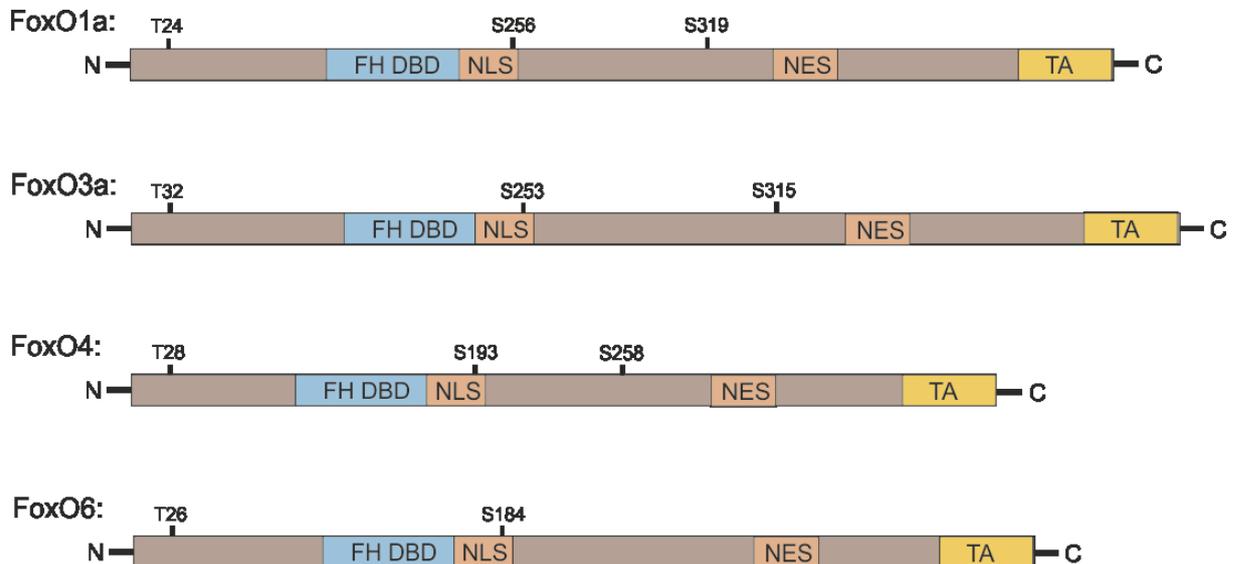


Abb. 1: Aufbau der FoxO-Proteine und deren Phosphorylierungsstellen

Alle FoxO-Proteine besitzen denselben Aufbau, bestehend aus einer DNA-Bindedomäne (FH-DBD), der Kernlokalisations-Sequenz (NLS), der Kernexport-Sequenz (NES) und der Transaktivierungs-Domäne (TA). Eine wichtige Regulierung der Aktivität findet mittels Phosphorylierung an Serin/Threoninresten durch die Proteinkinase B/Akt statt. Vom Grad der Phosphorylierung hängen der Verbleib im Nukleus und damit die Aktivität der Faktoren ab.

FH DBD, Forkhead DNA binding domain; NLS, Nuclear localization sequence; NES, Nuclear export sequence; TA, Transactivation domain; modifiziert nach Greer und Brunet (2005), Obsil und Obsilova (2008)

1.1.2 Funktion und Zielgene der FoxO-Proteine

Ein großer Schritt zum Verständnis der Funktion der FoxO-Proteine wurde 1997 getan, als nachgewiesen wurde, dass sie homolog zum DAF-16-Protein (Abnormal dauer formation-16) aus *C. elegans* sind (Ogg et al., 1997). Im Folgenden stellte sich weiterhin heraus, dass dieses Protein durch Insulin und dessen weiteren Stoffwechselfaskaden reguliert werden kann (Dorman et al., 1995; Kimura et al., 1997). Bis zu diesen Entdeckungen war die Rolle der FoxO-Proteine im menschlichen Organismus noch nicht abschließend geklärt. Aus früheren Untersuchungen war bereits bekannt, dass sie eine wichtige Rolle bei den Genfusionen spielen, welche die Tumorentstehung fördern (Galili et al., 1993; Davis et al., 1994). So wurde

eine Fusion des FoxO1a-Gens mit dem PAX3- (paired boxed gene 3) beziehungsweise PAX7- (paired boxed gene 7) Gen bei Rhabdomyosarkomen beschrieben (Greer und Brunet, 2005). Der Faktor FoxO3a hingegen wurde zuerst im alveolären Rhabdomyosarkom und der Faktor FoxO4 in Leukämien entdeckt (Borkhardt et al., 1997, Anderson et al., 1998). Alle bei den aufgeführten Tumoren entstandenen neuen Fusionsproteine besitzen das DNA-Bindeelement sowie die Transaktivierungsdomäne der FoxOs (So und Cleary, 2002, 2003). Der Einfluss der FoxO-Transkriptionsfaktoren beschränkt sich jedoch nicht nur auf das Vorhandensein in Tumorzellen. Es stellte sich ferner heraus, dass sie ein breit gefächertes Aufgabenspektrum besitzen. So sind die FoxOs sehr wichtig für den Zellzyklus, wo sie antiproliferativ und apoptosefördernd sind. Dazu regulieren sie dort an mindestens zwei wichtigen Stellen die Übergänge der Zellzyklus-Phasen. Zum einen steuern sie den Übergang der G1- in die S-Phase und zum anderen haben sie regulierenden Einfluss auf den Übergang zwischen der G2- und M-Phase. Dies geschieht unter anderem durch Aktivierung des Cdk- (cyclin-dependent kinase) Inhibitors p27Kip (Medema et al., 2000) und p130 aus der RB- (Retinoblastom) Familie (Kops et al., 2002). Der Übergang der G2- in die M-Phase wird von den FoxOs hingegen durch GADD45 reguliert (Tran et al., 2002). Auf die Apoptose haben die FoxOs einen fördernden Einfluss. Dies geschieht unter anderem über die Regulation von BIM (BCL2-like 11) sowie bNIP3 (Bcl-2 and nineteen-kilodalton interacting protein-37), beides apoptosefördernde Proteine aus der Bcl2- (b-cell lymphoma family 2) Familie, und die Zytokine Fas und TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Brunet et al., 1999; Dijkers et al., 2000, Modur et al., 2002, Tran et al., 2002).

Neben der Regulation des Zellzykluses und der Apoptose haben die FoxO-Transkriptionsfaktoren aber auch noch einen großen Einfluss auf den Stoffwechsel innerhalb der Leber. Die Leber verhindert in Zeiten von Nahrungsmangel ein zu tiefes Absinken des Glukosespiegels im Blut und ist damit für die Glukosehomöostase von großer Bedeutung. Dieser Einfluss wird durch die Regulation von zwei Schlüsselenzymen, der G6Pase und PEPCK (Phosphoenolpyruvat carboxykinase), der Glukoneogenese gesteuert. Mit der Hilfe von Insulin lässt sich dieser Effekt wieder aufheben (O'Brien und Granner, 1996; O'Brien et al., 2001). Bei der G6Pase handelt es sich um das letzte Enzym innerhalb der Glukoneogenese. Es ist innerhalb der Leber im glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und forciert eine Spaltung des Glukose-6-Phosphates in Glucose und anorganisches Phosphat (Van de Werve et al., 2000; van Schaftingen und Gerin, 2002). Neben der Förderung der Glukoneogenese ist FoxO1a wahrscheinlich auch für eine erhöhte Nahrungsaufnahme und damit einem erhöhten Angebot von Glukose verantwortlich (Kitamura et al., 2006). Neben dem Glukose-

stoffwechsel spielen die Faktoren aber auch noch eine wichtige Rolle beim Fettstoffwechsel innerhalb der Leber. Dort haben sie einen fördernden Einfluss auf die Bildung des Apolipoproteins ApoC-III. Dabei handelt es sich um ein Schlüsselenzym des Triacylglycerid-Stoffwechsels. Erhöhte Konzentrationen dieses Enzyms haben eine Hypertriglyceridämie zur Folge (Altomonte et al., 2004).

Trotz der zahlreichen Synergien lassen sich die Aufgabenspektren der drei Isoformen aber noch weiter unterteilen, was durch „Knock-Out“-Versuche beobachtet wurde (Hosaka et al., 2004). Dabei zeigte sich, dass nur ein kompletter FoxO1a Verlust auf Grund von Fehlanlagen der Gefäße zu einem intrauterinen Tod des Embryos am 11. Tag führte und damit letal war (Furuyama et al., 2004, Hosaka et al., 2004). Mäuse mit einem homozygoten Verlust von FoxO3a hingegen waren lebensfähig, die weiblichen Tiere wiesen jedoch einen infertilen Phänotyp auf (Castrillon et al., 2003). Ein „Knock-Out“ von FoxO4 führte letztlich zu keinen sichtbaren Veränderungen in der Entwicklung und im weiteren Verlauf (Hosaka et al., 2004).

Als weitere wichtige Aufgabe wäre die protektive Wirkung der FoxO-Proteine gegenüber oxidativem Stress zu nennen. In der Atmungskette entstehen reaktive Sauerstoffspezies wie das Superoxidanion oder Nichtradikale wie Wasserstoffperoxid. Erhöhungen der Konzentrationen von freien Radikalen führen auf Dauer zu Veränderungen der zellulären Strukturen (Sies, 1986). Dies kann letztendlich zum Zelltod oder aber zur Entstehung von Krebs beitragen (Sies, 1991). Der oxidative Stress kann gemindert werden, indem innerhalb der Zellen die Expression von MnSOD (Mangan-Superoxiddismutase) und Catalase gesteigert wird (Kops et al., 2002, Nemoto und Finkel, 2002). Bei der MnSOD handelt es sich um eine der drei bekannten Superoxid-Dismutasen, die die Reaktion $2 \text{H}^+ + 2 \text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ katalysieren. Die MnSOD, oder auch SOD2, ist dabei im Mitochondrium lokalisiert, wohingegen die beiden anderen im Zytosol beziehungsweise extrazellulär vorliegen. In Tierversuchen zeigte sich, dass ein Fehlen der MnSOD zu einem frühzeitigen Versterben der Tiere führte. Dies unterstreicht die Notwendigkeit dieser Enzyme für die Zellen (Chan, 2001).

Zuletzt steht noch das Glykoprotein SelP (Selenoprotein P), welches in jeder Körperzelle gebildet werden kann, unter dem Einfluss der FoxOs (FoxO1a). Die Leber bildet und sekretiert dabei circa 75% des gesamten SelPs ins Plasma (Read et al., 1990; Hill et al., 1996; Walter et al., 2008). Es handelt sich bei SelP um das zweite entdeckte Selenoprotein nach der Glutathionperoxidase (Rotruck et al., 1973; Hermann, 1977). Im Gegensatz zur Glutathionperoxidase, welche nur ein Selenocystein enthält, kann SelP jedoch bis zu 10 Serinreste enthalten (Flohe et al., 1973). Aktuell sind bei Ratten vier verschiedene Isoformen bekannt und es gibt Anzeichen dafür, dass es beim Menschen ähnlich ist (Akesson et al., 1994; Himeno et al.,

1996). In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass SelP neben der Regulation durch die FoxOs auch durch Insulin reguliert wird (Speckmann et al., 2008; Walter et al., 2008). Der Einbau des Selenocysteins in das SelP wird über zwei SECIS (Selenocystein insertion sequence) Abschnitte reguliert, welche beide in der 3' UTR (untranslated region) der SelP-mRNA liegen (Stoytcheva et al., 2006). Der Einbau der Aminosäure Selenocystein gestaltet sich im Gegensatz zu den restlichen Aminosäuren jedoch komplizierter, da es sich bei dem Codon UGA auch um ein Stopcodon handelt (Hill et al., 1991). Die Aufgabe des SelPs ist vor allem der Transport des Spurenelements Selen zu den verschiedenen Organen wie der Niere und den Hoden (Burk et al., 2009). Eine wichtige Rolle kommt dem SelP ebenfalls bei der Bestimmung der Selenplasmaspiegel und damit der Selenaufnahme zu (Meplan et al., 2007). Abschließend zeigen neuere Studien, dass dem SelP womöglich eine große Bedeutung bei der Entstehung beziehungsweise der Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 zukommen könnte. Bei Patienten, die an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt sind, sind neben erhöhten Blutglukosewerten auch erhöhte Plasmaspiegel des SelPs nachweisbar. Liegen normale Spiegel des SelPs und damit des Selens vor, findet eine Steuerung des SelP-Spiegels durch Insulin statt. Ist dieses System jedoch gestört, wie zum Beispiel bei einem Diabetes, kann ein erhöhter SelP-Spiegel zu einer Insulinresistenz im Gewebe führen (Misu et al., 2010).

1.1.3 Regulation der FoxO-Proteine durch posttranslationale Modifikationen

Phosphorylierung durch den PI3K/Akt Signalweg

Aus *Caenorhabditis elegans* war lange vor der Entdeckung der FoxOs das FoxO Homolog DAF16 bekannt (Kenyon et al., 1993). Nachdem dieser Faktor bekannt war, wurde im weiteren *downstream* des DAF Proteins ein regulierendes Protein nachgewiesen, welches von erheblicher Bedeutung für die Signalkaskade ist, AGE-1 (Dorman et al., 1995). Im Folgenden stellte sich heraus, dass AGE-1 ein Ortholog zu der katalytischen Untereinheit der PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) bei Säugetieren ist (Morris et al., 1996; Kimura et al., 1997). Weitere Versuche mit speziellen Inhibitoren ergaben, dass die Proteinkinase B/Akt unterhalb der PI3K eingeschaltet ist (Burgering and Coffey, 1995; Franke et al., 1995). Der Signalweg über die Proteinkinase B/Akt ist somit ein hochkonservierter Signalweg innerhalb der Zelle. Ein Wachstumsfaktor, beispielsweise Insulin, bindet an den passenden Rezeptor auf der Zell-

membran. Der Insulinrezeptor ist ein Heterotetramer und gehört zur Klasse der Tyrosinkinase. Von diesem Rezeptor liegen im Menschen zwei bekannte Isoformen vor, der Insulinrezeptor A und B. Beide Isoformen liegen als Tetramer vor und setzen sich aus je zwei Untereinheiten zusammen. Dabei handelt es sich um die N-terminal gelegene α - und die C-terminal, in der Membran liegende, β -Untereinheit, welche per Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. (Sun et al., 1991; Denley et al., 2003). Nach erfolgter Anlagerung des Signalmoleküls an der α -Untereinheit kommt es innerhalb der β -Untereinheit zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors, welcher nun direkt an SH2 (SRC-homologe 2)-Domänen gebunden werden kann, etwa des IRS 1/2 (Insulinrezeptor substrat) oder der PI3K (White 1998; Virkamäki et al., 1999).

Die PI3K setzt sich wieder aus zwei Untereinheiten, der katalytischen (p100) und der Adaptereinheit (p85), welche an den Rezeptor bindet, zusammen. Die Klasse eins der PI3K lässt sich anhand ihrer Aktivierungsform ebenfalls noch in zwei Unterklassen einteilen. Bei der oben erwähnten Kinase handelt es sich auf Grund ihrer Aktivierung, nämlich mittels einer Rezeptortyrosinkinase, um die Klasse IA. Erfolgt die Bindung an den Rezeptor, beginnt die katalytische Einheit damit, PIP $_{3',4'}$ (Phosphatidylinositol-3',4'-bisphosphat), welches an der inneren Zellmembran gebunden ist, in PIP $_{3',4',5'}$ (Phosphatidylinositol-3',4',5'-triphosphat) umzuwandeln (Hunter, 2000; Cantley, 2002). An dieses bindet nun mittels PH-Domäne (pleckstrin-homology) die PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) und die Proteinkinase B/Akt (Pawson und Nash, 2000). Die Erstbeschreibung der Akt fand im Zusammenhang mit viralen Onkogenen im Jahre 1991 statt (Bellacosa et al., 1991). Im Moment sind beim Menschen drei Mitglieder der Akt-Gruppe bekannt, die PKB α (Akt1), PKB β (Akt2) und PKB γ (Akt3) (Datta et al., 1999; Murthy et al., 2000). Nachdem sich die Akt erfolgreich mittels der PIP $_{3',4',5'}$ an die innere Zellmembran angelagert hat, kommt es zu einer Konformationsänderung dieser. Dadurch werden zwei wichtige Phosphorylierungsstellen an der Akt freigelegt. Durch Phosphorylierung der nun freigelegten Stellen mittels der PDK1 an der Aminosäure Threonin 308 und der PDK2 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2) am Serin 473 (Alessi et al., 1997a, 1997b, 1998) kommt es zur Aktivierung.

Zu den Aufgaben der Akt im Stoffwechsel zählt unter anderem die Regulation des Zellzyklus über Hemmung der proapoptotischen Faktoren p21 und p27 und der FoxO-Proteine, sowie der GSK3 (Glycogensynthase kinase 3). mTOR (mammalian target of rapamycin) sowie IRS-1 (Insulinrezeptor substrate-1) hingegen werden vermehrt aktiviert. Infolgedessen und der Tatsache, dass die Akt antiapoptotisch über Hemmung von Caspasen und Bad wirkt, gehört

sie somit zur Gruppe der Protoonkogene (Blume-Jensen und Hunter, 2001).

Die Aktivierung der PI3K und damit der Akt kann mittels zweier Phosphatasen negativ beeinflusst werden. Dazu zählen die in Abb. Nr. 2 gezeigten PTEN (Phosphatase and tensin homolog) sowie SHIP (SH2-containing inositol phosphatase) 1 und 2. Beide dephosphorylieren das PIP3^{4,5} und verhindern damit eine weitere Aktivierung der *downstream* gelegenen Akt. Unterschiede gibt es jedoch in der Position, an der beide angreifen. So dephosphoryliert PTEN PIP3^{4,5} an der 3'-Position, wohingegen SHIP1/2 dies an der 5'-Position durchführt (Stambolic et al., 1998; Liu et al., 1999; Weng et al., 1999).

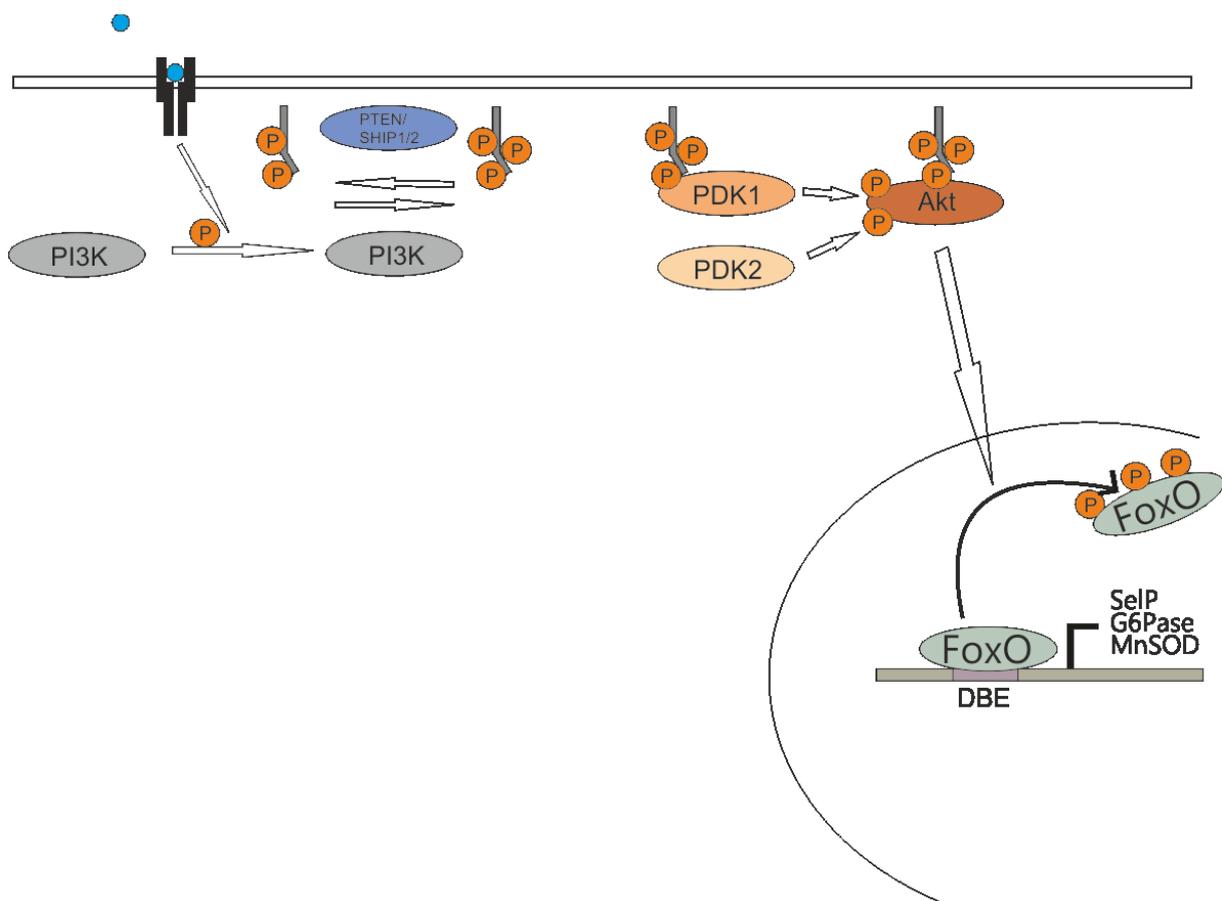


Abb. 2: Die Aktivierung der Proteinkinase B/Akt

Nach erfolgter Anlagerung des Insulinmoleküls an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung und damit zur Phosphorylierung der Akt. Dies führt zu einer Phosphorylierung der FoxO-Faktoren und damit einer Ausschleusung aus dem Zellkern.

SclP, SelenoproteinP; G6Pase, Glucose-6-Phosphatase; MnSOD, Mangan-Superoxid-Dismutase; DBE, DAF-16 binding element, P, Phosphorylierung; modifiziert nach Puig und Mattila (2011).

