

Herstellung und Charakterisierung einer induzierbaren Form des Transkriptionsfaktors FOXO1a

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen
Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Hans Martin Orth
aus Wesel

Berichter: Herr Privatdozent
Dr. med. Andreas Barthel

Herr Professor
Dr. rer. nat. Walter Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Signaltransduktion des Insulinrezeptors	1
1.1.1	Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase)	2
1.1.2	Regulation des Transkriptionsfaktors FOXO1a	4
1.1.3	FOXO1a-abhängig regulierte Gene	6
1.1.4	Induzierbare Konstrukte	7
1.2	Arbeitshypothese und Fragestellung	10
2	MATERIAL UND METHODIK	11
2.1	Allgemeine Herstellerangaben	11
2.2	Molekularbiologische Arbeitstechniken	11
2.2.1	Enzymverdau	11
2.2.2	Sticky-End-Ligation	11
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	11
2.2.4	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	12
2.2.5	Sequenzreaktion nach Sanger (Sanger et al. 1992)	12
2.2.6	Blunt-End-Ligation	13
2.2.7	Herstellen kompetenter Bakterien (DH5 α)	13
2.2.8	Bakterientransformation mittels Elektroporation	13
2.2.9	Hitzeschocktransformation	14
2.2.10	Northern-Blot	14
2.2.11	Herstellung von [α 32P]-markierten Sonden	15
2.2.12	Hybridisieren des Northern-Blot	15
2.3	Zellbiologische Arbeitstechniken	16
2.3.1	Zelllinien	16
2.3.2	Kulturmedien und Kulturbedingungen	16
2.3.3	Subkultivierung	17
2.3.4	Transfektion von Zellen	17
2.3.5	Retroviraler Gentransfer	18
2.3.6	Selektionierung der Zellen	18
2.4	Proteinchemische Arbeitstechniken	20
2.4.1	Immunpräzipitation	20
2.4.2	Western Blot	20
2.4.3	Luziferase-Assay	21
2.4.4	BCA-Assay	21
2.5	Statistische Analyse	21
3	ERGEBNISSE	22

3.1	Herstellen des induzierbaren FOXO1a-Konstruktes	22
3.2	Herstellen der stabil transfizierten Hepatomzelllinie	30
3.3	Charakterisierung der H4-Zelllinie	35
3.4	Regulation der endogenen G6Pase-Expression	40
3.4.1	Regulation der G6Pase mRNA	40
3.4.2	Regulation der G6Pase-Enzymaktivität	42
4	DISKUSSION	44
4.1	Das induzierbare FOXO1a-Konstrukt	44
4.2	Die Glucose-6-Phosphatase	46
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
6	LITERATURVERZEICHNIS	50
7	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	55
8	DANKSAGUNG	56
9	ERKLÄRUNG ZUR DATENAUFBEWAHRUNG	57
10	LEBENS LAUF	58

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosinbiphosphat
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat ₂
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
cpm	counts per minute
DM	Diabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
Dx	Dexamethason
ECL	enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
FOXO1a	Forkhead in Rhabdomyosarcoma
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G6Pase	Glucose-6-Phosphatase
GLB	Gelbeladungspuffer
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HBS	Puffersystem bei der Calciumphosphat-Transfektion
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
Ins	Insulin
Kbp	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani
Lsg	Lösung
M	Molarität (mol/l)
μM	mikromolar
MG	Molekulargewicht
Min	Minute
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
nm	nanomolar
OLB	Puffersystem bei der Sondenherstellung
OD	optische Dichte
OPA	All-Phor-One Puffer
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PKB	Proteinkinase B
RNA	Ribonucleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RZPD	Ressourcen Zentrum Primäre Datenbank
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris (10mM) / EDTA (0,5mM)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tx	4-Hydroxytamoxifen
U	<i>unit</i> (Einheit)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signaltransduktion des Insulins.	4
Abbildung 2: Regulation von FOXO1a durch Phosphorylierung..	6
Abbildung 3: Struktur des G6Pase- und des PEPCK-Promotors.	7
Abbildung 4: Funktionsweise von durch Hydroxytamoxifen regulierbaren Fusionsproteinen mit der hormonbindenden Domäne des Estrogenrezeptors (ER)..	9
Abbildung 5: Herstellung des induzierbaren FOXO1a-Konstruktes..	22
Abbildung 6: DNA-Gelelektrophorese zur Gewinnung eines Zwischenproduktes der Klonierung..	24
Abbildung 7: Kontrollverdau der drei Plasmide mit Bgl II..	25
Abbildung 8: Transaktivierung des Glucose-6-Phosphatasepromotors durch das induzierbare FOXO1a-ER-Konstrukt..	27
Abbildung 9: FOXO1a-ER-induzierte G6Pasepromotoraktivität in Abhängigkeit von der Tamoxifenkonzentration in HepG2-Zellen..	29
Abbildung 10: retroviraler Gentransfer..	31
Abbildung 11: Abhängigkeit der FOXO1a-regulierten Promotoraktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des Blastocidin im Selektionsmedium.	32
Abbildung 12: Nachweis der Expression von FOXO1a-ER in den stabil transfizierten H4-CC-Zellen mittels Western Blot..	34
Abbildung 13: FOXO1a-ER-induzierte Promotoraktivität in Abhängigkeit von der Tamoxifenkonzentration in H4-CC-Zellen..	36
Abbildung 14: Zeitabhängigkeit der FOXO1a-abhängig induzierten Promotoraktivität in H4-CC-Zellen..	37
Abbildung 15: Hemmung der induzierbaren FOXO1a-ER-Aktivität durch Insulin in H4-CC-Zellen..	39
Abbildung 16: Analyse der G6Pase-mRNA-Expression mittels Northernblot.	41
Abbildung 17: Induktion der G6Pase-Enzymaktivität durch das FOXO1a-ER-Konstrukt in H4-CC-Zellen..	43

1 Einleitung

Trotz langjähriger weltweiter Forschung und enormer Aufwendungen existiert auch heute noch immer kein lückenloses Verständnis der Signaltransduktion des Insulinrezeptors und der Regulation des Glucosestoffwechsels durch Insulin. Gerade dies wäre jedoch für die gezielte Entwicklung von wirksamen Medikamenten zur Behandlung des Typ-2-Diabetes mellitus von enormer Bedeutung.

Während beim Typ-1-Diabetes aufgrund einer Autoimmunreaktion die β -Zellen des Pankreas zerstört werden, was in einem absoluten Insulinmangel resultiert, liegt dem Typ-2-Diabetes mellitus (Typ-2-DM) pathophysiologisch eine Insulinresistenz der Zielzellen sowie eine Störung der Insulinsekretion zugrunde. Für das Auftreten des Typ-2-DM werden sowohl genetische als auch alimentäre Faktoren verantwortlich gemacht (Gutteridge 1999). So zeigt sich beispielsweise eine besonders hohe Prävalenz (bis zu 40%) bei den nordamerikanischen Pima-Indianern und bei den Nauru-Insulanern, was den genetischen Hintergrund dieser Erkrankung illustriert (Carter et al. 1996). So genannte „thrifty genes“ sollen in der Frühgeschichte der Menschheit eine bessere metabolische Anpassung an die damaligen Lebensumstände mit unregelmäßiger Nahrungsaufnahme bewirkt haben, jetzt jedoch ein erhöhtes Risiko für Adipositas und Typ-2-DM mit sich bringen (Lazar 2005). Tatsächlich lässt sich auch eine deutlich erhöhte Prävalenz des Typ-2-DM in industrialisierten Ländern gegenüber Entwicklungsländern (6,0% gegenüber 3,3%) erkennen (King et al. 1998) wofür in erster Linie ein übermäßiges Nahrungsangebot verantwortlich gemacht wird.

In den letzten Jahren hat sich zudem gezeigt, dass das Durchschnittsalter für die Erstdiagnose des Typ-2-DM rapide gesunken ist, und bereits Jugendliche in der zweiten Lebensdekade betroffen sind, während man früher noch vom „Altersdiabetes“ sprach (Rosenbloom et al. 1999; Kapellen et al. 2004).