Die Proteinkinase B/Akt phosphoryliert die FoxO-Transkriptionsfaktoren an den Konsensussequenzen mit der Abfolge (RXRXXS/T). Dabei handelt es sich um hochkonservierte Sequenzen, die zuerst bei *C. elegans* beschrieben wurden (Alessi et al., 1996; Greer und Brunet,

2005). Die Faktoren FoxO1a, 3a und 4 besitzen jeweils drei unterschiedliche Phosphorylierungsstellen. Abb. 1 verdeutlicht die genaue Position der Phosphorylierungsstellen der Faktoren. Wichtig ist die Tatsache, dass der Faktor FoxO6 im Gegensatz dazu nur zwei Phosphorylierungsstellen besitzt, nämlich Threonin 26 und Serin 184. (Jacobs et al., 2003). Durch die Phosphorylierung kommt es innerhalb des FoxO-Proteins zu einer Konformationsänderung, was dazu führt, dass die Kernlokalisationssequenz (NLS) verdeckt wird. Durch diese Änderung kommt es zu einer Anlagerung an 14-3-3 Chaperone innerhalb des Nukleus und damit zu einer Ablösung der Faktoren von der DNA. Durch eine weitere Umlagerung wird nun die Kernexportsequenz (NES) freigelegt, welche sich am C-Terminus befindet. Dadurch ist es nun dem Exportprotein Exportin/Crm1 (Chromosome region maintenance 1) möglich, die FoxO-Faktoren aus dem Kern in das Zytosol auszuschleusen (Biggs et al., 1999; Brownawell et al., 2001; Brunet et al., 2002). Diese lösen sich im Zytosol von dem Komplex nun wieder ab und FoxO ist alleine an das 14-3-3 Protein gebunden (Biggs et al., 1999; Brunet et al., 1999). Die Bindung des 14-3-3-Proteins an die FoxOs führt so zu einer Hemmung des erneuten Imports in den Nukleus durch Überlagerung der NLS-Sequenz (Brownawell et al., 2001; Rena et al., 2001). Mutationen in den Phosphorylierungsstellen, zum Beispiel durch Austausch des Threonins beziehungsweise Serins durch Alanin, führen zu einem dauerhaften Verbleib der Faktoren im Zellkern (Takaishi et al., 1999). Eine Ausnahme dabei bildet jedoch der Faktor FoxO6. Wie oben erwähnt, besitzt dieser nur zwei Phosphorylierungsstellen. Diese Tatsache verhindert einen Export aus dem Nukleus. Eine Aktivierung der Akt, und damit die Phosphorylierung des Faktors, bewirkt jedoch trotz fehlendem Exports eine Abnahme seiner Aktivität (Jacobs et al., 2003; van der Heide et al., 2005).

Neben der Akt gibt es mit der SGK (serum and glucocorticoide inducible kinase) noch eine weitere Kinase, welche in der Lage ist, an den oben erwähnten Stellen Phosphatgruppen anzuhängen. Dabei handelt es sich ebenfalls um eine Kinase, welche durch den PI3K-Weg reguliert wird (Cantley et al., 2002). Die Phosphorylierung dieser drei Stellen wird von vielen Wachstumshormonen, wie Insulin (Kops und Burgering, 1999; Nakae et al., 1999), IGF-I (Insulin-like growth factor I) (Brunet et al., 1999, Rena et al., 1999), EGF (epidermal growth factor) (Jackson et al., 2000) oder NGF (nerve growth factor) reguliert (Zheng et al., 2002). Neben der Steuerung der FoxO-Proteine durch den PI3K/Akt-Signalweg gibt es jedoch noch weitere Möglichkeiten, die Faktoren zu phosphorylieren und damit deren Aktivität zu mindern.

Weitere Kinasen

Außerhalb des PI3K/Akt- Signalweges ist die CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) zu nennen. Sie nimmt eine wichtige Rolle im Zellzyklus beim Übergang der G1- in die S-Phase ein. Ist sie aktiv, führt sie durch eine Phosphorylierung des Faktors FoxO1a an zwei Serinen zu einem Export aus dem Kern und damit zu einer Aufhebung des Einflusses von FoxO1a auf den Zellzyklus (Huang et al., 2006). Unabhängig vom PI3K/Akt-Signalweg regulieren die IκK (IκB kinase) sowie die ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) FoxO3a (Hu et al., 2004). Liegt FoxO3a im Zytosol vor, wird es beim IκK-Signalweg nach Polyubiquitinierung abgebaut. Beim ERK-Weg läuft der Abbau ähnlich ab, hier findet ein Abbau mittels der E3 Ubiquitin Ligase MDM2 (Mouse double minute 2) statt (Yang et al., 2008).

Allerdings führt eine Phosphorylierung wie oben beschrieben nicht immer zwangsläufig zu einer Verminderung der Expression und damit der Aktivität der FoxO-Zielgene. In *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* zeigte sich, dass eine JNK (c-Jun N-terminalen Kinase) Aktivierung zu einer Verlängerung der Lebensspanne führte (Oh et al., 2005; Wang et al., 2005). Dieses Enzym hat eine große Bedeutung für die Reduktion von oxidativem Stress innerhalb der Zellen. Liegt er in Form einer erhöhte Konzentration von H₂O₂ vor, führt dies über JNK zu einer Aktivierung der Isoform FoxO4 (Essers et al., 2004).

Acetylierung

Die Regulationsmöglichkeiten der FoxO-Transkriptionsfaktoren beschränken sich allerdings nicht nur auf die Phosphorylierung. Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die Acetylierung der Faktoren an verschiedenen Lysinresten innerhalb der DNA-Bindedomäne (Fukuoka et al., 2003; Greer und Brunet, 2008). Dies geschieht durch einen Komplex aus p300/CBP (CREB binding protein), welcher mit den FoxOs reagiert und damit zu einer Verminderung der Transkription der FoxO-Zielgene führt. Dieser Effekt kann durch Sirt1, eine NAD-abhängige Deacetylase (Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid), welche ein Sir2 Ortholog der Säugerzellen ist, aufgehoben werden. (Chan et al., 2001; Brunet et al., 2004; Daitoku et al., 2011). Mittels einer Deacetylierung durch Sirt1 ist die Zelle in der Lage, die Expression sowohl von Genen, welche von Bedeutung für den Schutz des Zellzykluses gegen Stress sind, zu fördern, als auch die Expression von apoptosefördernden Genen zu hemmen (Kitamura et al., 2005).

Ubiquitinierung

Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität der FoxO-Faktoren zu senken, ist deren Degradation durch das 26S Proteasom. Damit dieser Schritt jedoch funktioniert, müssen einige Voraussetzungen erfüllt werden. Zum einen müssen die FoxOs im Zytoplasma liegen und zum anderen FoxO1a und FoxO3a vorher durch die Akt phosphoryliert worden sein (Plas and Thompson, 2003; Huang et al., 2005). Ist das der Fall, werden die Faktoren durch das Protein Skp2 markiert, welches ein Teil des SCF E3 Ubiquitin-Ligasekomplexes (Skp1/Cul1/F-box) ist. Zurzeit ist dieser Abbau mittels Skp2 nur für den Faktor FoxO1a beschrieben (Huang et al., 2005). Für den Faktor FoxO3a ist für diese Art des Abbaus die I κ K von Bedeutung (Hu et al., 2004).

Glycosylierung

Als letzte posttranslationale Modifikation wäre noch die Glycosylierung zu nennen. Dies geschieht durch das Enzym O-GlcNAc Transferase (O-linked N-Acetylglucosamine-Transferase). Dieses System reagiert vor allem auf wechselnde Glukosespiegel und Stress innerhalb der Zelle. Nach einer Glycosylierung von FoxO1a wird die Expression der G6Pase gesteigert (Kuo et al., 2008).

1.2 Der PPAR-Signalweg

Der PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) Signalweg wurde 1990 zuerst beschrieben (Issemann und Green, 1990). Mittlerweile sind drei PPAR-Isoformen bekannt, nämlich α , γ und δ oder β (Desvergne und Wahli, 1999; Michalik et al., 2002). Innerhalb der Zellen agieren die drei Isoformen als Fettmolekülsensoren. Durch Bindung an den Retinoid-X-Receptor (RXR) bilden sie Dimere, was zu einer Regulation der Expression von Genen des Energiestoffwechsels und der Entzündungsprozesse führt (Kliewer et al., 2001; Michalik und Wahli, 2006). Im Nukleus erfolgt die Bindung an die DNA im Bereich der PPREs (PPAR responsive elements), welche aus einer aus sechs Basen bestehenden Konsensussequenz mit der Basenabfolge AGGTCA aufgebaut sind (Desvergne und Wahli, 1999). Wie auch bei den FoxO-Faktoren gibt es hier Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Isoformen in den verschiedenen Geweben. PPAR α wird bei Nahrungsmangel vermehrt in der Leber gebildet.

Die PPAR γ -Synthese hingegen wird bei der Nahrungsaufnahme gesteigert und hat die höchste Expression im Fettgewebe. Der letzte Faktor, PPAR δ/β , ist ubiquitär verteilt und hat das höchste Vorkommen im Magen (Desvergne und Wahli, 1999; Escher et al., 2001; Fredenrich und Grimaldi, 2005). Die Transkriptionsfaktoren arbeiten dabei eng mit anderen Faktoren wie zum Beispiel den FoxOs und PGC-1 α zusammen. Aus früheren Publikationen ist bekannt, dass eine Aktivierung von FoxO über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors PGC-1 α zu einer verstärkten Expression der PPAR α Zielgene führen kann (Vega et al., 2000; Puigserver et al., 2003). FoxO1a und PPAR γ hemmen sich hingegen gegenseitig (Dowell et al., 2003). Die Regulation der Faktoren ist vielfältig. So wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors PPAR γ durch eine Phosphorylierung in der N-terminalen Domäne vermindert. Dies wird wie bei den FoxO-Faktoren durch ERK vermittelt, welche Mitglieder der MAP-(Mitogen-activated-protein) Kinase-Familie sind. Die transkriptionale Aktivität von PPAR γ kann ebenfalls mittels einer Phosphorylierung durch JNK reduziert werden (Hu et al., 1996; Camp et al., 1999). Die jeweilige Aktivität von PPAR γ hängt ebenfalls von der Ligandenbindung ab. Hat ein Ligand an das Heterodimer aus PPAR und RXR gebunden, kommt es zu einer Expression der jeweiligen Zielgene. Ohne gebundenen Liganden am Heterodimer jedoch wird die Aktivität der Transkriptionsfaktoren durch Repressorproteine wie beispielsweise der HDAC (Histone deacetylase) unterdrückt (Yu und Reddy, 1997; McKenna und O'Malley, 2002). Bei den Liganden gilt es zwischen natürlichen und künstlichen Liganden zu unterscheiden. Als natürliche wären zum einen ein Metabolit von Prostaglandin D2 zu nennen, 15d-PGJ2, sowie zum anderen die oxidierten Lipoproteine HODE (9-hydroxy und 13-hydroxy octadecadienoic acids). Bei den Glitazonen (TZD), welche zur Therapie des DMT2 eingesetzt werden, handelt es sich beispielsweise um künstliche Liganden (Nagy et al., 1998; Tontonoz P et al., 1998; Bailey, 2000). Ihre volle Wirkung entfalten sie wahrscheinlich über eine Aktivierung spezieller Gene innerhalb der Adipocyten. Dort verbessern sie die Wirkung von Insulin und verhindern so die Freisetzung von freien Fettsäuren (Takano und Komuro, 2009).

1.3 Antidiabetika

Für die Therapie des Diabetes mellitus stehen verschiedene Medikamente zur Verfügung (vgl. Herold Innere Medizin, Seite 710-714). Alle Medikamente haben das Ziel, die eigentliche Ursache der Erkrankung, den relativen oder absoluten Insulinmangel, auf unterschiedliche Art

und Weise zu reduzieren. Dabei gilt es, eine orale von einer parenteralen Therapie zu unterscheiden. Die oralen Therapeutika sind allerdings nur für den für diese Arbeit relevanten DMT2 indiziert.

In dieser Medikamentengruppe gilt es die beta-zytotrop wirkenden Medikamente von den nicht-beta-zytotrop wirkenden Medikamenten zu unterscheiden. Die zuerst genannten Medikamente wirken hauptsächlich über eine verstärkte Freisetzung des Insulins aus den Beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse. Hierunter fallen die Sulfonylharnstoffe, die Glinide sowie als neuere Medikamente die GLP1-Analoga und DPP4-Hemmer.

Die andere große Gruppe der oralen Antidiabetika entfaltet ihre Wirkung nicht über eine erhöhte Freisetzung des Insulins aus der Bauchspeicheldrüse. Dazu gehört das in der vorliegenden Arbeit verwendete Biguanid Metformin sowie das Troglitazon aus der Gruppe der Glitazone. Ebenfalls zu dieser Gruppe gehören noch die α -Glukosidase-Hemmer.

Zuletzt besteht noch die Möglichkeit der parenteralen Therapie mit verschiedenen Insulinar-ten.

Im Weiteren wird jedoch nur auf die beiden, für die vorliegende Arbeit relevanten Antidiabetika, Metformin und Troglitazon, eingegangen.

1.3.1 Metformin

Metformin zählt zur Gruppe der Biguanide und wird in Europa seit langem zur Behandlung des DMT2 eingesetzt (Bailey und Turner, 1996). Die Wirkungen auf den Stoffwechsel sind vielseitig. Sie beginnen bei der Verminderung der Blutglukosespiegel über beispielsweise eine Senkung der Glukoseabgabe aus der Leber bis hin zur Verbesserung des Fettstoffwechsels (Kirpichnikov et al., 2002). Trotz jahrelanger Forschung ist der genaue Mechanismus der Wirkung des Metformins jedoch nach wie vor nicht vollständig geklärt. Die Wirkung innerhalb der Zelle lässt sich vermutlich auf eine Aktivierung der AMPK (Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase) zurückführen. Die AMPK ist ein wichtiger Sensor für den Energiestatus der Zellen. Ein starker Aktivator ist ein erhöhtes AMP/ATP-Verhältnis innerhalb der Zelle (Hardie und Hawley, 2001; Zhou et al., 2001). Wurde die AMPK aktiviert, hat sie vielfältige Wirkungen auf den Stoffwechsel. Innerhalb der Leberzellen führt Metformin zu einer verminderten Glukoseproduktion mittels Hemmung der Expression wichtiger Gene der Glukoneogenese (u.a. der G6Pase und PEPCK) und der Glykogenolyse. Eine Senkung des Plasmaspiegels der Glukose wird weiterhin durch eine vermehrte Aufnahme in den

Skelettmuskel erreicht. Dazu werden durch Metformin vermehrt insulinresistente Glukosetransporter des Typs 4 in die Zellmembran eingelagert (Radziuk et al., 2003). Bei Patienten mit Fettstoffwechselstörungen bewirkt Metformin über einen noch unbekanntem Weg eine Hemmung der Fett- und Cholesterinsynthese und damit eine Senkung der TAG-Spiegel (DeFronzo und Gorman, 1995; Rena et al., 2013).

1.3.2 Troglitazon

Die Wirkung der Glitazone auf den Glukosestoffwechsel begründet sich auf eine agonistische Wirkung auf den PPAR γ -Rezeptor (Day, 1999). Als erstes Medikament der Gruppe der Glitazone kam Troglitazon auf den Markt. Da während der Therapie jedoch eine Lebertoxizität nachgewiesen wurde, welche in einigen Fällen bis zu einem Leberversagen führte, wurde die Zulassung 1997 in Großbritannien und 2000 in den USA und Japan wieder rückgängig gemacht. Nachfolgepräparate sind Pio- und Rosiglitazon (Krentz et al., 2000). Die Wirkungen von Troglitazon sind vielfältig. So führt eine Stimulierung des PPAR γ -Rezeptors zu einer Differenzierung der Präadipocyten zu Adipocyten sowie zu einer Apoptose älterer Adipocyten. Die neu differenzierten Adipocyten sind kleiner und insulinresistiver als die Vorgängerkellen (Kahn et al., 2000; Arner, 2003). Daneben führt eine Einnahme zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur mittels GLUT4 sowie zu einer verminderten Glukosefreisetzung im Körper. Dies wird vermutlich dadurch erreicht, indem das Troglitazon die Konzentration von nichtveresterten Fettsäuren im Plasma senkt und die Glukoneogenese innerhalb der Leber vermindert (Day, 1999). Der Einfluss auf die Fettsäuren wird möglicherweise über die Hemmung der mitochondrialen und mikrosomalen Langketten-Acyl-CoA Synthetase vermittelt. Die Hemmung der Glukoneogenese findet wahrscheinlich auf der Ebene der Pyruvat-Carboxylase und der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase statt (Fulgencio et al., 1996).

Beide Medikamente, Metformin und Troglitazon, wurden bzw. werden zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt. Nach der Einnahme führen sie zu einer Herabsetzung der Insulinresistenz und zählen damit zur Klasse der Insulinresistenzsensitizer (Chiarelli und Marzio, 2008).

1.4 Fragestellung

Im Rahmen dieser Dissertation soll die Wirkung von FoxO-Transkriptionsfaktoren auf spezielle Zielgene wie Selenoprotein P, Glucose-6-Phosphatase und der Mangan-Superoxiddismutase untersucht werden. Die Regulation dieser Faktoren erfolgt unter anderem über Insulin und den PI3K/Akt-Weg, was in der vorliegenden Arbeit betrachtet werden soll. Folgende Fragen sollen hier beantwortet werden:

- a) Welche Konsequenz hat die Überexpression von FoxO-Transkriptionsfaktoren für die Promotoraktivität von FoxO-Zielgenen (*Selenoprotein P*, *Glucose-6-Phosphatase* und *Mangan-Superoxiddismutase*) sowie die Expression dieser Gene ?
- b) Wirkt sich die Überexpression der FoxO-Isoformen 1a, 3a und 4 unterschiedlich auf die Aktivität der genannten Promotoren aus ?
- c) Finden sich die auf Promotorebene identifizierten Effekte einer FoxO-Überexpression in unterschiedlichen Zelllinien (HepG2 und HuH7) wieder ?
- d) Wie beeinflussen Insulin sowie die Pharmaka Metformin und Troglitazon die untersuchten FoxO-responsiven Systeme ?

2. Material und Methoden

Die Substanzen in dieser Arbeit stammten, sofern nicht anders angegeben, alle von Sigma - Aldrich (München), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe). Zur Herstellung der Lösungen wurde Reinstwasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Eschborn) verwendet. Einwegartikel für die Zellkultur wurden von Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) bezogen.

2.1 Eukaryontische Zellkultur

2.1.1 Stammhaltung und Anzucht der Zelllinien

Humane Hepatomzellen (HepG2 und HuH7, vgl. Tabelle 2.1.2) wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; PAA, Österreich) mit 4,5 g/l Glukose, welches mit 10% (v/v) FCS (fetal calf serum, PAA), 2 mM Glutamax (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAA) versetzt war, kultiviert. Für die Transfektion der HuH7-Zellen wurde Opti-MEM (Invitrogen) ohne jegliche Zusätze verwendet.

Die Zelllinien wurden bei 37° Celsius in einer wasserdampfgesättigten und mit 5% (v/v) CO₂ versetzten Atmosphäre kultiviert. Nach 2-3 Tagen hatten die Zellen eine Konfluenz von 60-80% erreicht und wurden mittels PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,4; 2,6 mM KCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 6,4 mM Na₂HPO₄) gewaschen. Der Waschpuffer wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen zum Ablösen für 3-5 Minuten im Brutschrank mit einem Trypsin-EDTA/PBS Gemisch inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinisierung durch Zugabe des Kompletmediums gestoppt und die Suspension bei 1500g und 4 °C für 2 Minuten abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen wieder in Kompletmedium aufgenommen und je nach gewünschter Verdünnung auf Kulturschalen/-flaschen der Firma Greiner verteilt.

2.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Bei einer Konfluenz von circa 80% wurden die Zellen nach dem Abstoppen der Trypsinisierung mit Vollmedium bei 1500g und 4 °C für 2 Minuten abzentrifugiert (s. 2.1.1). Die Pellets

wurden in Gefriermedium (DMEM + 20% (v/v) FCS + 10% (v/v) DMSO) aufgenommen und bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig in 75 cm² Kulturflaschen mit Komplettmedium überführt. Nach 4-5 Stunden wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch neues Komplettmedium ersetzt, um die zellschädigende DMSO-Konzentration zu verringern.

2.1.3 Mykoplasmentest

Einmal im Monat wurden die Zelllinien auf Verunreinigungen mit Mykoplasmen untersucht. Dazu wurde ein Kit der Firma VenorGeM Mykoplasmen-Nachweis verwendet. Alle Zellen, welche in den folgenden Versuchen verwendet wurden, waren Mykoplasmen-negativ.

2.1.4 Behandlung

Die Zellen wurden mit einer Konfluenz von circa 70% in Komplettmedium in 35 mm (Durchmesser)-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen, die Schalen mit den Zellen gewaschen und das Medium durch FCS-freies Medium ersetzt. Die Zellen wurden für 24h inkubiert und am folgenden Tag behandelt. Die HepG2-Zellen wurden mit Insulin (100 nM; Roche Biochemicals Mannheim) und Metformin (2 mM; Sigma, Taufkirchen) bei gleichbleibender Dosierung behandelt. Von Troglitazon (Sigma Aldrich) und GW9662 (Sigma Aldrich) wurden hingegen verschiedene Dosierungen eingesetzt. Als Lösungsmittel für Troglitazon und GW9662 diente DMSO, was auch als Negativkontrolle verwendet wurde. Die HuH7-Zellen wurden mit Insulin (100 nM) und Lithiumchlorid in aufsteigender Konzentration behandelt. Für die Reporterassays wurden die Proben 24 h nach der Behandlung in einem passiven Lyse-Puffer (PLB, Qiagen) lysiert und bei -20 °C verwahrt. Für die Gewinnung der Proben für quantitative RT-PCR wurde bis zur Lyse wie oben verfahren. Anstelle eines PLB wurden die Zellen jedoch in β -Mercaptoethanol-Puffer (Qiagen) lysiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.1.5 Transiente Transfektion

(i) HepG2

Zur Transfektion der HepG2-Zellen wurden diese in 35 mm Schalen bis zu einer Konfluenz von ungefähr 70% herangezogen. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 24 µg Polyfect (Qiagen), 0,75 µg Reporterplasmid, 0,75 µg Expressionsvektor und 0,1 µg pRL-SV40 in FCS-freiem Medium nach den Herstellerangaben (Qiagen, Polyfect) transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen dann mit den jeweiligen Chemikalien bzw. Medikamenten behandelt.

(ii) HuH7

Die Zellen wurden wie bei (i) ausgesät. Am nächsten Tag, nach einer 24-stündigen Inkubationszeit, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 4 µg Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 0,75 µg Reporterplasmid, 0,75 µg Expressionsvektor und 0,1 µg pRL-SV40 in 0%-Medium nach den Herstellerangaben (Invitrogen, Lipofectamine) transfiziert. Da die Transfektionseffizienz mit Polyfect laut Herstellerangaben mangelhaft war, wurde für diese Zelllinie Lipofectamine 2000 genutzt. Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurde FCS-freies Medium ohne weitere Zusätze (Glutamax, Penicillin/Streptomycin) verwendet. Da für eine weitere Kultivierung der Zellen jedoch Zusätze (Glutamax, Penicillin/Streptomycin) im Medium nötig waren, wurde nach circa vier Stunden 750µL Mangelmedium hinzugegeben. Der weitere Ablauf ist identisch mit (i).

Eine Übersicht der verwendeten Plasmide findet sich in Tabelle 2.1.1

Tabelle 2.1.1 Herkunft und Beschreibung der verwendeten Plasmide

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bemerkung</u>	<u>Referenz</u>
SeP-Promotor	SeP-Promotor in pGL3-basic; Resistenz: Amp	Dreher et al., 1997; Mostert et al., 2001
G6Pase-Promotor	G6Pase-Promotor in pGL3-basic; Resistenz: Amp	Freundlicherweise von PD Dr. A. Barthel (BG Kliniken Bergmannsheil, Bochum) zur Verfügung gestellt.
MnSOD-Promotor	MnSOD-Promotor in pGL3-basic	Freundlicherweise von Prof. Dr.

	Resistenz: Amp	B.M.T. Burgering (UMC Utrecht, Niederlande) zur Verfügung gestellt.
FOP-Flash	Thymidine Kinase-minimal Promotor; mutierte TCF-binding site Resistenz: Amp	Upstate Biotechnology
TOP-Flash	Thymidine Kinase-minimal Promotor, Wildtyp TCF-binding site Resistenz: Amp	Upstate Biotechnology
FoxO1a	FKHR cDNA in pcDNA6.2/nLumio-DEST; Resistenz: Amp	Die Klonierung der Fragmente in den Vektor pcDNA 6.2/nLumio-DEST wurde freundlicherweise von Elisabeth Sauerbier aus der AG Klotz durchgeführt.
FoxO3a wt	FoxO3a cDNA in pcDNA6.2/nLumio-DEST; Resistenz: Amp	
Foxo4	AFX cDNA in pcDNA6.2/nLumio-DEST; Resistenz: Amp	
β -Catenin	β -Catenin in pEGFP-C1	Addgene #16071

Tabelle 2.1.2 Herkunft und Beschreibung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Bemerkung	Referenz
HepG2	Humane Hepatomzellen aus einem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom eines 15 jährigen kaukasischen Jungen	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC No.: 85011430)
HuH7	Humane Hepatomzellen aus einem Tumor eines 57 jährigen Japaners im Jahre 1982	Freundlicherweise von Dr. Verena Keitel (Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie) zur Verfügung gestellt.

2.2 Prokaryotische Zellkultur

2.2.1 Anzucht von *Escherichia Coli*

Das LB-Medium (s.u.) wurde bei 121 °C autoklaviert und nach dem Abkühlen vor Verwendung mit der unten angegebenen Konzentration von Ampicillin (100 µg/ml) versetzt.

Zur besseren Ausbeute wurde jeweils eine Vorkultur der Bakterienstämme angelegt. Dazu

wurden 15 ml LB-Medium mit einer Pipettenspitze der jeweiligen *E. Coli* - Top10 Zellen beimpft und bei 150 rpm und 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde eine Hauptkultur mit ca. 250 ml LB-Medium angelegt. Dazu wurde diese mit der Vorkultur, welche 1:100 bis 1:500 verdünnt wurde, angeimpft. Nach einer erneuten Inkubationszeit (8 – 10 h) auf dem Schüttler wurde die Kultur bei 4 °C und 3500 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die so erhaltenen Bakterien-Pellets wurden bei -80 °C eingefroren.

LB-Medium (Sambrook et al., 1989)

10% (w/v) Trypton

5% (w/v) Hefeextrakt

5% (w/v) NaCl

2.2.2 DNA-Präparation mittels Maxi-Kit

Die Plasmide wurden mittels des NucleoBond XtraMaxi-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach den Herstellerangaben isoliert. Am Ende der Präparation wurde die DNA Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Reinheit mittels eines Agarosegels bestimmt.

2.3 Analytik

2.3.1 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Proben für die SDS-PAGES wurde mittels der Proteinbestimmung BCA-Reaktion mit dem Kit „BCA Protein Assay Kit“ der Firma Pierce (Rockford, USA) bestimmt. Es wurden 3-5 µl pro Probe (Doppelbestimmung) mit 200 µl der Lösung des Kits in einer 96-well-Platte vermischt. Während der 30-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C im Wasserbad reagierten die innerhalb der Probe vorhandenen Proteine mit dem Kupfer(II) des Kits und das Kupfer wurde reduziert. Diese Reaktion äußerte sich in einem Farbumschlag, der mittels einer Verdünnungsreihe bekannter Proben (Albumin 25-2000 µg) an einem Photometer der Firma BioTEK (Highland Park, USA) quantifiziert und in der Folge ausgewertet wurde.

2.3.2.1 SDS-PAGE

Mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ließen sich die Proteine anhand ihres Molekulargewichts mittels eines elektrischen Feldes auftrennen. In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche Variante nach Laemmli gewählt. Dazu wurden zwei verschiedene Gele aufeinander gegossen. Mit dem unteren Gel, dem eigentlichen Trenngel, konnten die Proben anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Zur besseren Auftrennung, Aufkonzentrierung und Optimierung des Laufverhaltens der Proben wurde auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Beide Puffer, der für das Trenn- sowie für das Sammelgel, enthielten das Detergenz SDS, welches die Proteine denaturierte und ihre Tertiär- sowie Quartärstruktur zerstörte. Durch die Denaturierung wiesen alle Proteine in der Probe eine negative Ladung auf. Die Auftrennung erfolgte nun anhand der Größe und nicht der Ladung. Die aufzutragenden Proben wurden zu Beginn sonifiziert oder mit Hilfe einer feinen Kanüle (27G, BD Microlance 3, Drogheda Irland) abgeschert, um unerwünschte DNA-Reste zu lösen.

Anschließend wurden sie 1:2 mit dem unten erwähnten Laemmli-Probenpuffer verdünnt und für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelapparatur (Novex Mini Cell, Invitrogen, Karlsruhe) in Elektrophorese-Laufpuffer durchgeführt.

Nachdem die Proteine aufs Gel aufgetragen wurden, es wurden immer 40 µg verwendet, wurde die SDS-Page mit 0,02 mA für den Sammelgellauf gestartet. Waren die Proben in das Trenngel eingetaucht, wurde die Stromstärke auf 0,04 mA erhöht. Als Größenstandard für die Proteine diente der Marker Color Prestained Protein Ladder, Broad Range (New England Biolabs).

4x Laemmli-Probenpuffer

- 250 mM Tris-HCl (pH 8)
- 20% (w/v) Glycerol
- 5% (w/v) SDS
- 0,01% (w/v) Bromphenolblau
- 100 mM DTT (Dithiothreitol)

Elektrophoreselaufpuffer

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

PAA Stammlösung

30% (w/v) Acrylamid

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

SDS-Lösung

10% (w/v) Natriumdodecylsulfat

Trenngelpuffer

1,5 M Tris (pH 8,8)

Sammelgelpuffer

1 M Tris (pH 6,8)

APS

10% (w/v) Ammoniumperoxodisul

Trenngel, 10% (w/v) Acrylamid

4 ml dH₂O

2,5 ml Trenngelpuffer

3,3 ml PAA Stammlösung

100 µl SDS-Lösung

100 µl APS

5 µl TEMED

Sammelgel, 2% (w/v) Acrylamid

3,3 ml dH₂O

0,65 ml Sammelgelpuffer

0,96 ml PAA (Polyacrylamid) Stammlösung

50 µl SDS-Lösung

50 µl APS

5 µl TEMED

2.3.2.2 Western-Blot

Mittels eines elektrischen Feldes ließen sich die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine nun auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran übertragen. Bei diesem Verfahren blieb die Verteilung der Proteine erhalten und sie waren für weitere Experimente an der Membran zugänglich. Als Vorbereitung dazu wurden Schaumstoffschwämme und je zwei Blottingpapiere pro Gel im Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,5) für ungefähr 15 Minuten equilibriert. Die PVDF-Membran (VWR, Langenfeld) wurde für 30 Sekunden in Methanol aktiviert und dann in Transferpuffer mit 20% (v/v) Methanol für mindestens 10 Minuten gelagert. Der Blot wurde für 2 Stunden bei 25 Volt in der vertikalen Gelapparatur (Novex Mini Cell, Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt, als Puffer diente der Transferpuffer mit 20% (v/v) Methanol. Die Blottingkammer wurde mit 2-3 Schaumstoffschwämmen, einem Blottingpapier, dem Gel, der PVDF-Membran, erneut einer Lage Blottingpapier und abschließend mit Schaumstoffschwämmen bestückt. Dabei wurde stets beachtet, dass die Schwämme auf die Kathode gelegt wurden und keine Luftblasen verblieben.

Transferpuffer 10x

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

2.3.2.3 Immundetektion

Nachdem die Proteine auf die Membran überführt wurden, wurde die Membran in TBST-Puffer mit 5% (w/v) Milchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geblockt. Anschließend wurde die Membran für 2 Stunden mit dem ersten Antikörper, Liste siehe unter Tabelle 2.3, inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran für etwa 15 Minuten mit TBST gewaschen, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper für eine weitere Stunde inkubiert. Verbleibende Antikörperreste wurden erneut mittels eines 15-minütigen Waschschruttes entfernt. Für sämtliche Inkubationen standen die Proben auf einem Schüttler.

Zur Detektion wurden 500 µl (1:1) SuperSignal West Pico Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA) und SuperSignal West Femto Substrate (Thermo Scientific; Rockford, USA)

als Reagenz verwendet. Röntgenfilme der Firma (GE Healthcare) wurden in einer Röntgenkassette belichtet und dienten als Dokumentation der Ergebnisse.

TBS Puffer

20mM Tris (pH 7,6)
137 mM NaCl

TBST-Puffer

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

Folgende Antikörper wurden verwendet

Tabelle 2.3

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Referenz</u>	<u>Verdünnung</u>
<u>Primärer Antikörper</u>		
Anti – V5 Tag	Invitrogen; #R960-25	1:5000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST
Anti – GAPDH	Millipore; #MAB374	1:5000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST
<u>Sekundärer Antikörper</u>		
Anti-Maus	GE Healthcare; #NA931V	1:5000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBST

2.3.3 RNA-Isolation

Die HepG2-Zellen wurden in 30 mm Schalen ausgesät, so dass sie eine Konfluenz von ungefähr 70-80% aufwiesen. Im Anschluss wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Mangelmedium für 24 h weiter kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen behandelt und 24 h später wurde die RNA nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des RNeasy Mini-Kits (Qiagen) isoliert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Zur Elution der RNA dienten 2x 50 µl RNase-freies dH₂O. Mittels des BioPhotometers der Firma Eppendorf (Hamburg) wurden die 1:50 mit RNase freiem dH₂O verdünnten Proben gemessen und die Konzentration bestimmt. Als Referenzlösung diente dH₂O. Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurde diese im letzten Schritt auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe

2.3.4). Mit Hilfe des Omniscript-Kits der Firma Qiagen wurden jeweils 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Das Kit wurde nach den Herstellerangaben benutzt und cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich Nukleinsäure anhand ihrer Größe und Konformität aufzutrennen. Zur Herstellung des Gels wurde Agarose (Biozym, hessisch Oldendorf) unter Erhitzen in 1x TAE- oder 1x TBE-Puffer gelöst. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid (5 µg/ml) beziehungsweise 1x GelRed (Biotium, Hayward, USA) hinzugegeben und in die Apparatur gegossen. Die Proben wurden mit 0,2 (w/v) Probenpuffer versetzt und in das Gel pipettiert. Das Gel wurde mit 1x TAE-/TBE-Puffer bedeckt und die Nukleinsäuren bei 65 Volt für circa 30-60 Minuten aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Fluorchem 8900 der Firma Cell Biosciences, Santa Claus, USA) bei 605 nm Wellenlänge.

TAE-Puffer (50x)

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

TBE-Puffer (10x)

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

Probenpuffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
30% (v/v) Glycerol
0,25% (w/v) Bromphenolblau

2.3.5 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time RT- PCR)

Als Gerät wurde ein LightCycler der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Als Kit diente das LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1-Kit (Roche), welches nach Herstellerangaben verwendet wurde. Es wurden jeweils 16 µl Reaktionsmix mit 4 µl der cDNA und mit 0,5 µM Oligonukleotiden der Firma Invitrogen vermischt. Zur Bestimmung der Spezifität wurden nach Durchführung der RT-PCR die PCR-Produkte auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen. Die ermittelten CP-Werte (crossing-Points) der jeweiligen Gene wurden mit Hilfe der mitgelieferten Software und Excel auf den Gehalt der Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT1) als Referenzwert normiert und in Relation zur jeweiligen Kontrolle gesetzt. Zur Kontrolle der Amplifikate wurden die PCR-Produkte nach der Bestimmung auf einem 0,8% Agarosegel aufgetragen.

Tab. 2.4 Folgende Primer wurden verwendet

Gen (Mensch)	Primersequenz 5'- 3' (F, forward; R reverse)	Größe des Amplikons	Genbank- Eintrag
Glukose-6- Phosphatase	F: AGTTGTTGCTGGAGTCCTGTC R: GGCTGGCATTATAGATGCTGT	77	NM_008061.3
SelP	F:TTCCTCCTCTTCCACCTCCT R: ACAAACACATACAGAATAAACCAAGG	70	
MnSOD	F: AGCACGCTTACTACCTTCAG R: ACTTTTTGCAAGCCATGTAT	82	
HPRT-1	F: GACCAGTCAACAGGGGACAT R: GTGTCAATTATATCTTCCACCATCAAC	95	NM_000194.2

Tab. 2.5: Programmschritte der Realtime-PCR

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

2.3.6 Luciferase Assay

Für diese Versuche wurden die Zellen transient transfiziert (2.1.5) und für 24 h inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit den jeweiligen Substanzen behandelt.

In diesem Falle waren es 100 nM Insulin, 2 mM Metformin, 0-30 µM Troglitazon oder 0-30 µM GW9662. Nach erfolgter Behandlung wurden die Zellen erneut inkubiert und in der Folge mit 200 µl des „passiv lysis puffer“ (Promega) lysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Auswertung der Versuche wurde mit Hilfe des „Dual Luciferase™ Reporter Assay System“ die Luciferaseaktivität bestimmt. Dafür wurden 10 µl Lysat in eine Mikrotiterplatte vorgelegt, in welche 50 µl „Luciferase Assay Reagent II“ hinzugegeben wurden. Für 2 Sekunden wurde nun im Microplate Luminometer LB 96 V-Injektor (EG&G, Bad Wildbad) die Fluoreszenz gemessen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl „Stop & Glo™ Reagent“ gestoppt. Stattdessen wurde nun die Renilla-Luciferase aktiviert und deren Fluoreszenz für 2 Sekunden gemessen. Zur Normierung der Werte wurden die Ergebnisse der Firefly-Luciferase durch die Renilla-Luciferase geteilt.

3. Ergebnisse

FoxO-Faktoren stehen unter dem hemmenden Einfluss der PI3K/Akt (Barthel et al., 2005). Da die Regulation der Gene für Selp, G6Pase sowie MnSOD unter anderem durch die FoxO-Faktoren erfolgt, sollte hier zunächst untersucht werden, inwiefern sich die Überexpression unterschiedlicher FoxO-Isoformen auf die Promotoraktivität dieser unterschiedlichen FoxO-Zielgene auswirkt.

3.1 Modulation der Aktivität der Promotoren von FoxO-Zielgenen durch FoxO-Überexpression in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden mit Reportergenplasmiden, welche die Promotorregion der drei FoxO-Zielgene Selp, G6Pase und MnSOD in Kombination mit dem Luciferase-Reporter gen enthielten, transient transfiziert. Ferner wurden die FoxO-Faktoren überexprimiert, indem die Zellen mit dem jeweiligen Expressionsvektor transfiziert wurden. Als Reporter gen diente die Luciferase des Glühwürmchens (firefly; *Photinus pyralis*). Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zellen zeitgleich noch mit dem Plasmid pRL-SV40 transfiziert, welches die Luciferase aus dem Seestiefmütterchen (*Renilla reniformis*) unter der Kontrolle des viralen SV-40 Promotors codiert. Als Kontrolle für die Überexpression der FoxO-Isoform diente der Leervektor pcDNA 6.2/nLumino-DEST (pnLum).

Nach Transfektion der Zellen wurden diese für 24 h im serumfreien Medium ausgehungert. Im Anschluss wurden sie für 24 h mit Insulin (100 nM) behandelt und danach lysiert, um die Luciferaseaktivität zu bestimmen. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase immer auf die der Renilla normiert.

In den Experimenten zeigte sich, dass eine Überexpression der einzelnen Isoformen zu einer gesteigerten Aktivität des Selp-Promotors führte und damit zu einer gesteigerten Expression der Firefly-Luciferase. Des Weiteren war auch zu beobachten, dass es eine unterschiedlich starke Expression des Reporter gens bei Überexpression der einzelnen FoxO-Isoformen gab. Der größte Einfluss zeigte sich bei einer Überexpression des Faktors FoxO4, hier konnte eine Steigerung der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle um das circa 20-fache festgestellt werden. Bei den beiden anderen Isoformen FoxO1a bzw. FoxO3a betrug die Zunahme das circa 8 - 15-fache. Da FoxO-Faktoren durch Akt phosphoryliert und inhibiert werden, sollte eine Sti-

mulation des PI3K/Akt-Weges durch Behandlung mit Insulin eine Abnahme der Aktivität FoxO-abhängig regulierter Promotoren zur Folge haben. Für die Kontrolle (Leervektor) und die FoxO1a-Überexpression zeigte sich in der Tat eine Abnahme des Effekts nach Insulinbehandlung um circa 40% beziehungsweise 50% (Abb. 3.1.1), während diese Abnahme in FoxO3a und FoxO4 überexprimierenden Zellen nicht feststellbar war.

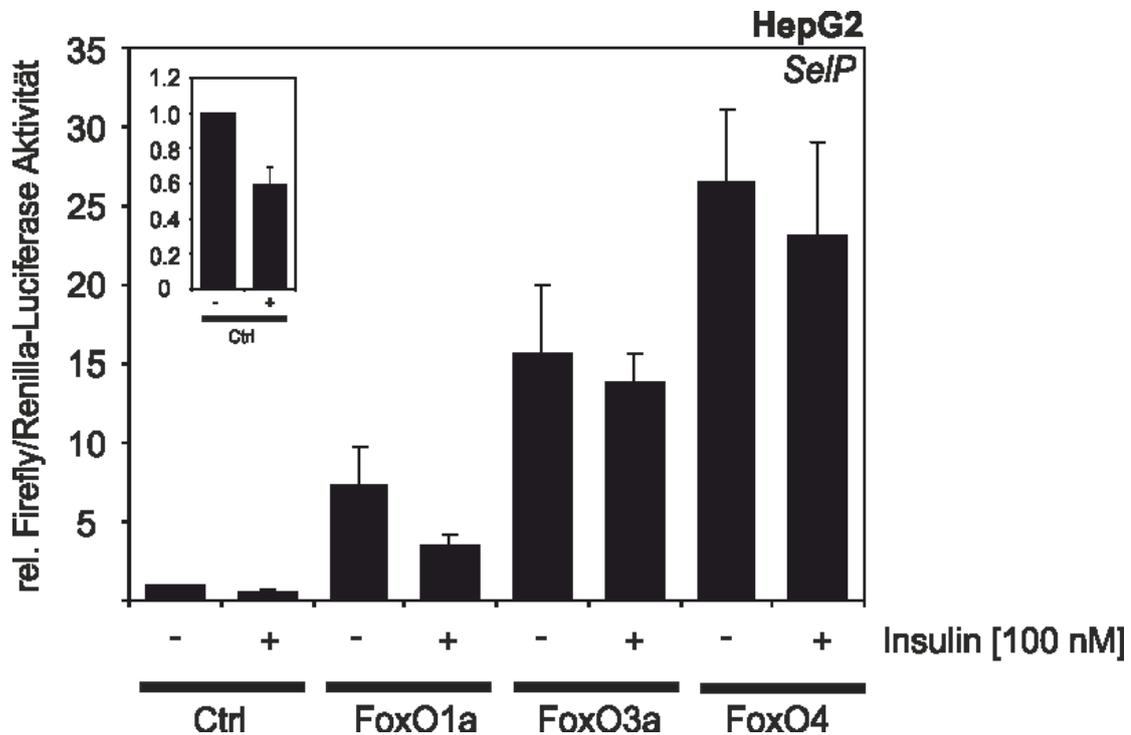


Abb. 3.1.1: Einfluss von Insulin auf die Promotoraktivität von Selp in HepG2-Zellen nach Überexpression von FoxO-Isoformen

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 60-70% kultiviert und mit einem Selp-Luciferasekonstrukt sowie FoxO1-4 Überexpressionsvektoren (Ctrl: Kontrollplasmid, pnLum) transient transfiziert. Nach 24 h Kultivierung in serumfreien Medium, wurden die Zellen mit Insulin [100 nM] behandelt und weitere 24 h inkubiert. Danach wurden sie lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse des Kontrollplasmids vergrößert. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

Im Folgenden wurde der Versuch unter denselben Bedingungen für das G6Pase-Promotorkonstrukt wiederholt (Abb. 3.1.2). Dort stellte sich ein ähnliches Bild wie bei Selp dar. Die Überexpression der FoxO-Faktoren führte auch hier zu einer gesteigerten Expression des Reportergens in den Zellen. Allerdings fiel auf, dass die Unterschiede in der Aktivität der einzelnen Isoformen, insbesondere für die Faktoren FoxO3a und FoxO4, nicht so deutlich waren wie bei Selp. Eine Überexpression führte zu einer Expressionssteigerung um das 180-fache bei FoxO1a, um das 320-fache bei FoxO3a und das 420-fache bei FoxO4. Damit war FoxO4 etwa 2,5-fach effektiver als FoxO1a, während im Falle des Selp-Promotors mit FoxO4

eine 4-fach stärkere Stimulation des Promotors erreicht wurde als nach Überexpression von FoxO1a. Auch im Falle des G6Pase-Promotors zeigte sich sowohl nach Transfektion des Leervektors als auch nach FoxO1a-Überexpression ein Effekt der Insulinbehandlung. Die insulininduzierte Senkung der Promotoraktivität betrug ca. 40% bzw. 20% (Abb. 3.1.2).