1.1 Signaltransduktion des Insulinrezeptors

Es ist bekannt, dass Insulin eine Vielzahl seiner biologischen Effekte über eine

veränderte Genexpression bewirkt. So hat sich gezeigt, dass Insulin die Expression von mindestens 150 Genen beeinflusst (O'Brien R et al. 2001). Die Stimulation des Insulinrezeptors mit Insulin resultiert in einer Aktivierung von zwei wichtigen Signaltransduktionswegen: a) der MAP (mitogen activated pathway) - Kinasen-Kaskade, b) der Phosphatidylinositol-3-Kinasenkaskade. Insbesondere die letztere Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung metabolischer Prozesse des Insulins.

1.1.1 Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase)

Durch Bindung des Insulins an den extrazellulären Anteil des Insulinrezeptors wird die Kinaseaktivität im intrazellulären Anteil des Rezeptors aktiviert. Dies resultiert in Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste, welche Voraussetzung ist für die Phosphorylierung anderer Proteine. Zu diesen Proteinen gehören auch die Insulinrezeptor-Substrate 1 und 2 (IRS1, IRS2), welche in phosphoryliertem Zustand an die PI3-Kinase binden und diese so aktivieren können. Die aktivierte PI3-Kinase phosphoryliert nun Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphonat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphonat (PIP3), welches wiederum an die Pleckstrin-Homology-Domain der phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) binden und diese so an der Zellmembran fixieren kann. Zu den Substraten der PDK1 gehört unter anderem die Proteinkinase B (PKB, auch als AKT bezeichnet), welche ebenfalls eine Pleckstrin-Homology-Domain aufweist, die an PIP3 binden kann. Durch den so bewirkten Kontakt zwischen PDK1 und PKB, sowie auch Änderungen der Konformation beider Kinasen durch die Bindung an PIP3 wird eine Phosphorylierung von PKB durch PDK1 an Position Thr 308 und durch die bisher nicht eindeutig identifizierte PDK2 an Ser 473 und damit Aktivierung der Kinasefunktion von PKB ermöglicht (Alessi et al. 1997; Alessi and Cohen 1998; Currie et al. 1999; Dong and Liu 2005).

Erst vor wenigen Jahren hat man nach Analyse potenzieller Zielproteine der PKB Erkenntnisse darüber gewonnen, welche Transkriptionsfaktoren an der Vermittlung der Insulinwirkung beteiligt sind. Dabei hat sich gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor FOXO1a eine entscheidende Rolle bei diesem Prozess spielt.

(Ayala et al. 1999; Zheng et al. 2000; Lawlor and Alessi 2001; Arden and Biggs 2002).

Ein homozygoter Knockout des FOXO1a-Gens hat sich bei Mäusen bereits im Embryonalstadium als tödlich herausgestellt (Hosaka et al. 2004), es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein heterozygoter Knockout bei Mäusen mit Haploinsuffizienz des Insulinrezeptors die hier bestehende Insulinresistenz teilweise kompensiert (Nakae et al. 2002), was eine mögliche Bedeutung von FOXO1a für die Insulinresistenz beim Typ-2-Diabetes zeigt. Abb. 1 fasst die wesentlichen Schritte der PI3-Kinasenkaskade zusammen.