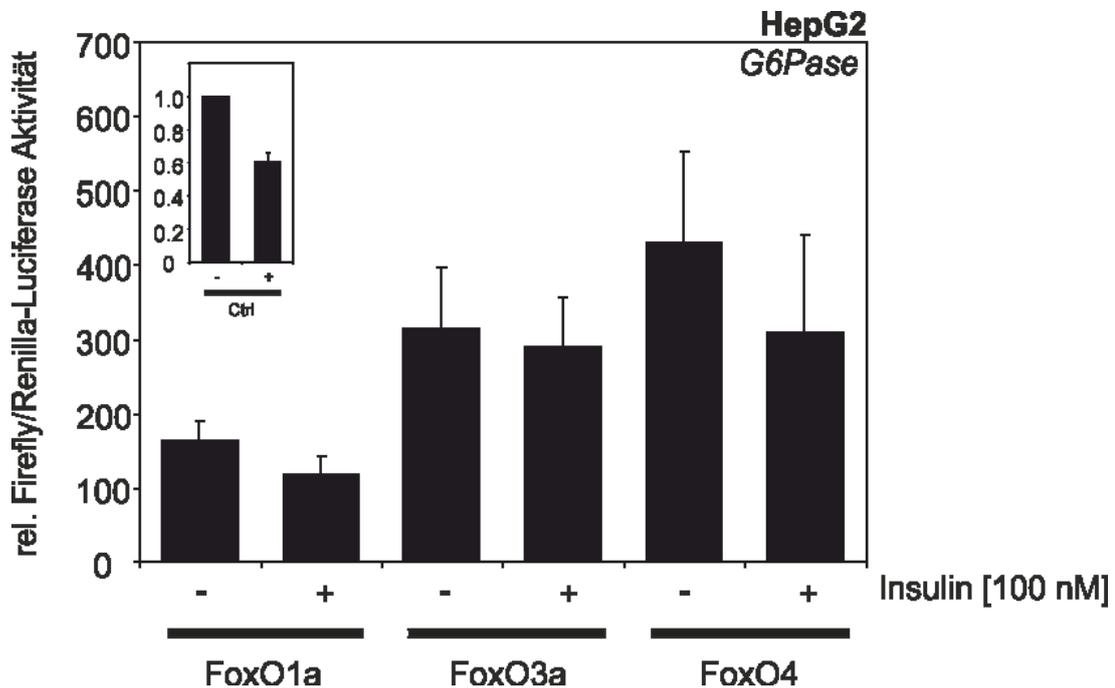


Abb. 3.1.2: Einfluss von Insulin auf die Aktivität des G6Pase-Promotors in HepG2-Zellen

Die Zellen wurden mit einem G6Pase-Promotor Luciferasekonstrukt sowie FoxO1-4 Überexpressionsplasmiden (Ctrl: Kontrollplasmid, pnLum) transient transfiziert. Nachdem sie 24 h in serumfreien Medium kultiviert wurden, wurden die Zellen mit Insulin [100 nM] behandelt und weitere 24 h inkubiert. Danach wurden sie lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse des Kontrollplasmids separat aufgeführt. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

Zuletzt wurden die HepG2-Zellen mit einem Reportergenkonstrukt des Promotors der MnSOD transient transfiziert (Abb. 3.1.3). Die Durchführung war identisch wie bei den zwei vorausgehenden Versuchen. Auch hier zeigte sich wieder, dass eine Überexpression der einzelnen FoxO-Faktoren zu einer Steigerung der Expression des Reporter gens führte. Weiterhin bestätigte sich auch, dass diese Steigerung der Expression erneut unterschiedlich zwischen den einzelnen FoxO-Isoformen ausfiel. Während die Aktivität des Reporter gens nach Überexpression von FoxO1a um das 10-fache gesteigert wurde, betrug diese Steigerung im Falle von FoxO3a das 20-fache und bei FoxO4 das 40-fache gegenüber der Kontrolle. Damit war auch hier die Überexpression von FoxO4 ca 4-fach effektiver als die Überexpression von FoxO1a. Die Insulinbehandlung deutete lediglich bei der Kontrolle eine leicht verminderte Expression des Reporter gens um ca. 10-20% an. Für die Überexpression der drei FoxO-

Isoformen allerdings war keine Reduktion sichtbar.

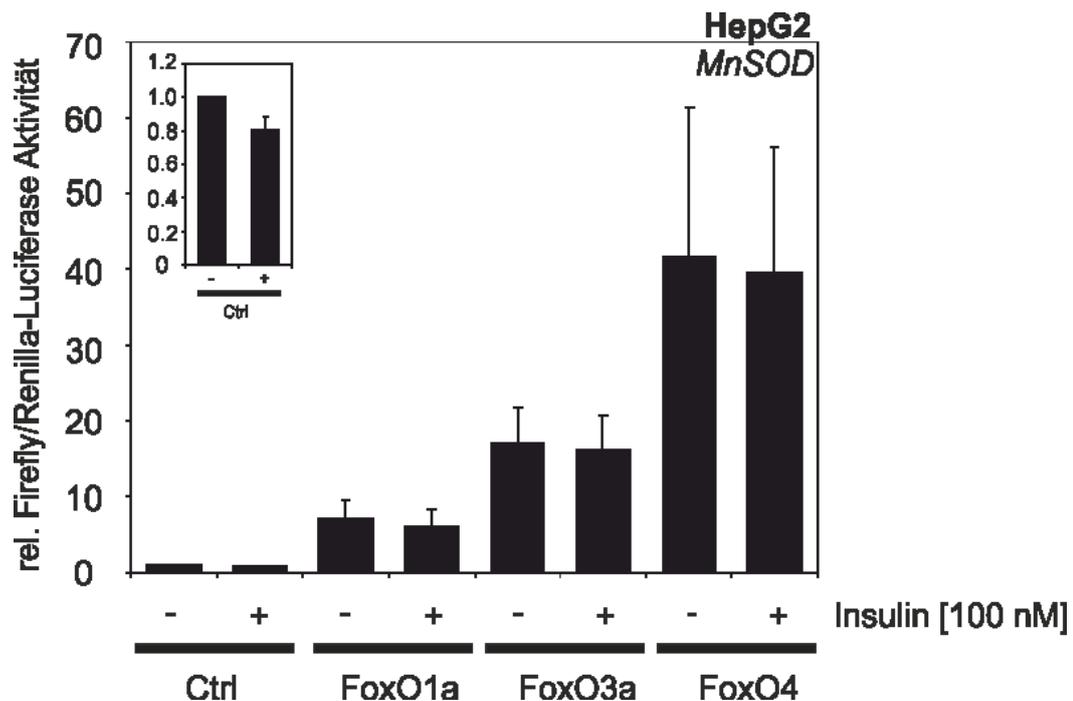


Abb. 3.1.3: Einfluss von Insulin auf die Aktivität des MnSOD-Promotors in HepG2-Zellen.

Die Zellen wurden mit einem MnSOD-Luciferasekonstrukt sowie FoxO1-4 Überexpressionsplasmiden (Ctrl: Kontrollplasmid, pNLum) transient transfiziert. Nachdem sie 24 h in serumfreiem Medium kultiviert wurden, fand eine 24 h Behandlung mit Insulin [100 nM] statt. Danach wurden sie lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse des Kontrollplasmids seperat aufgeführt.

Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM

3.2 Modulation der Promotoren von FoxO-Zielgenen bei FoxO-Überexpression in HuH7-Zellen

Nachdem der Einfluss einer Überexpression von FoxO-Faktoren auf die Aktivität der Promotoren in HepG2-Zellen untersucht wurde, stellte sich die Frage, ob eine Überexpression der FoxO-Faktoren denselben Einfluss auch in anderen Hepatomzelllinien, wie beispielsweise den HuH7-Zellen, haben könnte. Der Grund für diese Überlegung war, dass es noch nicht abschließend geklärt ist, inwieweit die Mutation innerhalb des β -Catenin-Signalweges in den HepG2-Zellen die Induktion der FoxO-Zielgene beeinflusst (de la Coste et al., 1998). Dazu wurde analysiert, ob Überexpression einzelner FoxO-Faktoren die Aktivität der Reportergene auch in HuH7-Zellen steigern und inwiefern sich die Steigerungen von Resultaten aus den HepG2-Zellen unterscheiden.

Die Vorbereitung der HuH7-Zellen verlief ähnlich wie bei den HepG2-Zellen. Die Behandlung mit Insulin, beziehungsweise Insulin und LiCl (Lithiumchlorid) in verschiedenen Kon-

zentrationen erfolgte 24 h später. Am Folgetag wurden die Zellen lysiert und mittels des Luciferase Assays die Expression des Reportergens untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass auch innerhalb der HuH7-Zellen eine Steigerung der Expression des Reportgens im Bezug zur Kontrolle nach FoxO-Überexpression stattfand (Abb. 3.3.1). Diese fiel jedoch insgesamt niedriger aus als in den HepG2-Zellen und war mit dem 3-fachen bei der FoxO3a-Überexpression am stärksten. Nach erfolgter Transfektion stieg die Luciferaseaktivität auch bei den anderen Isoformen an und schwankte zwischen dem Faktor 2 und 2,5 gegenüber dem Kontrollplasmid. In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, ob wie bei den HepG2-Zellen ein Insulin-effekt auf Promotorebene vorlag und nachweisbar war. Die Expression des Reportergens ließ sich jedoch bei keinem der Faktoren und in der Kontrolle mittels Insulin beeinflussen.

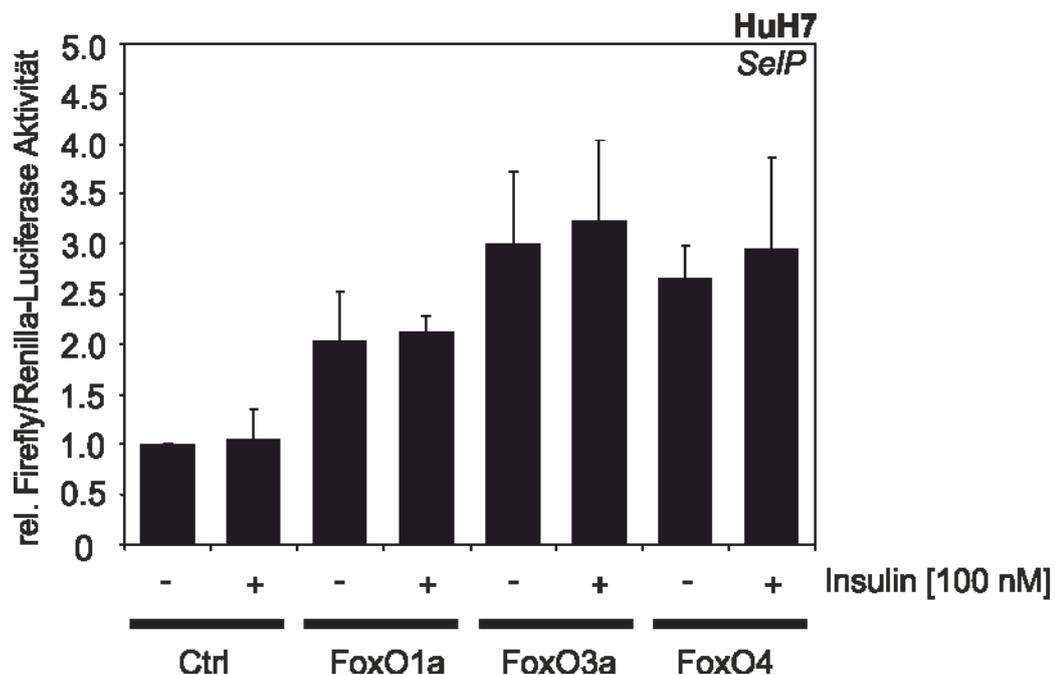


Abb. 3.2.1: Einfluss von Insulin auf die Aktivität des SclP-Promotors in HuH7-Zellen

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 60-70% kultiviert und anschließend mit einem SclP-Luciferasekonstrukt sowie FoxO1-4 Überexpressionsplasmiden (Ctrl: Kontrollplasmid, pNLum) transient transfiziert. Nach einer 24-stündigen „Aushungerung“ in serumfreien Medium, wurden die Zellen mit Insulin [100 nM] behandelt und weitere 24 h inkubiert. Danach fand die Lysierung statt und die Luciferaseaktivität wurde gemessen. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

Um zu testen, ob eine Überaktivierung von β -Catenin wie sie in den HepG2-Zellen nachgewiesen wurde (de la Coste et al, 1998), die Unterschiede zwischen den Zelllinien hinsichtlich der Reaktion auf FoxO-Überexpression und Insulin erklären kann, wurden die HuH7-Zellen mit LiCl in einer aufsteigenden Konzentration behandelt. Es ist bekannt, dass LiCl zu einer

verminderten Degradation von β -Catenin und somit gesteigerter Aktivität führt (Erdal et al., 2005). Die HuH7-Zellen wurden mit verschiedenen Plasmiden transient transfiziert, zum einen dem Selp-Promotorgenkonstrukt, zum anderen mit einem β -Catenin responsiven Promotor (TOP-Flash) bzw. der entsprechenden Negativkontrolle (FOP-Flash). Bei den TOP- und FOP-Flash-Plasmiden handelt es sich um Reportergerkonstrukte mit Bindestellen für den β -Catenin/TCF-Komplex (Abb. 3.2.3). Beim TOP-Flash-Plasmid ist die Bindestelle ohne Veränderungen vorhanden, wohingegen bei FOP-Flash die Bindestelle mutiert ist und damit keine, bzw. eine verminderte, Expression des Reportergens stattfinden kann. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit LiCl in aufsteigenden Konzentrationen von 0 bis 10 mM behandelt und 24 Stunden später die Luciferaseaktivität mittels Messung am Luminometer ausgewertet. Eine Steigerung der Expression des Reportergens und damit der Luciferaseaktivität war bei der 10 mM LiCl-Behandlung beim TOP-Flash-Plasmid deutlich sichtbar und betrug ungefähr das 4-fache im Vergleich zur Kontrolle. Bei den beiden anderen Plasmiden und den anderen LiCl-Konzentrationen hingegen hatte die Behandlung keinen sichtbaren Effekt (Abb. 3.3.2).

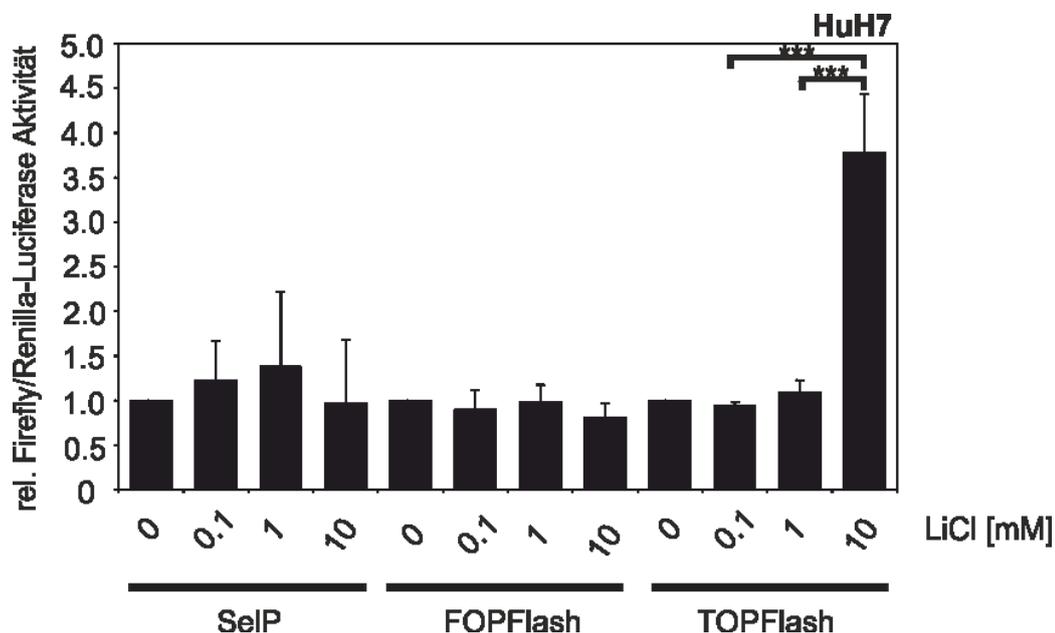


Abb. 3.2.2: Einfluss von LiCl auf die Aktivität verschiedener Promotoren in HuH7-Zellen

Nachdem die Zellen bis zu einer Konfluenz von 60-70% kultiviert wurden, wurden sie mit jeweils einem Reportergerkonstrukt transient transfiziert. Nachdem sie 24 h in serumfreien Medium kultiviert wurden, wurden die Zellen 24 h mit einer aufsteigenden Lithiumchloridkonzentration [0-10 mM] behandelt. Danach wurden sie lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Die statistische Signifikanz wurde über eine einseitige ANOVA und einen anschließenden Student-Newman-Keuls-Test ermittelt [***P < 0,005].

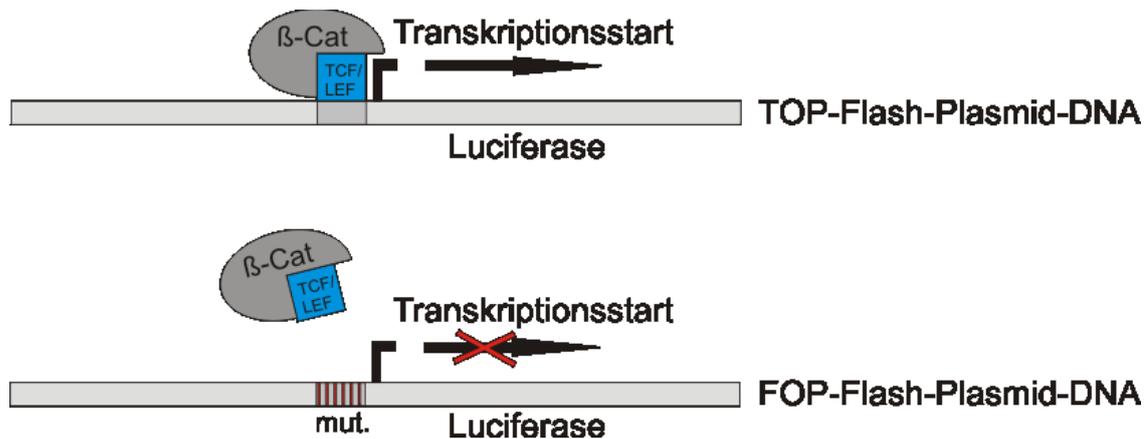


Abb. 3.2.3: Schematische Darstellung des Luciferase-Reportergentests mit den TOP/FOP-Flash-Plasmiden

Während der β -Catenin/TCF/LEF-Komplex im Falle des TOP-Flash-Plasmids in der entsprechenden Promotorregion binden und die Expression des Reportergens stimulieren kann, ist die entsprechende Bindestelle im FOP-Flash-Plasmid so mutiert, so dass es zu keiner Bindung der TCF/LEF Transkriptionsfaktoren sowie β -Catenin kommen kann.

Im Folgenden sollte analysiert werden, ob die Steigerung der Aktivität von β -Catenin durch LiCl dazu führt, dass HuH7-Zellen nunmehr insulin-responsiv werden. Für diesen Zweck wurden die Zellen ausgesät, transfiziert und mit LiCl (10 mM) behandelt sowie mit 100 nM Insulin inkubiert. Dabei zeigte sich erneut, dass die Expression des Reportergens beim TOP-Flash-Plasmid bei einer Behandlung mit LiCl induzierbar war, in diesem Fall um den Faktor 8-9 (Abb. 3.3.4). Während FOP-Flash nicht auf Li^+ oder Insulin reagierte, zeigte sich im Falle des Selp-Promotorkonstruktes, dass LiCl zu einer signifikanten Abnahme der Promotoraktivität führte. Dies wurde durch zusätzliche Insulinbehandlung allerdings nicht weiter gesenkt (Abb. 3.2.4). Li^+ imitiert in HuH7-Zellen somit zwar die Insulinwirkung auf den Selp-Promotor, die in HepG2-Zellen nachgewiesen wurde, steigert aber in den HuH7-Zellen die Wirkung von Insulin nicht.

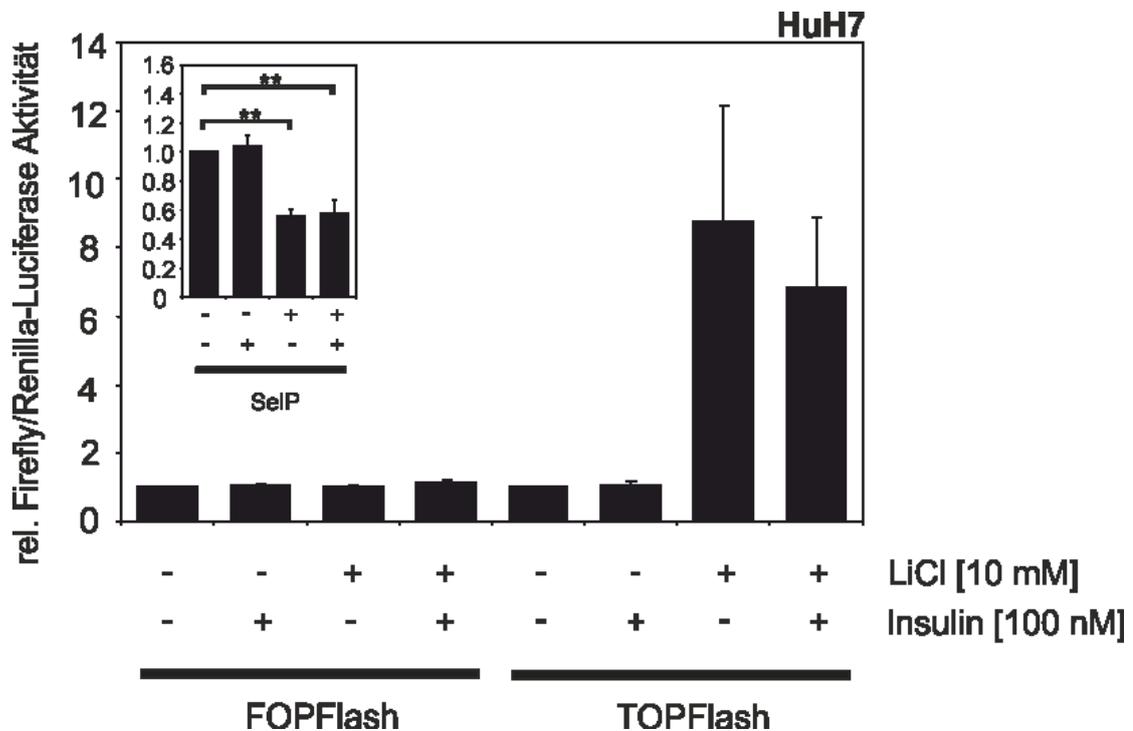


Abb. 3.2.4: Einfluss von LiCl und Insulin auf die Aktivität verschiedener Promotoren in HuH7-Zellen

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 60-70% kultiviert und mit einem Selp-, FOP-Flash und TOP-Flash-Luciferasekonstrukt transient transfiziert. Nachdem sie 24 h in serumfreiem Medium kultiviert wurden, wurden die Zellen mit Insulin [100 nM] und Lithiumchlorid [10 mM] behandelt und weitere 24 h inkubiert. Danach wurden sie lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Die statistische Signifikanz wurde über eine einseitige ANOVA und einen anschließenden Student-Newman-Keuls-Test ermittelt [$P < 0,005$ ***].