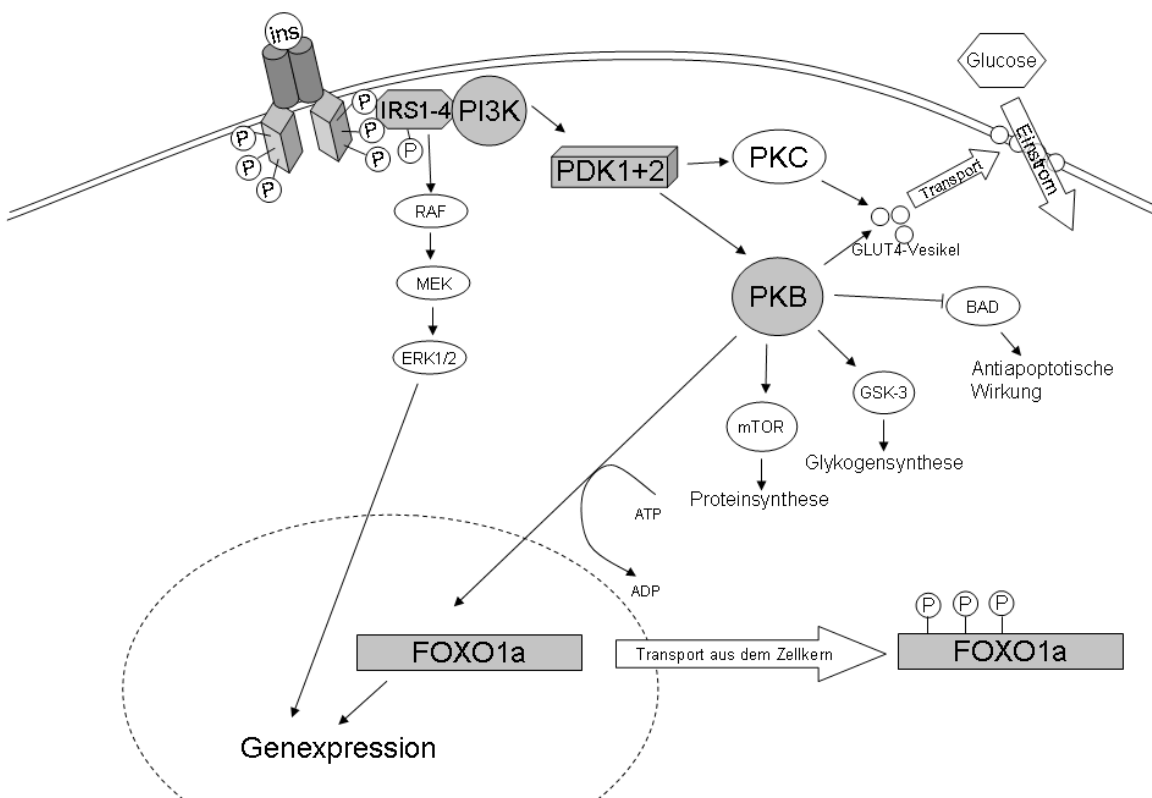


Abbildung 1: Signaltransduktion des Insulins. Die relevanten Schritte zur Regulation von FOXO1a sind grau hinterlegt. Stimulation des Insulinrezeptors führt über eine Aktivierung der PI3-Kinase und PDK1 schließlich zur Aktivierung der Proteinkinase B (PKB). Diese hemmt den Transkriptionsfaktor FOXO1a durch eine direkte Phosphorylierung.

1.1.2 Regulation des Transkriptionsfaktors FOXO1a

Der Transkriptionsfaktor FOXO1a wird an drei Aminosäureresten (Thr 24, Ser 256, Ser 319, der humanen Sequenz) durch PKB phosphoryliert, wodurch seine DNA-Bindungsaffinität abnimmt und der Transkriptionsfaktor vom Nukleus ins Zytosol transloziert wird. (Brunet et al. 1999; Zhang et al. 2002). Wahrscheinlich ist die Phosphorylierung von Ser 256 dabei Voraussetzung für die anderen zwei Phosphorylierungsschritte (Woods and Rena 2002).

Inzwischen ist bekannt, dass auch Phosphorylierungsschritte durch andere Kinasen (siehe Abb. 2) eine nukleäre Exklusion und somit Inhibierung der FOXO1a-Wirkung auf die Genexpression bewirken bzw. verstärken. So wirkt ähnlich wie PKB die serum- und glucocorticoid-inducible kinase (SGK), die jedoch

wohl eine höhere Affinität zum Ser 319 hat als PKB. SGK wird wie PKB durch PI3-Kinase-abhängige Mechanismen aktiviert. Stimuli zur Synthese von SGK gehen von unterschiedlichen Faktoren wie Glukocorticoiden und Wachstumsfaktoren aus (Brunet et al. 2001). Außerdem werden durch die Proteinkinase CK1 (frühere Bezeichnung: Casein Kinase I) die Aminosäuren Ser 322 und Ser 325 phosphoryliert, wobei zunächst die Phosphorylierung an Ser 319 durch PKB bzw. SGK als Konsensussequenz für die Phosphorylierung von Ser 322 dient. Dieser Phosphorylierungsschritt initiiert dann wiederum eine Phosphorylierung an Ser 325 (Rena et al. 2002).

Die Phosphorylierung von Thr 24 ermöglicht eine Bindung an das 14-3-3-Protein, welches ebenfalls die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von FOXO1a im Zellkern reduziert (Brunet et al. 1999; Rena et al. 2001; Brunet et al. 2002).

Offenbar völlig unabhängig von der PI3-Kinase-Wirkung ist die Phosphorylierung von Ser 329 durch die dual specifity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1a (DYRK1a) (Woods et al. 2001). DYRK1a fungiert zudem wohl auch auf einen davon unabhängigen Mechanismus als Koaktivator für FOXO1a (von Groote-Bidlingmaier et al. 2003).

Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen

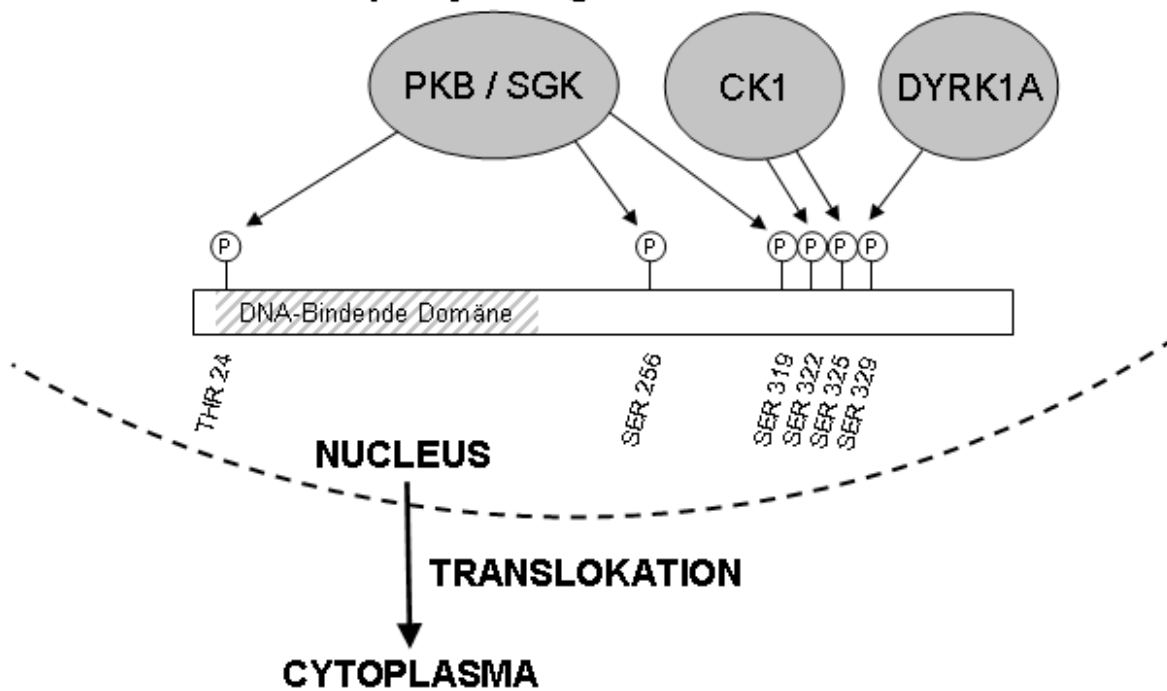


Abbildung 2: Regulation von FOXO1a durch Phosphorylierung. Die dargestellten Phosphorylierungen bewirken eine Translokation von FOXO1a aus dem Zellkern und somit eine Unterbrechung der Transkription untergeordneter Gene.

1.1.3 FOXO1a-abhängig regulierte Gene

Aufgrund verschiedener Studien konnte gezeigt werden, dass FOXO1a an ein so genanntes Insulin-responsives Element (T(G/A)TTT) binden kann. Dieses Element kommt im Promotor des Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Gens (PEPCK) einmal und im Promotor der Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) dreimal vor (Durham et al. 1999; O'Brien R et al. 2001).

So konnte mittels electromobility-shift-assays (EMSA) gezeigt werden, dass FOXO1a an die entsprechenden Promotorstrukturen des G6Pase-Gens bindet (Ayala et al. 1999). Darüber hinaus gab es auch Hinweise, dass FOXO1a eine Transaktivierung des G6Pase-Promotors bewirken kann (Schmoll et al. 2000; Barthel et al. 2001).