3.3 Einfluss einer Überexpression der FoxO-Isoformen auf deren Zielgene auf mRNA-Ebene

Im Folgenden wurde untersucht, ob die beobachteten Veränderungen der Promotoraktivität bei einer FoxO-Überexpression auch auf mRNA-Ebene nachweisbar waren. Dazu wurden HepG2-Zellen mit dem jeweiligen FoxO-Überexpressionsplasmid transient transfiziert und die mRNA isoliert. Transfektion erfolgte dabei mit zwei unterschiedlichen Plasmid-DNA-Konzentrationen, 0,75 μ g und 6 μ g. Die Daten zur Transfektion mit 6 μ g DNA wurden freundlicherweise von Dr. Martin Leyendecker aus der Arbeitsgruppe von Prof. Klotz zur Verfügung gestellt.

Im Vergleich zu den Reportergenversuchen, wo eine Überexpression der einzelnen Faktoren noch zu einer ausgeprägten Steigerung der Promotoraktivität führte, zeigte sich in der qRT-PCR jedoch ein anderes Bild. Lediglich für die FoxO3a-Überexpression deutete sich eine Erhöhung der mRNA-Spiegel des Selp im Vergleich zur Kontrolle an. Die mRNA-Spiegel für

SelP blieben hingegen durch eine Überexpression von FoxO1a und FoxO4 unverändert im Bezug zur Kontrolle. Auch verursachte eine Transfektion mit der größeren Konzentration der FoxO-Plasmide von 6 μg keine Steigerung (Abb. 3.3.1 A).

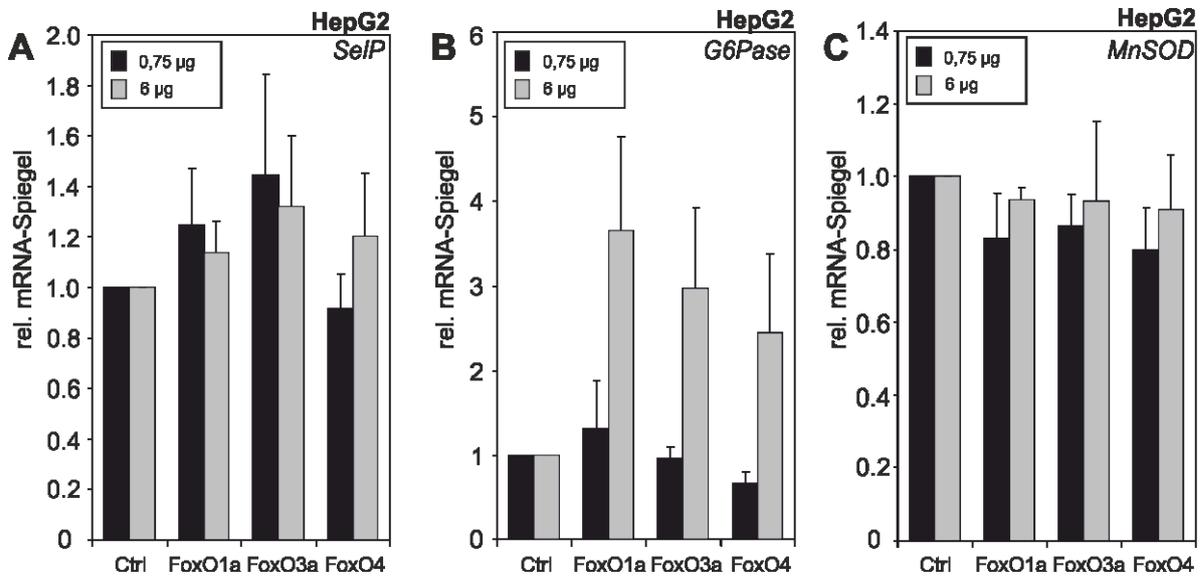


Abb. 3.3.1: Bestimmung der mRNA-Spiegel von SelP, G6Pase und MnSOD nach FoxO-Überexpression

Die HepG2-Zellen wurden mit den einzelnen FoxO-Isoformen bzw. dem Kontrollvektor (pnLum) mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,75 μg / 6 μg) transient transfiziert. Am zweiten Tag erfolgte ein Mediumswechsel und nach erneuter Inkubation für 24 h erfolgte die Lyse. Die mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR die Menge der mRNA des Zielgens (SelP, G6Pase, MnSOD) bestimmt. Die Daten der 6 μg FoxO-Überexpression wurden freundlicherweise von Dr. Martin Leyendecker aus der Arbeitsgruppe von Prof. Klotz zur Verfügung gestellt. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SD

Im Folgenden wurde der Einfluss einer Überexpression der FoxO-Isoformen auf die mRNA-Spiegel des Zielgens G6Pase untersucht. Der Versuchsaufbau war dabei identisch mit dem oben bei SelP beschriebenen. Bei allen Faktoren waren jedoch für die Konzentration von 0,75 μg der Überexpression keine Effekte auf die Höhe des mRNA-Spiegels im Bezug zur Kontrolle sichtbar. Eine Überexpression der FoxO-Isoformen mit der größeren Konzentration von 6 μg zeigte hingegen eine ausgeprägte Steigerung der mRNA-Spiegel für das FoxO-Zielgen. Den größten Effekt hatte hier allerdings, im Gegensatz zu den Reporterexperimenten, der Faktor FoxO1a mit einer Steigerung um das circa 3,5-fache im Vergleich zur Kontrolle mit dem Leervektor (pnLum). Den geringsten Einfluss hatte FoxO4, was auf Promotorebene genau spiegelverkehrt war. Zusammenfassend zeigte sich, dass eine Überexpression aller drei Isoformen zu einer Erhöhung der mRNA-Spiegel der G6Pase im Vergleich zur Kontrolle bzw der 0,75 μg Überexpression führte (Abb. 3.3.1 B).

Zuletzt wurde in der RT-PCR der Einfluss einer Überexpression der FoxO-Faktoren auf die

mRNA-Spiegel von MnSOD untersucht. Der Ablauf des Versuches war dabei erneut identisch mit den beiden vorherigen. Hier gab es keinerlei Steigerung der mRNA-Spiegel nach der Überexpression der drei FoxO-Isoformen (Abb. 3.3.1 C).

Festzuhalten bleibt, dass ein Effekt auf die mRNA-Spiegel der G6Pase bei einer Überexpression mit 6 µg FoxO-Überexpressionsplasmids sichtbar war. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied in der Steigerung der G6Pase-mRNA-Spiegel zur FoxO1a/3a/4-Überexpression.

Allerdings zeigte sich auf mRNA-Ebene ebenfalls, dass unterschiedliche Konzentrationen der FoxO-Überexpressionsplasmide keine Erhöhung der mRNA-Spiegel der beiden anderen Zielgene Selp und MnSOD zur Folge hatten (Abb. 3.3.1 A-C).

3.4 Modulation der Wirkung der FoxO-Transkriptionsfaktoren auf die Promotoren der Zielgene mittels Behandlung mit

Da im ersten Teil der Arbeit der Einfluss von Insulin auf die Promotoraktivität betrachtet wurde, sollte nun der Einfluss von antidiabetischen Pharmazeutika auf die FoxO-Transkriptionsfaktoren und deren Wirkung auf die Promotoren von Zielgenen untersucht werden. Da ein hemmender Effekt des Insulin auf die Promotoraktivität der FoxO-Zielgene bekannt ist, sollte als nächstes die Wirkung von Metformin und Troglitazon untersucht werden.

3.4.1 Metformin

Aus früheren Versuchen auf mRNA-Ebene ist bekannt, dass es dort einen insulinmimetischen Effekt aufweist (Speckmann et al., 2009). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob das Medikament auch einen Einfluss auf den Selp-Promotor und die FoxO-Überexpressionen hat.

Dazu wurden die HepG2 Zellen transient transfiziert, für 24 Stunden mit Metformin behandelt und am Folgetag lysiert. Die Aktivität der Firefly/Renilla-Luciferase wurde dann luminometrisch bestimmt. Zur Vergleichbarkeit wurde die von Speckmann et al. (2009) gewählte Konzentration von 2 mM Metformin gewählt um den auf mRNA-Ebene beobachteten Effekt möglicherweise auch auf Promotorebene nachweisen zu können.

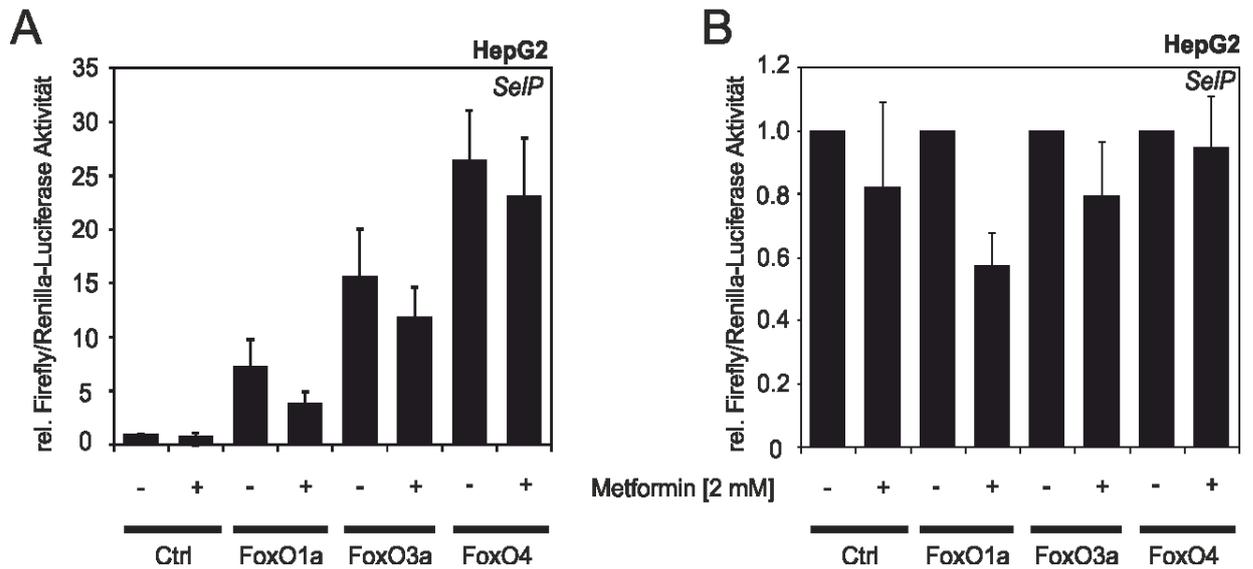


Abb. 3.4.1.1: Einfluss von Metformin auf die Aktivität des Selp-Promotors in HepG2-Zellen

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 60-70% kultiviert und mit einem Selp-Luciferasekonstrukt sowie FoxO1-4 Überexpressionsplasmiden (Ctrl: Kontrollplasmid, pNLum) transient transfiziert. Nachdem sie 24 h in serumfreiem Medium kultiviert wurden, wurden sie 24 h lang mit Metformin [2 mM] behandelt. Anschließend wurden sie lysiert und die Luciferaseaktivität wurde gemessen.

Bei Abb. B wurden die unbehandelten Zellen jeweils als Kontrolle gesetzt. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM

Tatsächlich zeigte sich dasselbe Bild wie in den Promotorexperimenten. Eine Überexpression der FoxO-Faktoren führte zu einer Steigerung der Reporterexpression. Diese war wieder zunehmend von FoxO1a zu FoxO4. Die Steigerung der Promotoraktivität gegenüber der Kontrolle betrug dabei circa das 7-8-fache bei FoxO1a, das 15-fache bei FoxO3a und 26-27-fache bei FoxO4. Die Behandlung mit Metformin reduzierte die Aktivität, ähnlich wie das Insulin, bei FoxO1a am stärksten mit circa 40%. Bei den beiden anderen Isoformen, FoxO3a und FoxO4, war auf Grund der Standardabweichung ein Effekt unwahrscheinlich. Am ehesten wäre noch ein Effekt für FoxO3a zu erahnen (Abb. 3.4.1.1 A-B). Der Versuch wurde anschließend mit dem G6Pase-Plasmid wiederholt, um auch dort einen möglichen Einfluss des Metformins zu untersuchen. Die Behandlung war identisch mit der vorherigen für Selp. Bei allen FoxO-Isoformen war wieder insgesamt eine Steigerung der Reporteraktivität im Vergleich zur Kontrolle mit dem Leervektor feststellbar. Die Steigerung der Expression des Reportergens fiel auch hier wieder mit dem circa 200-fache bei FoxO1a am geringsten aus. Bei den beiden anderen Isoformen FoxO3a und FoxO4 nahm die Aktivität um das 300- bzw. 400-fache gegenüber der Kontrolle zu. Lediglich für FoxO1a führte die Metforminbehandlung zu einer Reduktion der Reporteraktivität um circa 20% (Abb. 3.4.1.2 A-B).

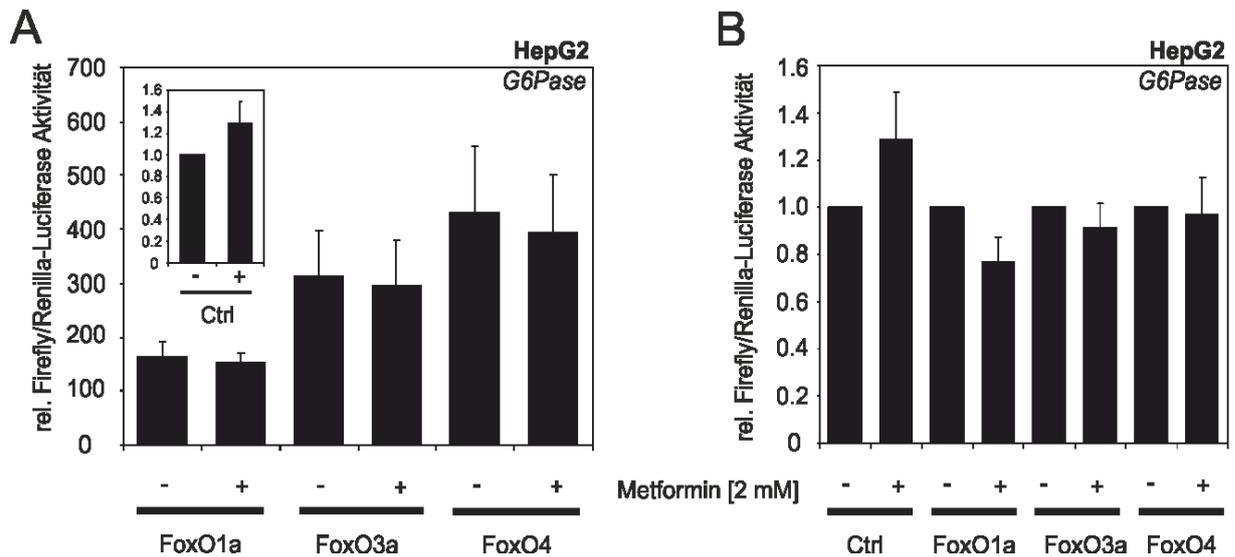


Abb. 3.4.1.2: Einfluss von Metformin auf die Aktivität des G6Pase-Promotors in HepG2-Zellen

Die Zellen wurden mit einer Konfluenz von 60-70% kultiviert und mit einem G6Pase-Luciferasekonstrukt sowie FoxO1-4 Überexpressionsplasmiden (Ctrl: Kontrollplasmid, pNLum) transient transfiziert. Nachdem sie 24 h in serumfreien Medium kultiviert wurden, wurden die Zellen mit Metformin [2 mM] behandelt und weitere 24 h inkubiert. Danach wurden sie lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen.

Bei Abb. B wurden die unbehandelten Zellen jeweils als Kontrolle gesetzt. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

3.4.2 Troglitazon

Als Beispiel für Agenzien aus der Gruppe der Glitazone wurde der Einfluss des mittlerweile nicht mehr zugelassenen, antidiabetischen Medikamentes Troglitazon auf die Promotoraktivität der Zielgene Selp und G6Pase untersucht.

Zu Beginn wurde in drei Experimenten die optimale Konzentration des Troglitazons ermittelt. Dazu wurden die Zellen mit Konzentrationen von 3-30 μ M Troglitazon behandelt und am Folgetag nach circa 24 h Inkubationsphase lysiert. Die Luciferaseaktivität wurde luminometrisch bestimmt. Die Expression des Reportgenkonstrukts nahm wie erwartet nach Überexpression von FoxO-Isoformen unterschiedlich stark zu. Die Troglitazonbehandlung beeinflusste die durch FoxO stimulierte Reporteraktivität in unterschiedlichem Ausmaß. Bei FoxO1a führte die Behandlung mit 10 μ M Troglitazon zu einem circa 20% Anstieg der Aktivität der Luciferase. Dieser Trend setzte sich bei FoxO3a und FoxO4 fort, wo durch 10 μ M Troglitazon eine Steigerung von circa 20% beziehungsweise 40% gegenüber der Troglitazonkontrolle beobachtet werden konnte. Auch hier hatte die geringere Konzentration von 3 μ M keinen Einfluss auf die Expression der Reportergene. Weiterhin zeigte sich, dass der Effekt auch unabhängig von einer Überexpression der einzelnen FoxO-Faktoren war. Denn auch beim Kontrollplasmid konnte durch die Behandlung mit 10 μ M Troglitazon eine Zunahme der

Aktivität der Luciferase von circa 50% beobachtet werden. Dabei lagen jedoch große Standardabweichungen vor. Insgesamt lag bei der Kontrolle, bei FoxO3a und FoxO4 zwar der jeweils größte Effekt bei 30 μ M Troglitazon vor. Diese Konzentration führte jedoch bei der Behandlung zu einem mikroskopisch detektierbaren Zelltod innerhalb der Zellkultur. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche 10 μ M Troglitazon gewählt (Abb. 3.4.2.1 A-B).

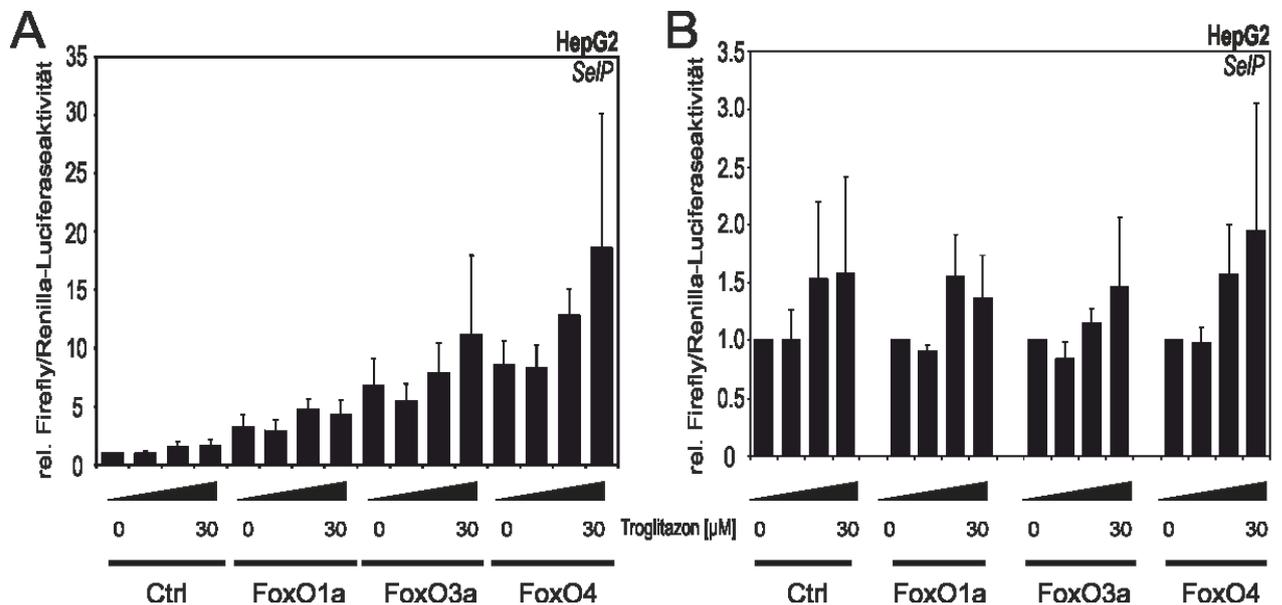


Abb. 3.4.2.1: Einfluss steigender Troglitazonkonzentrationen auf die Aktivität des Selp-Promotors in HepG2-Zellen

Aussaat der Zellen bis zu einer Konfluenz von 60-70% und anschließende transiente Transfektion mit einem Selp-Luciferasekonstrukt sowie den FoxO1-4 Überexpressionsplasmiden (Ctrl: Kontrollplasmid, pnLum. Nach 24h Kultivierung in serumfreien Medium wurden die Zellen mit aufsteigender Troglitazonkonzentrationen [0, 3, 10, 30 μ M] behandelt und weitere 24 h inkubiert. Danach wurden sie lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Bei Abb. B wurden die unbehandelten Zellen jeweils als Kontrolle gesetzt. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

Als nächstes wurde der Versuch mit dem G6Pase-Reportergen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 10 μ M Troglitazon für 24 h behandelt. Neben der schon beschriebenen typischen Steigerung der Aktivität durch die Überexpression der verschiedenen FoxO-Isoformen führte auch hier eine Behandlung mit Troglitazon zu einer gesteigerten Aktivität der Luciferase. Diese fiel hier mit einer mehr als 2,5-fachen Steigerung der Aktivität am größten bei der FoxO3a Überexpression und der Behandlung mit 10 μ M Troglitazon im Gegensatz zur unbehandelten Überexpression aus (Abb. 3.4.2.2 B). Bei den beiden anderen Isoformen war die Expression des Reportergens insgesamt geringer, aber auch hier konnte durch die Behandlung eine Verdoppelung der Aktivität erreicht werden. Bei FoxO1a stieg sie vom circa 50- auf das 100-fache und bei FoxO4a vom 200-fachen zum circa 400-fachen an. Selbst in der Kontrolle mit

dem Leervektor konnte durch die Behandlung eine Steigerung um 50% erreicht werden (Abb. 3.4.2.2 A-B).

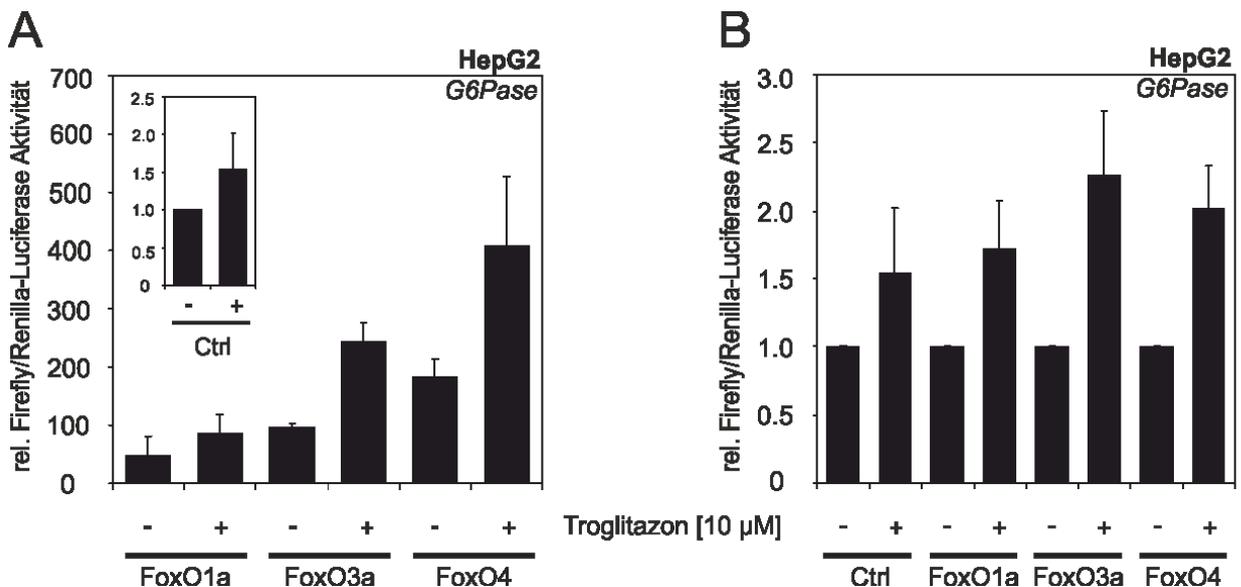


Abb. 3.4.2.2: Einfluss steigender Troglitazonkonzentrationen auf die Expression des Reportergens in HepG2-Zellen

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 60-70% kultiviert und mit einem G6Pase-Luciferasekonstrukt sowie den FoxO1-4 Überexpressionsplasmiden (Ctrl: Kontrollplasmid, pnLum) transient transfiziert. Nachdem sie 24 h in serumfreien Medium kultiviert wurden, wurden die Zellen mit steigenden Troglitazonkonzentrationen [0 – 30 µM] behandelt und weitere 24 h inkubiert. Danach wurden sie lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen.

Bei Abb. B wurden die unbehandelten Zellen jeweils als Kontrolle gesetzt. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ± SEM.

3.4.3 GW9662

Nachdem ein Effekt des Troglitazons auf die Aktivität des Reportergens bei einer Überexpression der FoxO-Faktoren festgestellt wurde, wurde untersucht, ob sich der Effekt mittels eines PPAR γ -Antagonisten abschwächen oder verhindern lässt. Für diesen Zweck wurde GW9662 verwendet. Dabei handelt es sich um einen irreversiblen Antagonisten des Transkriptionsfaktors PPAR γ . Nach einer Behandlung wird die durch Troglitazon vermittelte Aktivierung dieses Faktors verhindert.

Um bei einer Behandlung von Troglitazon und GW9662 eine Eigenaktivität des Inhibitors auszuschließen, wurden die HepG2-Zellen mit dem SelP-Plasmid und jeweils mit dem Leervektor (pnLum) und mit FoxO3a transfiziert und anschließend mit GW9662 behandelt. FoxO3a wurde eingesetzt, da in den Vorversuchen (Abb. 3.4.2.1) bei dieser Isoform die Be-

handlung mit Troglitazon die geringste Standardabweichung hatte. Das Protokoll war identisch mit den vorhergehenden Behandlungen. Beim Leervektor (pnLum) stieg die Aktivität des Reportergens bei zunehmender Konzentration des Inhibitors an. Bei der höchsten Konzentration von 30 μM betrug die Reportergenaktivität das 1,5-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.4.3.1 A). Auch bei der Überexpression von FoxO3a zeigte sich eine Zunahme der Aktivität bei steigenden Konzentrationen des Inhibitors. Auch hier war mit der 2,5-fachen Steigerung bei 30 μM GW9662 das Maximum erreicht (Abb. 3.4.3.1 B).

Damit führte eine Behandlung mit GW9662 auch zu einer Aktivitätssteigerung des Selp-Promotors und es konnte von einer „Eigenaktivität“ ausgegangen werden. Somit war vor den weiteren Experimenten mit Troglitazon und GW9662 ein möglicher Einfluss des GW9662 auf die Reportergenaktivität nicht auszuschließen.

Zum Abschluss wurden die Zellen mit Troglitazon und dem PPAR γ -Antagonisten behandelt um einen möglichen Wirkungsmechanismus des Troglitazons zu hemmen. Dazu wurden HepG2-Zellen zuerst mit dem Selp-Plasmid und FoxO3a transfiziert und anschließend mit einer jeweils aufsteigenden Konzentration von Troglitazon (0 - 30 μM) und GW9662 (0 - 30 μM) für 24 h behandelt. Als Referenz diente die jeweilige GW9662 Konzentration ohne Troglitazon. Die Expression des Reportergens betrug ohne Antagonisten erneut wieder circa 20% bzw. 30% bei 10 μM und 30 μM Troglitazon (Abb. 3.4.3.2).

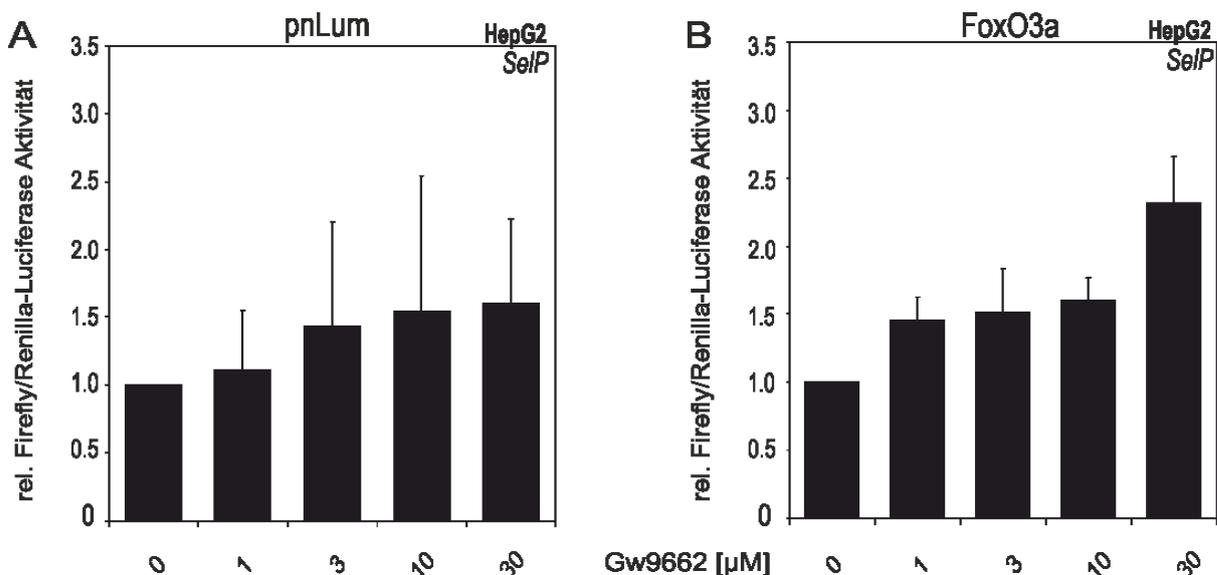


Abb. 3.4.3.1: Einfluss steigender GW9662-Konzentrationen auf die Aktivität des Selp-Promotors in HepG2-Zellen

Nachdem die Zellen bis zu einer Konfluenz von 60-70% ausgesät wurden, wurden sie mit einem Selp-Luciferasekonstrukt sowie dem Kontrollplasmid, pnLum transient transfiziert. Nach einer 24-stündigen „Aushungierung“ in serumfreiem Medium wurden die Zellen mit steigenden GW9662-Konzentrationen [0 - 30 μM] behandelt und weitere 24 h inkubiert. Danach fand die Lyse statt und die Luciferaseaktivität wurde gemessen. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

Interessanterweise führte die Zugabe des Inhibitors nicht zu der erwarteten Reduktion der Reporterogenaktivität. Selbst eine Konzentration von 3 μM GW9662 führte bei den mit 10 μM und 30 μM Troglitazon behandelten HepG2-Zellen entgegen den eigentlichen Erwartungen zu einer leichten Steigerung der Reporterogenaktivität um 10-20% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Den höchsten Einfluss zeigte der Antagonist bei einer Konzentration von 10 μM bzw. 30 μM und der Zugabe von 10 und 30 μM Troglitazon. Bei 10 μM GW9662 stieg die Aktivität des Reportergens bei der Zugabe von 10 μM und 30 μM Troglitazon um circa 50-60% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ein ähnlicher Einfluss zeigte sich auch bei der höchsten GW9662 Konzentration von 30 μM . Auch dort kam es bei der Behandlung mit 10 μM und 30 μM Troglitazon zu einem Anstieg der Expression der beiden Luciferasen um circa 80% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.4.3.2).

Zusammenfassend zeigte sich, dass der Troglitazoneffekt der Aktivitätssteigerung des Reportergens durch den PPAR γ -Inhibitor GW9662 mit keiner der eingesetzten Konzentrationen aufzuheben war. Im Gegenteil, steigenden GW9662-Konzentrationen führten noch zu einer verstärkten Aktivität des Reportergens.

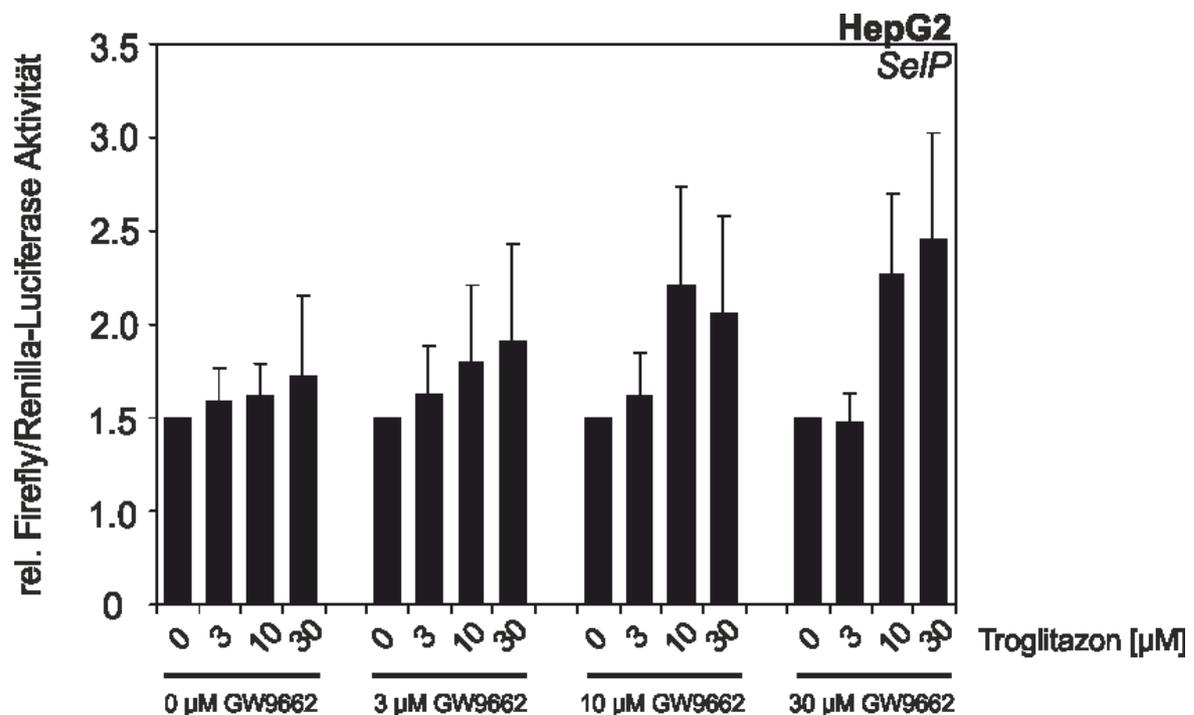


Abb. 3.4.3.2: Einfluss steigender GW9662-Konzentrationen auf die Aktivität des Selp-Promotors in HepG2-Zellen

Die Zellen wurden mit einer Konfluenz von 60-70% kultiviert und mit einem Selp-Luciferasekonstrukt sowie dem FoxO3-Plasmid transient transfiziert. Nachdem sie 24 h in serumfreien Medium ausgehungert wurden, wurden die HepG2 mit steigenden GW9662- und Troglitazonekonzentrationen [0 - 30 μM] behandelt und weitere 24 h inkubiert. Danach wurden sie lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

4. Diskussion

4.1 Bedeutung der unterschiedlichen FoxO-Isoformen für SelP/G6Pase/MnSOD

SelP, G6Pase und MnSOD stehen unter der Regulation der FoxO-Isoformen (Hill et al., 1996; Van de Werve et al., 2000; Kops et al., 2002). Es ist bekannt, dass die FoxO-Faktoren auf mRNA-Ebene zu einer Steigerung der mRNA-Spiegel der FoxO-Zielgene führen können (Speckmann et al., 2008). Im Rahmen der Dissertation sollte der Einfluss auf Promotorebene untersucht werden.

Für alle drei untersuchten Zielgene, dem SelP, der G6Pase und der MnSOD, zeigte sich, dass eine Überexpression der FoxO-Isoformen zu einer Steigerung der Promotoraktivität des Reportergens führte (siehe Abb. 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.3). Somit ist auf Promotorebene ebenfalls eine Regulation möglich. Die Steigerung der Promotoraktivität fiel jedoch für die drei Zielgene sehr unterschiedlich aus. Bei Zellen, welche mit der Promotorregion des SelP-Plasmids transfiziert wurden, führte eine Überexpression der drei FoxO-Isoformen zu einer Steigerung der Aktivität des Reportergens (siehe Abb. 3.1.1). Ähnliche Ergebnisse, bzw. eine minimale Steigerung in Bezug auf die SelP-Versuche, ließen sich bei der Aktivität des MnSOD Promotors feststellen (siehe Abb. 3.1.3). Eine Transfektion der HepG2-Zellen mit Plasmiden hingegen, welche die Promotorregion der G6Pase und der drei Isoformen enthielten, führte auf Promotorebene zur stärksten Steigerung. Die ermittelte Renilla/Luciferase-Aktivität lag dort bei allen Isoformen um das circa 20-fache über den Werten der beiden anderen Zielgene. Somit besteht auf Promotorebene ein unterschiedlich großer Einfluss der verschiedenen FoxO-Überexpressionen auf deren Aktivität (siehe Abb. 3.1.2).

Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die FoxO-Faktoren innerhalb der Zellen von erheblich größerer Bedeutung für die Glukosehomöostase, in Form der G6Pase, sind, als für die beiden anderen Zielgene. Findet eine Überexpression der einzelnen Faktoren statt, kommt es zu einer vermehrten Bindung an die Promotorregion des Zielgens und damit zu einer Expression des Reportergens. Weiterhin wäre es denkbar, dass eine genauere Regulation des Zielgens G6Pase auf der Promotorebene im Gegensatz zur SelP und der MnSOD stattfindet. Greift man somit in die Regulation durch eine Überexpression der FoxO-Faktoren ein, kommt es zu einer verstärkten Aktivität des G6Pase-Promotors und damit zu einer Expression des Reportergens.

Interessanterweise führte eine Überexpression der einzelnen Isoformen auf mRNA-Ebene mit

einer im Vergleich zu den Reporterexperimenten erhöhten Plasmidmenge von 6 μg ebenfalls bei der G6Pase zu stark erhöhten mRNA-Spiegel im Vergleich zu den beiden anderen Zielgenen (Abb. 3.3.1 B).

Eine weitere mögliche Ursache wäre die Kultivierung der Zelllinie. Die HepG2-Zellen wurden in einem Zellkulturmedium mit einer Glukosekonzentration von 25 mM kultiviert. Es ist bekannt, dass bei dieser Glukosekonzentration die Zellen einem diabetischen Zustand ausgesetzt sind. Unter diesem konnte auf mRNA-Ebene in früheren Publikationen ohne FoxO-Überexpression eine Steigerung der Spiegel für das Selp um das doppelte und der G6Pase um das bis zu 6-fache beobachtet werden (Speckmann et al., 2009). Somit bewirkt eine Überexpression der FoxO-Isoformen anscheinend eine noch größere Steigerung der Spiegel.

Neben der generellen Steigerung der Promotoraktivität bei Überexpression der FoxO-Isoformen bei allen drei Zielgenen galt es als weiteres festzuhalten, dass die Expression des Reportergens am stärksten durch eine Überexpression des FoxO4 vor FoxO3a und schließlich FoxO1a gesteigert wurde.

Eine Ursache dafür könnte eine unterschiedliche Konzentration der einzelnen FoxO-Faktoren innerhalb der Zelle sein. So wäre es möglich, dass die Spiegel von FoxO1a im Normalzustand der Zelle deutlich höher sind, als bei FoxO3a oder FoxO4. Der Einfluss der drei Faktoren ist damit bei einer Überexpression sehr unterschiedlich. Eine Erhöhung der FoxO4 Spiegel könnte somit einen viel größeren Einfluss auf die Bindung in der Promotorregion besitzen als es bei FoxO1a oder FoxO3a der Fall wäre. Neben der unterschiedlichen Konzentration wäre es ebenfalls möglich, dass die Affinität zur Bindestelle am Promotor unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Bindet FoxO4 stärker an der Promotorregion des Zielgens als FoxO1a, könnte es so ebenfalls zu einer gesteigerten Reporterexpression kommen.

Im Anschluss wurde mittels qRT-PCR der Einfluss einer Überexpression der FoxO-Faktoren auf mRNA-Ebene betrachtet. Dort bestand bei identischer Konzentration der FoxO-Plasmide, wie in den Reporterexperimenten, von 0,75 μg lediglich für das Selp bei der FoxO1a- und FoxO3a-Überexpression die Tendenz zu einem erhöhten mRNA-Spiegel. Bei den beiden anderen Zielgenen war kein Einfluss einer Überexpression auf die mRNA-Spiegel sichtbar. Erstaunlicherweise konnte bei einer Überexpression mit 6 μg FoxO-Plasmid hingegen der mRNA-Spiegel der G6Pase um das 3-fache erhöht werden. Dies könnte dafür sprechen, dass der Einfluss der FoxOs auf die G6Pase innerhalb der Zelle größer ist und sie sehr viel genauer durch die FoxOs reguliert werden kann. Die Zelle würde dann bei unphysiologischen Kon-

zentrationen erheblich sensitiver auf Veränderungen der Konzentration reagieren als bei SelP oder MnSOD. Auf mRNA-Ebene bestand ebenfalls die Tendenz dazu, dass eine Überexpression des Faktors FoxO1a den größten Einfluss vor den beiden anderen Faktoren auf die G6Pase hat. Es ist bekannt, dass FoxO1a durch ein Zusammenspiel mit PGC-1 α sehr wichtig für die Glukosehomöostase ist (Puigserver et al., 2003). Somit wäre es denkbar, dass bei einer unphysiologischen Erhöhung der FoxO1a-Konzentration innerhalb der Zellen der Einfluss auf die G6Pase am größten ist. In früheren „Knock-Out“ Versuchen zeigte sich ebenfalls, dass FoxO1a den größten Einfluss auf die Expression der G6Pase hat im Vergleich mit den beiden anderen Faktoren FoxO3a und FoxO4 (Zhang et al., 2011). Für die beiden anderen Zielgene SelP und MnSOD bestand kein Unterschied bei der qRT-PCR zwischen der niedrigen und hohen Plasmidkonzentration. So wäre es denkbar, dass eine Überexpression der FoxOs auf mRNA-Ebene für die beiden Zielgene keinen Einfluss hat (Abb. 3.2.1 A-C).

Nachdem eine Steigerung der Aktivität des Reportergens durch eine FoxO-Überexpression für alle drei Zielgene auf Promotorebene gezeigt werden konnte, sollte als nächstes die Möglichkeit der Modulation durch Insulin näher betrachtet werden.

Aus vorherigen Untersuchungen ist bekannt, dass die FoxO-Faktoren unter dem Einfluss der Akt und damit des Insulins stehen (Brunet et al., 2008). Auch wurde schon gezeigt, dass eine Insulinbehandlung die Promotoraktivität des FoxO-Zielgens G6Pase negativ beeinflusst (Eckers, 2009).

Dieser Einfluss ließ sich für das FoxO-Zielgen SelP auf Promotorebene in der vorliegenden Arbeit bestätigen. Die Promotoraktivität des SelP ließ sich durch eine Insulinbehandlung auf circa 40-50% des Ausgangswerts für die Kontrolle (pnLum) und die FoxO1a-Überexpression senken (siehe Abb. 3.1.1). Ein ähnlicher, aber schwächerer Effekt, ließ sich bei der G6Pase ebenfalls für FoxO1a feststellen. Dort betrug dieser allerdings nur circa 20-25% im Vergleich zur Kontrolle. Auch hier konnte durch eine Behandlung mit Insulin die Aktivität des Reportergens in der Kontrolle um circa 30% herabreguliert werden (siehe Abb. 3.1.2).

Somit konnte die Vermutung bestärkt werden, dass eine Regulation des SelPs und der G6Pase durch Insulin auf Promotorebene stattfindet. Für die Darstellung des Effektes war noch nicht mal eine Überexpression der einzelnen Faktoren nötig, denn er konnte direkt in der Kontrolle (pnLum) beobachtet werden. Die gesteigerte Expression des Reportergens ließ sich innerhalb der drei FoxO-Isoformen jedoch nur bei der FoxO1a-Überexpression mit Insulin hemmen.

Eine Ursache dafür ist die Tatsache, dass die Expression von SelP durch FoxO1a mittels PGC-1 α mitreguliert wird. Neben FoxO1a steht auch PGC-1 α unter dem Einfluss der Akt (Vega et

al., 2000, Puigserver et al. 2003). Somit könnte die Promotoraktivität von Selp durch eine Behandlung mit Insulin an zwei Stellen herabreguliert werden. Da der oben erwähnte Transkriptionsfaktor PGC-1 α auch einen Einfluss auf die Glukoneogenese hat, würde es die bei den Experimenten für die G6Pase ebenfalls festgestellte Herabregulierung bei FoxO1a erklären (Puigserver et al., 2003; Oberkofler et al., 2004). Eine weitere mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass FoxO1a im Moment den größten bekannten Einfluss der drei Isoformen auf die Glukosehomöostase besitzt und somit für die Regulation der G6Pase von Bedeutung ist (Zhang et al. 2011).

Für die beiden anderen FoxO-Isoformen hingegen konnte für keines der drei untersuchten Zielgene eine Abschwächung der Expression der Reportergene durch eine Insulinbehandlung erreicht werden. Es scheint somit, dass die Bindung von FoxO3a und 4 an die Promotoren der drei Zielgene und damit der Aktivierung unabhängig von einer Insulinbehandlung ist. Möglicherweise könnte die Kultivierung der HepG2-Zellen einen Einfluss auf die Insulinbehandlung und damit die Promotoraktivität haben. Durch die hohe Konzentration von 25 mM Glucose im Zellkulturmedium lag ein diabetischer Zustand vor, unter welchem die Zellen ähnlich dem Diabetes eine Insulinresistenz entwickelt haben könnten. Da jedoch der Faktor FoxO1a durch die Interaktion mit PGC-1 α am stärksten unter der Regulation der Akt steht (Puigserver et al., 2003), konnte dort der stärkste Effekt erzielt werden, wohingegen Faktor FoxO3a und 4 nicht mehr reguliert werden konnten. Für FoxO1a ist ebenfalls bekannt, dass bei einer Insulinresistenz die Phosphorylierung des Faktors vermindert und die Expression der G6Pase gesteigert ist (Barthel et al., 2005). Ebenso konnte in einer früheren Publikation gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität des FoxO1a zu einer reduzierten Regulation durch Insulin führt (Qu et al., 2006). Die unphysiologisch hohe Konzentration der FoxO-Faktoren könnte so zum einen den Insulineffekt reduzieren bei FoxO1a oder sogar für die Faktoren FoxO3a und FoxO4 aufheben. Weiterhin könnten die erhöhten Glukosekonzentrationen zum anderen eine Insulinresistenz auslösen und so die Phosphorylierung der Faktoren reduzieren. Dies könnte dann erneut den fehlenden Insulineffekt für die Faktoren FoxO3a und FoxO4 erklären.

Als Ursache der fehlenden Wirkung der Insulinbehandlung auf Promotorebene für das zuletzt analysierte Zielgen der FoxO-Familie, der MnSOD könnte womöglich der Grund sein, dass sich auf Promotorebene die für die Zelle so wichtigen Schutzmechanismen vor oxidativem Stress, wie die MnSOD, nicht nur durch eine Insulinbehandlung hemmen lassen. Ebenso müssen möglicherweise erst weitere Mechanismen im Hintergrund gehemmt werden, bevor ein Effekt auf Promotorebene zu erreichen ist.

4.2. Einfluss des Beta-Catenins in Hepatomzelllinien

Auf Grund der Immortalisierung kommt es innerhalb der einzelnen Zelllinien zu weitreichenden Mutationen. So ist eine bekannte Mutation innerhalb der HepG2-Zelllinie die Störung des β -Catenin Abbaus und in der Folge eine Akkumulation innerhalb der HepG2-Zellen (de la Coste et al., 1998). Aus diesem Grund wurden die Reporterexperimente für den Promotor des SelPs in der Zelllinie HuH7 wiederholt. Für diese Zelllinie sind keine Mutationen im Bereich des β -Catenins bekannt.

Erstaunlicherweise war die Zunahme der Aktivität des Reportergens für den SelP-Promotor bei der Überexpression der FoxO-Isoformen innerhalb der HuH7-Zellen zur Hälfte reduziert im Vergleich zu den HepG2-Zellen (siehe Abb. 3.2.1). Eine Ursache dafür könnten die dauerhaft erhöhten β -Catenin-Spiegel auf Grund des verminderten Abbaus innerhalb der HepG2 sein. So ist bekannt, dass wenn dauerhaft erhöhte β -Catenin-Spiegel innerhalb der Zellen vorliegen, sie gemeinsam mit den FoxO-Faktoren an der Promotorregion binden können und so die Möglichkeit haben die Expression der FoxO-Zielgene zu steigern (Manolagas und Almeida, 2007).

Interessanterweise führte bei den HuH7-Zellen eine Überexpression der FoxO-Isoformen bei FoxO3a zur größten Aktivität im Vergleich der drei FoxOs. Dies ist im Gegensatz zu den HepG2-Zellen auffallend, da dort immer FoxO4 die größte Aktivität besaß. So hat innerhalb der HepG2s möglicherweise FoxO4 die größte Affinität zu β -Catenin. Liegen nun, wie in den HuH7-Zellen wahrscheinlich, physiologischere β -Catenin-Spiegel vor, hat möglicherweise eine FoxO3a-Überexpression den größeren Einfluss auf die Aktivität der Promotorregion des SelPs.

Um einen möglichen Effekt des β -Catenin auf die Expression der Reportergene genauer zu untersuchen, wurden die Zellen mit Lithiumchlorid behandelt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Lithiumchlorid bei HuH7-Zellen zur Hemmung der GSK3- β führt und somit die Degradation des β -Catenins im Cytosol gestoppt wird (Erdal et al., 2005). Somit konnte innerhalb der HuH7-Zellen, ähnlich wie bei den HepG2-Zellen, eine Überaktivierung dieses Stoffwechselwegs erreicht werden. Eine Lithiumchloridbehandlung führte in der Tat zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität des TOP-Flash Reportergens (siehe Abb. 3.2.2). Da dort ein Konstrukt aus β -Catenins/TCF binden kann, konnte somit eventuell durch die Behandlung die Aktivität des β -Catenin innerhalb der Zellen gesteigert werden. Ebenfalls wurde deutlich, dass in der mutierten Promotorregion des FOP-Flashs auch eine Behandlung mit Lithiumchlo-

rid keine Bedeutung für die Expression der Reportergene hatte. Auf die Expression der Reportergene des Selp-Plasmides konnten hingegen leider auch eine Behandlung mit Lithiumchlorid, und damit eine mögliche Erhöhung des β -Catenins, keinen Einfluss nehmen. Die Ursache für die unterschiedlichen Expressionslevel zwischen den beiden Zelllinien ließ sich also nicht durch eine solche Behandlung ausgleichen.

Zur Untersuchung eines Einflusses des Insulins auf die Reporterogenaktivität wurden die HuH7-Zellen ebenfalls mit Insulin behandelt (siehe Abb. 3.2.4). Dabei konnte jedoch bei keiner der drei FoxO-Isoformen eine Senkung der Reporterogenaktivität beobachtet werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte allerdings eine dauerhafte Überaktivierung der Akt innerhalb der HuH7-Zellen sein (Erdal et al., 2005). Um den Einfluss der Überaktivierung zu mindern und zu erkennen, ob ein möglicher Effekt der Behandlung mit Insulin ausgelöst werden kann, wurden die Zellen erneut mit Lithiumchlorid behandelt. Mittels LiCl wird jedoch nicht nur, wie schon erwähnt, der Abbau des β -Catenin reduziert, sondern auch auf bisher unbekannter Weise die Aktivität der Akt gehemmt (Erdal et al., 2005). Die mit Hilfe der Experimente gewonnenen Daten waren jedoch nicht signifikant. So deutete sich nur eine Tendenz zu einer leichten Abnahme der Aktivität der Reportergene nach der Insulinbehandlung an (siehe Abb. 3.2.4). Hierbei ist jedoch zu bedenken, ob mittels der Behandlung mit Li^+ nicht einfach eine Inaktivierung der Akt stattgefunden hatte und somit überhaupt keine Wirkung des Insulins beobachtet werden konnte.

4.3 Bedeutung der FoxO-Kaskade auf Antidiabetika

Nach Betrachtung des Einflusses des Insulins auf die FoxOs wurde in der Arbeit der Zusammenhang der FoxO-Kaskade auf die beiden Antidiabetika Metformin und Troglitazon näher beleuchtet.

Das Medikament Metformin wird weltweit zur Diabetes mellitus Typ 2 Therapie eingesetzt. Pharmakologisch verbessert es die Wirkung des Insulins an dessen Zielzellen und es vermindert die Glukoneogenese innerhalb der Leber (Hundal et al., 2000; Gianarell et al., 2003). Dies alles geschieht jedoch über einen Akt unabhängigen Weg über die AMPK (Morioka et al., 2005). Aus früheren Publikationen ist der hemmende Einfluss von Metformin auf mRNA-Ebene auf die Selp-Bildung bereits bekannt (Speckmann et al., 2009).

Auf Promotorebene bestätigte sich die dieselbe Tendenz. Ein Effekt durch die Behandlung mit

Metformin war in der FoxO1a-Überexpression mit einer Hemmung um circa 30-40% im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Für die beiden anderen Überexpressionen FoxO3a und FoxO4 und den Leervektor (pnLum) hingegen war jedoch kein Effekt auszumachen (siehe Abb. 3.4.1.1).

Innerhalb des Körpers unterliegt Selp wahrscheinlich einer ähnlichen Regulation wie Enzyme des Glukosestoffwechsels. Dies könnte daraufhin deuten, dass die Regulation ähnlich wie für die G6Pase unterschiedlich stark durch die verschiedenen Isoformen der FoxO-Faktoren reguliert werden kann. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist der Einfluss des Faktors FoxO1a am besten für die Glukosehomöostase untersucht worden. Weiterhin ist ebenfalls schon länger bekannt, dass FoxO1a die Aktivität des Selps auf mRNA-Ebene steigern kann (Speckmann et al., 2008). So ist es auch hier möglich, dass der Einfluss des Metformins am größten auf die Bindung des FoxO1a an die Promotorregion ist und dementsprechend die Expression des Reportergens am stärksten vermindert. Weiterhin ist aus einer früheren Publikation bekannt, dass der Abbau von FoxO1a durch eine Aktivierung der AMPK und damit Metformin gefördert werden kann (Barthel et al., 2002). Somit würde die verminderte Aktivität des Reportergens bei FoxO1a auf einem reduzierten FoxO1a-Spiegel beruhen. Ebenfalls wäre es denkbar, dass der eigentliche Effekt der Metforminbehandlung auf Grund der Überexpression vermindert ausfällt.

Bei den beiden anderen Faktoren konnte auf Promotorebene die Aktivität des Reportergens durch eine Metforminbehandlung nicht vermindert werden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass eine Aktivierung der AMPK zu einer gesteigerten Aktivität von FoxO3a führen kann (Greer et al., 2007). Weiterhin zeigten Takayama et al 2014, dass eine Metforminbehandlung zu einer verminderten Expression des Selps durch FoxO3a führt. Jedoch wird dieser Effekt durch eine Überexpression von FoxO3a wieder aufgehoben. Somit könnte eine mögliche Ursache für den fehlenden Effekt der Metforminbehandlung auf die Faktoren FoxO3a und FoxO4 zum einen in dem unterschiedlichen Einfluss der AMPK und zum anderen in der Überexpression der Faktoren liegen. Weiterhin könnte in der fehlenden bzw. geringeren Rolle der beiden Faktoren FoxO3a und FoxO4 für den Glukosestoffwechsel eine Ursache liegen. Es ist zu vermuten, dass der Einfluss der FoxO-Faktoren auf die Glukoneogenese in der Leber innerhalb der einzelnen Isoformen unterschiedlich ausgeprägt ist. In einer älteren Veröffentlichung wurde auf die Tatsache hingewiesen, dass insbesondere der Faktor FoxO1a für die Aktivierung der Promotorregion der G6Pase von Bedeutung ist (Zhang et al., 2012). Ferner könnte das verwendete Medium einen Einfluss haben. Es enthält mit 25 mM Glucose eine deutlich erhöhte Menge an Glucose im Gegensatz zu physiologischen Zuständen. Die physio-

logische Glukosekonzentration im Plasma bei einem Menschen beträgt circa 4,4 bis 5,6 mM. Ab Werten über 11,1 mM spricht man von einem Diabetes mellitus (American Diabetes Association, 2008).

In einer bereits veröffentlichten Publikation zeigte sich, dass bei hyperglykämien Zuständen die Expression der SelP im Gegensatz zur Kontrolle auf mRNA-Ebene stark erhöht ist und dass diese Erhöhung sich durch eine Behandlung mit Metformin reduzieren lässt (Speckmann et al., 2009). Ebenfalls ist schon länger bekannt, dass diese erhöhten SelP-Spiegel zu erhöhten Selenspiegeln und letztendlich zu einem erhöhten Risiko des Diabetes mellitus Typs 2 führen können (Bleys et al., 2007). Weiterhin können erhöhte Level des Transkriptionsfaktors PGC-1 α , welche bei einem diabetischen Zustand vorliegen können, innerhalb der Zelle die SelP Aktivität steigern (Yoon et al., 2001, Speckmann et al., 2008). Somit wäre der große Einfluss des Metformins auf den Promotor des SelPs innerhalb der Kontrolle und der FoxO1a-Überexpression zu erklären.

Abschließend ist es aber ebenfalls vorstellbar, dass nur in *in vitro* Experimenten mittels Überexpression aller FoxO-Faktoren die Steigerung der Expression der Reportergene für alle Faktoren durchführbar ist. Da jedoch *in vivo* nur der Faktor FoxO1a eine gewichtige Rolle für die Glukosehomöostase spielt, lässt sich dieser in den Experimenten möglicherweise auch nur auf Promotorebene durch Metformin herabregulieren. Daher wäre die Wirkung des Metformins über die AMPK nur auf den Faktor FoxO1a bzw. dessen Co-Faktor PGC-1 α möglich. Ebenso könnten die beiden anderen Faktoren vielleicht die Expression der G6Pase auf Promotorebene steigern, aber durch andere Einflüsse später reguliert werden. Interessanterweise ergab sich für das FoxO-Zielgen G6Pase auf Promotorebene jedoch folgendes Bild. Eine Behandlung mit Metformin hatte lediglich eine Reduktion der Expression des Reportergens bei der FoxO1a-Überexpression zur Folge und keinen Effekt für die Kontrolle (pnLum) und die FoxO3a- und FoxO4-Überexpressionen. Dies deckt sich teilweise mit in der Vergangenheit erhobenen Daten, in denen auf mRNA-Ebene eine Reduktion der G6Pase durch eine Metforminbehandlung erreicht werden konnte (Speckmann et al., 2009). Der fehlende Effekt der Metforminbehandlung in der Kontrolle lässt sich vielleicht mit den unterschiedlichen Bedingungen erklären. In der vorliegenden Arbeit wurden im Vergleich zur Publikation, in der primäre Rattenhepatozyten verwendet wurden, humane Hepatozyten (HepG2) benutzt. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass eine Regulation der Expression der G6Pase durch das Metformin erst nach der Promotorebene stattfindet. Dies könnte die Unterschiede für die Kontrolle (pnLum) im Vergleich zur Publikationen von Speckmann et al erklären (siehe Abb. 3.4.1.2 A-B).

Neben dem oralen Antidiabetikum Metformin wurde auch die Bedeutung des Troglitazon auf die FoxO-Kaskade untersucht, da der Wirkmechanismus sich unterscheidet.

Der Wirkstoff Troglitazon gehört zur Klasse der Glitazone. Die antidiabetische Wirkung entfaltet der Wirkstoff im Gegensatz zum Metformin über eine agonistische Wirkung am PPAR γ -Rezeptor (Fujiwara und Horikoshi, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von Troglitazon auf die Promotoraktivität von zwei FoxO-Zielgenen untersucht, dem Selp und der G6Pase.

Erstaunlicherweise konnte dabei in allen durchgeführten Experimenten eine Steigerung der Promotoraktivität der beiden FoxO-Zielgene festgestellt werden. Der Effekt ließ sich in der Kontrolle sowie in den jeweiligen Überexpressionen beobachten. Insgesamt schien es, als dass der Einfluss durch die Behandlung mit Troglitazon von der Kontrolle über FoxO1a bis FoxO4 zunahm (siehe Abb. 3.4.2.1 und 3.4.2.2). Dies ist eigentlich zuerst widersprüchlich zu den vorhandenen Daten. Denn eine alleinige Aktivierung des oben genannten Rezeptors führt eigentlich zu einer Herabregulierung der FoxO-Aktivität. Im Gegensatz dazu kommt es bei gesteigerter FoxO-Eigenaktivität zu einer Senkung der PPAR γ -Aktivität (Dowell et al., 2003). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Glitazone neben einer antidiabetischen Komponente, insbesondere des Troglitazon, noch eine antiinflammatorische und antioxidative Wirkung besitzen (Ricote et al., 1998; Crawford et al., 1999). Die antiinflammatorische Komponente der Glitazone wird unter anderem über eine Herabregulierung der Aktivität der I κ K mittels des PPAR γ -Stoffwechselweges vermittelt (Straus et al., 2000).

Diese Hemmung vermindert möglicherweise die Degradation der FoxO-Faktoren innerhalb der Zellen und die Bindung der FoxO-Faktoren an die Promotorregion der Zielgene kann gesteigert werden. Dieser Nebenweg der Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors könnte somit für die Wirkung verantwortlich sein. Um diesen möglichen Einfluss zu betrachten wurde versucht, den PPAR γ -Rezeptor mittels eines Antagonisten zu blockieren (siehe Abb. 3.4.3.2). Dabei fiel auf, dass der Troglitazoneffekt der gesteigerten Expression der Reportergene durch eine steigende Konzentration des Antagonisten GW9662 nicht verringert wurde. Es deutete sich eher an, dass der Effekt der gesteigerten Expression der Reportergene ab den Konzentrationen von 10 μ M und 30 μ M des Antagonisten weiter zunimmt. Die weitere Zunahme der Aktivität der Reportergene sollte somit unabhängig vom Weg über die Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors sein, denn dieser sollte irreversibel blockiert worden sein (Davies et al., 2001). Zur Untersuchung einer möglichen Eigenaktivität des Antagonisten wurden die Zellen nur mit dem Antagonisten und dem Kontroll- bzw. dem FoxO3a-Plasmid behandelt (siehe

Abb. 3.4.3.1 A-B). Dort fiel eine dezente Steigerung der Aktivität auf. So ließe diese möglicherweise auf eine gewisse Eigenaktivität des Antagonisten innerhalb der Zellen schließen. In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls denkbar, dass durch eine alleinige Aktivierung der anderen PPAR-Signalkaskaden, insbesondere der PPAR α -Kaskade, es zu einer Steigerung der Aktivität des Promotors bei den FoxO-Überexpressionen kommt. Dies würde sich mit den Ergebnissen aus früheren Publikationen decken. Es ist bekannt, dass Troglitazon neben einer agonistischen Wirkung am eigentlich Ziel, dem PPAR γ -Rezeptor, auch noch eine schwach agonistische Wirkung auf den PPAR α -Rezeptor besitzt (Memon et al., 2000). Der Faktor PGC-1 α , welcher mit PPAR α interagiert und synergistisch arbeitet (Vega et al., 2000), könnten so verstärkt werden. Die Kombination aus PGC-1 α und FoxO1a könnte dann, wie weiter oben schon ausgeführt, zu einer Steigerung der Promotoraktivität führen. Dies würde jedoch nicht die Zunahme der Induktion der Reportergene für die beiden anderen FoxO-Faktoren, FoxO3a und FoxO4, erklären. Eine Ursache für die Steigerung der Expression der Reportergene ist möglicherweise ein erhöhter Basalspiegel der FoxO-Faktoren innerhalb der HepG2-Zellen durch die eigentliche Behandlung. Es ist bekannt, dass durch eine Behandlung mit Troglitazon mit hohen Konzentrationen eine Apoptose ausgelöst wird. Dieser Effekt nimmt ab 10 bis 20 μ M stark zu (Zhou et al., 2008). Bei diesen Werten wurde in dieser Arbeit auch der größte Einfluss des Troglitazons beobachtet. Da alle FoxO-Faktoren eine apoptosefördernde Wirkung haben, könnte Troglitazon diese Wirkung verstärken. Dies würde die zunehmende Wirkung bei der steigenden Konzentration auf die Expression möglicherweise erklären. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Troglitazon auf Promotorebene erstaunlicherweise zu einer Zunahme der beiden FoxO-Zielgene Selp und G6Pase führt. Der Effekt lässt sich durch einen PPAR γ -Antagonisten nicht aufheben, sodass der genaue Mechanismus dieser Zunahme weiterhin unklar bleibt.

5. Zusammenfassung

Die Regulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren erfolgt auf vielen Ebenen innerhalb des Zellstoffwechsels. Eine Schlüsselrolle nimmt dabei die Akt/PKB ein. Diese Proteinkinase wird mittels Insulin reguliert und reduziert mittels Phosphorylierung die Aktivität der FoxO-Faktoren. Dies führt zu einer verringerten Aktivität der Zielgene z. B. Selp, G6Pase und MnSOD. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Überexpression der FoxO-Faktoren zu einer gesteigerten Aktivität der Promotoren von Selp, G6Pase und MnSOD führte. Dafür wurden HepG2-Zellen transient mit Plasmiden der Promotorregion der Zielgene sowie FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 transfiziert. Dabei zeigte sich, dass der Faktor FoxO4 den stärksten Einfluss auf die Aktivität der Promotoren im Gegensatz zu FoxO3a und FoxO1a hatte. Ebenfalls fiel die Aktivitätssteigerung des G6Pase-Promotors im Vergleich zu Selp und MnSOD erheblich stärker aus. Eine Ursache dafür könnte eine unterschiedlich starke Affinität der FoxO-Isoformen zur jeweiligen Promotorregion sein und das der größte Einfluss der FoxO-Faktoren auf den Glukosestoffwechsel besteht. Auf mRNA-Ebene konnte mittels Überexpression der FoxOs lediglich für die G6Pase eine Zunahme der rel. mRNA-Spiegel gezeigt werden. Weiterhin wurde der Einfluss einer Insulinbehandlung auf die Promotoraktivität für die drei Zielgene untersucht. Lediglich für Selp und G6Pase zeigte sich eine Abnahme der Reporterengenaktivität bei der Kontrolle und FoxO1a-Überexpression. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der synergistischen Wirkung von FoxO1a und PGC-1 α liegen. Ebenfalls ist der Einfluss einer Insulinbehandlung bei diabetischen Zuständen im Zellkulturmedium auf FoxO3a und 4 und deren Aktivität auf die Promotoren der Zielgene vermindert. Ein anderes Bild zeigte sich bei den HuH7-Zellen, da dort eine Überexpression der FoxO-Isoformen zu einer geringeren Steigerung der Promotoraktivität führte. Auch war das Verhältnis der Steigerung zwischen den einzelnen Isoformen ein anderes im Vergleich zu den HepG2. Eine Insulinbehandlung zeigte ebenfalls keinen Effekt. Die im Anschluss erfolgte LiCl-Behandlung zur Erhöhung der β -Catenin-Spiegel sowie der Akt-Hemmung zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf eine Insulinbehandlung. Neben der Insulinbehandlung erfolgte eine Behandlung der Zellen mittels Metformin, Troglitazon und GW9662. Bei Metformin zeigte sich lediglich bei der FoxO1a-Überexpression eine Abnahme der Reporterengenaktivität bei Selp und G6Pase. Ursache dafür ist wahrscheinlich wieder das Zusammenspiel von FoxO1a und PGC-1 α im Rahmen der Glukosehomöostase. Troglitazon dagegen, ein PPAR γ -Agonist, führte zu einer Steigerung der Promotoraktivität der Zielgene. Der Effekt ließ sich nicht mittels eines PPAR γ -Antagonisten aufheben, sodass der Effekt wahrscheinlich nicht über den PPAR γ -Rezeptorweg verläuft.

6. Literaturverzeichnis

Akesson B, Bellew T, Burk RF (1994) Purification of selenoprotein P from human plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1204(2): 243-249

Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P (1996) Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett*, 399(3):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 (1997a) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol*. 7(10): 776-789

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997b) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph α . *Curr Biol*. 7(4): 261-269

Alessi DR, Cohen P (1998) Mechanism of activation and function of protein Kinase B. *Curr Opin Genet Dev*. 8(1):55-62

Altomonte J, Cong L, Harbaran S, Richter A, Xu J, Meseck M, Dong HH (2004) Foxo1 mediates insulin action on apoC-III and triglyceride metabolism. *J Clin Invest*. 114(10): 1493-1503

American Diabetes Association. (2008) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. Vol 31 no Supplement 1:55-60

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(2):187-199

Arner P (2003) The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab*. 14(3):137-145

Bailey CJ, Turner RC (1996) Metformin. *N Engl J Med*. 334(9): 574-579

Bailey CJ (2000) The rise and fall of troglitazone. *Diabet Med*. 17(6):414-415

- Barthel A, Schmoll D, Krüger KD, Roth RA, Joost HG (2002)** Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase. *Endocrinology*. 143(8):3183-3186
- Barthel A, Schmoll D, Unterman TG (2005)** FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 16(4): 183-189
- Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN (1991)** A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*. 254(5029): 274-277
- Biggs WH III, 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 U.S.A.* 96(13): 7421-7426
- Biggs WH III, 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(6): 416-425
- Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E (2007)** Serum Selenium and Diabetes in U.S. Adults. *Diabetes Care*. 30(4):829-834
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001)** Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 411(6835): 355-365
- Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, Hammermann J, Henn T, Lampert F (1997)** Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene*. 14(2):195-202
- Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering BM (2001)** Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol Cell Biol*. 21(10): 3534-3546
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999)** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 96(6): 857-868
- 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(5): 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(5666): 2011-2015
- Burgering BM, Coffey PJ (1995)** Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 376(6541): 599-602
- Burk RF, Hill KE (2009)** Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 1790(11): 1441-1447
- Camp HS, Tafuri SR, Leff T (1999)** c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology*. 140(1):392-397
- Calnan DR, Brunet A (2008)** The FoxO code. *Oncogene*. 27(16): 2276-2788
- Cantley LC (2002)** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 296(5573): 1655-1657
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA (2003)** Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*. 301(5630):215-218
- Chan HM, La Thangue NB (2001)** p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci*. 114.Pt 13: 2363-2373
- Chan PH (2001)** Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 21(1): 2-14
- Chiarelli F, Di Marzio D (2008)** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives. *Vasc Health Risk Manag*. 4(2): 297-304
- Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK (1993)** Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*. 364(6436):412-420
- Crawford RS, Mudaliar SR, Henry RR, Chait A (1999)** Inhibition of LDL oxidation in vitro but not ex vivo by troglitazone. *Diabetes*. 48(4): 783-790
- Daitoku H, Sakamaki J, Fukamizu A (2011)** Regulation of FoxO transcription factors by

acetylation and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta*. 1813(11):1954-1960

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 13(22): 2905-2729

Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG (1994) Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*. (11):2869-2872

Davies SS, Pontsler AV, Marathe GK, Harrison KA, Murphy RC, Hinshaw JC, Prestwich GD, Hilaire AS, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM (2001) Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J Biol Chem*. 276(19):16015-16023

Day C (1999) Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med*. 16(3):179-192

de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C (1998) Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 95(15): 8847-8851

DeFronzo RA, Goodman AM (1995) Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med*. 333(9): 541-495

Denley A, Wallace JC, Cosgrove LJ, Forbes BE (2003) The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Horm Metab Res*. 35.11-12: 778-785

Desvergne B, Wahli W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 20(5):649-688

Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Lam EW, Burgering BM, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2000) Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol*. 20(24): 9138-9148

- Dorman JB, Albinder B, Shroyer T, Kenyon C (1995)** The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 141(4): 1399-1406
- Dowell P, Otto TC, Adi S, Lane MD (2003)** Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways. *J Biol Chem*. 278(46): 45485-45491
- Eckers A (2009)** Regulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Umwelttoxene: Einfluss von Metallionen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf, S67-75
- Erdal E, Ozturk N, Cagatay T, Eksioğlu-Demiralp E, Ozturk M (2005)** Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*. 115(6): 903-910
- Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B (2001)** Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*. 142(10): 4195-4202
- Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC (2004)** FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J*. 23(24): 4802-4812
- Flohe L, Gunzler WA, Schock HH (1973)** Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*. 32(1): 132-134
- Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN (1995)** The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*. 81(5): 727-736
- Fredenrich A, Grimaldi PA (2005)** PPAR delta: an uncompletely known nuclear receptor. *Diabetes Metab*. 31(1): 23-27
- Fujiwara T, Horikoshi H (2000)** Troglitazone and related compounds: therapeutic potential beyond diabetes. *Life Sci*. 67(20): 2405-2416

- 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(4): 503-508
- Fulgencio JP, Kohl C, Girard J, Pegorier JP (1996)** Troglitazone inhibits fatty acid oxidation and esterification, and gluconeogenesis in isolated hepatocytes from starved rats. *Diabetes.* 45(11):1556-1562
- 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(2):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(33):34741-34749
- Galili N, Davis RJ Fredericks WJ Mukhopadhyay S Rauscher III FJ Emanuel BS, Rovera G, Barr F.G. (1993)** Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet.* 5(3):230-235
- Giannarelli R, Aragona M, Coppelli A, Del Prato S (2003)** Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes Metab.* 29(4 Pt 2): 6S28-6S35
- Greer EL, Brunet A (2005)** FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24(50): 7410-7425
- Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, Brunet A (2007)** The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem.* 282(41): 30107-30119
- Greer EL, Brunet A (2008)** Foxo transcription factors in ageing and cancer. *Acta Physiol (Oxf).* 192(1):19-28
- Hardie DG, Hawley SA (2001)** AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis is revisited. *Bioessays.* 23(12):1112-1119
- Herold G und Mitarbeiter (2012)** Kapitel Endokrinologier Innere Medizin Seite 710-714

- Herrman JL (1977)** The properties of a rat serum protein labelled by the injection of sodium selenite. *Biochim Biophys Acta* 500(1): 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(16): 10050- 10053
- Hill KE, Xia Y, Akesson B, Boeglin ME, Burk RF (1996)** Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chinese subjects. *J Nutr.* 126(1): 138-145
- Himeno S, Chittum HS, Burk RF (1996)** Isoforms of selenoprotein P in rat plasma. Evidence for a full-length form and another form that terminates at the second UGA in the open reading frame. *J Biol Chem.* 271(26): 15769-15775
- Hosaka T, Biggs WH III, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK, Arden KC (2004)** Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101(9): 2975-2980
- Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM (1996)** Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science.* 274(5295):2100-2103
- Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, Zou Y, Bao S, Hanada N, Saso H, Kobayashi R, Hung MC (2004)** I kappa B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell.* 117.2: 225-237
- 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 U.S.A.* 102(5): 1649-1654
- Huang H, Regan KM, Lou Z, Chen J, Tindall DJ (2006)** CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage. *Science.* 314(5797): 294-297
- Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI (2000)** Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes.* 49(12): 2063-2069
- Hunter T (2000)** Signaling--2000 and beyond. *Cell.* 100(1): 113-127

- Issemann I, Green S (1990)** Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 347(6294): 645-650
- Jackson JG, Kreisberg JI, Koterba AP, Yee D, Brattain MG (2000)** Phosphorylation and nuclear exclusion of the forkhead transcription factor FKHR after epidermal growth factor treatment in human breast cancer cells. *Oncogene*. 19(40): 4574-4581.
- Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP (2003)** FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem*. 278(38): 35959-35967
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000)** Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factor. *Genes Dev*. 14(2):142-146
- Kahn CR, Chen L, Cohen SE (2000)** Unrevealing the mechanism of action of thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 106(11):1305-1307
- 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(6454): 461-464
- Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. (1997)** *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 277(5328): 942-946
- Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR (2002)** Metformin: an update. *Ann Intern Med*. 137(1): 25-33
- Kitamura YI, Kitamura T, Kruse JP, Raum JC, Stein R, Gu W, Accili D (2005)** FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab*. 2(3): 153-163
- Kitamura T, Feng Y, Kitamura YI, Chua SC Jr, Xu AW, Barsh GS, Rossetti L, Accili D (2006)** Forkhead protein FoxO1 mediates *Agrp*-dependent effects of leptin on food intake. *Nat Med*. 12(5): 534-540
- Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM (2001)** Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res*. 56(2001): 239-263

Kops GJ, Burgering BM (1999) Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med.* 77(9): 656-665

Kops GJ, Medema RH, Glassford J, Essers MA, Dijkers PF, Coffe PJ, Lam EW, Burgering BM (2002) Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol.* 22(7): 2025-2036

Krentz AJ, Bailey CJ, Melander A. (2000) Thiazolidinediones for type 2 diabetes. New agents reduce insulin resistance but need long term clinical trials. *BMJ.* 321(7256):252-253

Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N, Issad T (2008) O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Lett.* 582(5): 829-834

Liu Q, Sasaki T, Koziaradzki I, Wakeham A, Itie A, Dumont DJ, Penninger JM (1999) SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev.* 13(7): 786-791

Manolagas SC, Almeida M (2007) Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Mol Endocrinol.* 21(11): 2605-2614

Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A (2003) Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100(20): 11285-11290

McKenna NJ, O'Malley BW (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* 108(4):465-474

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM (2000) AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature.* 404(6779): 782-787

Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR (2000) Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology.* 141(11): 4021-4031

- Méplan C, Crosley LK, Nicol F, Beckett GJ, Howie AF, Hill KE, Horgan G, Mathers JC, Arthur JR, Hesketh JE (2007)** Genetic polymorphisms in the human selenoprotein P gene determine the response of selenoprotein markers to selenium supplementation in a gender-specific manner (the SELGEN study). *FASEB J* 21.(12): 3063-3074
- Michalik L, Desvergne B, Dreyer C, Gavillet M, Laurini RN, Wahli W (2002)** PPAR expression and function during vertebrate development." *Int J Dev Biol.* 46(1): 105-114
- Michalik L, Wahli W (2006)** Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest.* 116(3): 598-606
- Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S (2010)** A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab.* 12(5): 483-495
- 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(49):47928-47937
- Morioka K, Nakatani K, Matsumoto K, Urakawa H, Kitagawa N, Katsuki A, Hori Y, Gabazza EC, Yano Y, Nishioka J, Nobori T, Sumida Y, Adachi Y (2005)** Metformin-induced suppression of glucose-6-phosphatase expression is independent of insulin signaling in rat hepatoma cells. *Int J Mol Med.* 15(3): 449-452
- Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1996)** A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*." *Nature.* 382(6591): 536-539
- Murthy SS, Tosolini A, Taguchi T, Testa JR (2000)** Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 88(1-2): 38-40
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM (1998)** Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell.* 93(2):229-240

- 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(23): 15982-15985
- Nakae J, Biggs WH, Kitamura T, Cavenee WK, Wright C.V, 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(2):245-253
- Nemoto S, Finkel T (2002)** Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science.* 295(5564):2450-2452
- O'Brien RM, Granner DK (1996)** Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev.* 76(4): 1109-1161
- O'Brien RM, Streeper RS, Ayala JE, Stadelmaier BT, Hornbuckle LA (2001)** Insulin-regulated gene expression. *Biochem Soc Trans.* 29.(Pt 4): 552-558
- Oberkofler H, Schraml E, Krempler F, Patsch W (2004)** Restoration of sterol regulatory-element-binding protein-1c gene expression in HepG2 cells by peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1alpha. *Biochem J.* 381(Pt 2):357-363
- Obsil T, Obsilova V (2008)** Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene.* 27(16): 2263-2275
- Obsil T, Obsilova V (2011)** Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1813(11):1946-1953
- Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA.; Ruvkun G. (1997)** The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature.* 389(6654):994-999
- 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 U.S.A.* 102(12): 4494-44999
- Pawson T, Nash P (2000)** Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* 14(9):1027-1047

- Perissi V, Aggarwal A, Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG (2004)** A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell*. 116(4):511-526
- Plas DR, Thompson CB (2003)** Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem*. 278(14):12361-12366
- Puig O, Mattila J (2011)** Understanding Forkhead box class O function: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Antioxid Redox Signal*. 14(4):635-647
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM (2003)** Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 423(6939):550-555
- Quinn L (2001)** Type 2 diabetes: epidemiology, pathophysiology, and diagnosis. *Nurs Clin North Am*. 36(2): 175-192
- Qu S, Altomonte J, Perdomo G, He J, Fan Y, Kamagate A, Meseck M, Dong HH. (2006)** Aberrant Forkhead box O1 function is associated with impaired hepatic metabolism. *Endocrinology*. 147(12):5641-5652
- Radziuk J, Bailey CJ, Wiernsperger NF, Yudkin JS.(2003)** Metformin and its liver targets in the treatment of type 2 diabetes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 3(2):151-169
- 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(29):17899-17905
- 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(24):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 targetting. *Biochem J*. 354.Pt 3: 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(9):2263-2271

Rena G, Bain J, Elliott M, Cohen P (2004) D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. *EMBO Rep.* 5(1):60-65

Rena G, Pearson ER, Sakamoto K (2013). Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologica.* 56(9):1898-1906

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 391(6662):79-82

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179(73):588-590

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

Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 91(3C):31-38

So CW, Cleary ML (2002) MLL-AFX requires the transcriptional effector domains of AFX to transform myeloid progenitors and transdominantly interfere with forkhead protein function. *Mol Cell Biol.* 22(18):6542-6552

So CW, Cleary ML (2003) Common mechanism for oncogenic activation of MLL by forkhead family proteins. *Blood.* 101(2):633-639

Speckmann B, Walter PL, Alili L, Reinehr R, Sies H, Klotz LO, Steinbrenner H (2008) Selenoprotein P expression is controlled through interaction of the coactivator PGC-1alpha with FoxO1a and hepatocyte nuclear factor 4alpha transcription factors. *Hepatology.* 48(6):1998-2006

Speckmann B, Sies,H, Steinbrenner H (2009) Attenuation of hepatic expression and secretion of selenoprotein P by metformin. *Biochem Biophys Res Commun.* 387(1):158-163

- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998)** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 95(1):29-39
- Straus DS, Pascual G, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK (2000)** 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97(9):4844-4849
- Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT (1997)** Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*. 277(5325):567-570
- Stoytcheva Z, Tujebajeva RM, Harney JW, Berry MJ (2006)** Efficient incorporation of multiple selenocysteines involves an inefficient decoding step serving as a potential translational checkpoint and ribosome bottleneck. *Mol Cell Biol*. 26(24):9177-9184
- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF (1991)** Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*. 352(6330):73-77
- Takano H, Komuro I. (2009)** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J*. 73(2):214-220
- Takaishi H, Konishi H, Matsuzaki H, Ono Y, Shirai Y, Saito N, Kitamura T, Ogawa W, Kasuga M, Kikkawa U, Nishizuka Y (1999)** Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96(21):11836-11841
- Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Murao K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, Shirasaki T, Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T. (2014)** Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P Gene via an AMP-activated Kinase (AMPK)/FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes. *J Biol Chem*. 289(1):335-345
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. (1998)** PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 93(2):241-252

- Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ Jr, DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME (2002)** DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*. 296(5567):530-534
- Tsai KL, Sun YJ, Huang CY, Yang JY, Hung MC, Hsiao CD (2007)** Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of posttranslational modification. *Nucleic Acids Res*. 35(20):6984-6994
- Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. (2011)** FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1813(11):1938-1945
- van de Werve G, Lange A, Newgard C, Mechin MC, Li Y, Berteloot A (2000)** New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur J Biochem*. 267(6): 1533-1549
- van der Heide,L.P.; Jacobs,F.M.; Burbach,J.P.; Hoekman,M.F.; Smidt,M.P. (2005)** FoxO6 transcriptional activity is regulated by Thr26 and Ser184, independent of nucleocytoplasmic shuttling. *Biochem J*. 391(Pt 3): 623-629
- Van Schaftingen E, Gerin I (2002)** The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J*. 362(Pt 3): 513-532
- Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR (1999)** Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 103(7): 931-943
- Vega RB, Huss JM, Kelly DP (2000)** The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol.Cell Biol*. 20(5): 1868-1876
- Walter F (2003)** A Cellular And Molecular Approach. *Medical Physiology*. 125-126
- Walter PL, Steinbrenner H., Barthel A, Klotz LO (2008)** Stimulation of selenoprotein P promoter activity in hepatoma cells by FoxO1a transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 365(2): 316-321
- Wang MC, Bohmann D, Jasper H (2005)** JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell*. 121(1):115-125

Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H (1989) The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell*. 57(4):645-658

Weng LP, Smith WM, Dahia PL, Ziebold U, Gil E, Lees JA, Eng C (1999) PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death. *Cancer Res*. 59(22):5808-5814

White MF (1998) The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem*. 182(1-2):3-11

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 27(5):1047-1053

Yang Z, Whelan J, Babb R, Bowen BR. (2002) An mRNA splice variant of the AFX gene with altered transcriptional activity. *J Biol Chem*. 277(10):8065-8075

Yang JY, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, Lang JY, Lai CC, Chang CJ, Huang WC, Huang H, Kuo HP, Lee DF, Li LY, Lien HC, Cheng X, Chang KJ, Hsiao CD, Tsai FJ, Tsai CH, Sahin AA, Muller WJ, Mills GB, Yu D, Hortobagyi GN, Hung MC (2008) ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol*. 10(2): 138-148

Yoon JC, Puigserver G, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 413(6852):131-138

Yu S, Reddy JK. (2007) Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1771(8):936-951

Zhang K, Li L, Qi Y, Zhu X, Gan B, DePinho RA, Averitt T, Guo S (2012) Hepatic suppression of Foxo1 and Foxo3 causes hypoglycemia and hyperlipidemia in mice. *Endocrinology*. 153(2):631-646

Zheng WH, Kar S, Quirion R (2002) FKHL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J Neurochem*. 80(6): 1049-1061

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108(8): 1167-1174

Zhou YM, Wen YH, Kang XY, Qian HH, Yang JM, Yin ZF (2008) Troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor α ligand, induces growth inhibition and apoptosis of HepG2 human liver cancer cells. *World J Gastroenterol.* 14(14): 2168-2173

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz möchte ich herzlich für das Thema, seine hervorragende Betreuung sowie der Bereitstellung von Arbeitsplatz und Materialien danken. Er unterstützte mich über die gesamte Promotion und selbst die große räumliche Distanz zwischenzeitlich änderte dies nicht.

Mein weiterer Dank gilt meinem Korreferent Herrn Prof. Dr. Wilhelm Stahl.

Auch möchte ich mich bei der ehemaligen AG Klotz bedanken, in welche ich sehr nett aufgenommen wurde und mit der ich sehr viele angenehme Stunden im Labor und abseits verbringen durfte. Dabei möchte ich mich vor allem bei Herrn Dr. Martin Leyendecker bedanken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterhin danke ich meiner Freundin Anna für das Korrekturlesen der Arbeit, was fachfremd, sicher äußerst mühsam war, sowie Frau Priv.-Doz. Dr. Mlynek-Kersjes und Herrn Dr. Thomas Kuhn für die anregenden Diskussionen.

Abschließend danke ich meinen Eltern, meinem Bruder und allen guten Freunden, die mich während der ganzen Arbeit stets unterstützt haben.

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

25.07.2014, Andreas Dormann