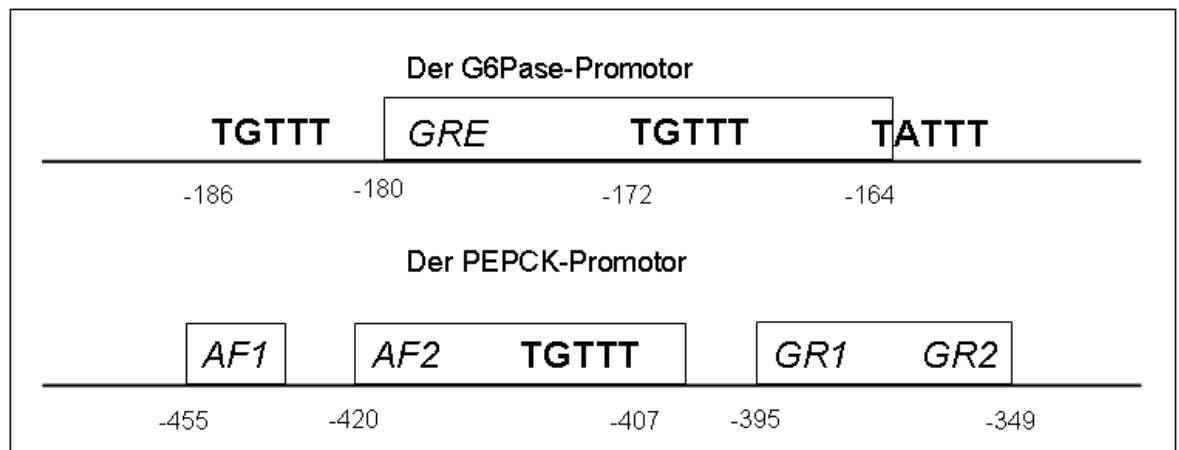


Abbildung 3: Struktur des G6Pase- und des PEPCK-Promotors. Diese Abbildung zeigt das Vorhandensein so genannter „insulin-responsiver Elemente“ (T(G/A)TTT) in den Promotoren des PEPCK- und des G6Pase-Gens, sowie weitere Glucocorticoid-responsive Elemente (AF1, AF2: accessory factor element, GRE, GR1, GR2: glucocorticoid responsive element)

Aufgrund dieser indirekten Untersuchungsergebnisse stellte sich die Frage, ob FOXO1a eine Funktion bei der insulinabhängigen Regulation des G6Pase-Gens besitzt. Es sind inzwischen weitere FOXO1a-abhängig regulierte Gene bekannt geworden. Dazu gehören $p27^{KIP1}$ und $p130$, die beide bei zunehmender Expression die Zellproliferation zum Stillstand bringen (Dijkers et al. 2000; Kops et al. 2002) und somit eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass beim Menschen eine Translokation t(2;13) (q35;q14), die in der Expression eines Hybridproteins aus den Transkriptionsfaktoren PAX3 und FOXO1a resultiert, eine maligne Entartung der Zelle bewirken kann, wobei diese möglicherweise durch eine reduzierte $p27^{KIP1}$ Synthese bewirkt wird (Sublett et al. 1995; Zhang and Wang 2003).

1.1.4 Induzierbare Konstrukte

FOXO1a-abhängige biologische Funktionen wurden bisher meist durch Überexpression des FOXO1a-Wildtyps mittels transienter Transfektion untersucht (Biggs et al. 1999; Guo et al. 1999; Hall et al. 2000). In derartigen Experimenten werden unterschiedliche Zellpopulationen bezüglich einer biologischen Funktion verglichen. Induzierbare Konstrukte bieten dagegen den Vorteil, dass biologische Effekte in derselben Zellpopulation beobachtet werden können, die auch zur

Kontrolle dient, wodurch die Untersuchungen wesentlich weniger fehleranfällig werden.

Induzierbare Konstrukte wurden durch unterschiedliche Funktionsweisen realisiert. So wurden zum Beispiel Tetrazyklin-regulierbare Systeme verwendet um verschiedene Konstrukte zu induzieren oder supprimieren (Gossen et al. 1995). Diese Systeme weisen jedoch potenzielle Nachteile auf, da sie auf komplexen Mechanismen basieren, und beispielsweise erst die de-novo-Synthese des Konstruktes erfordern.

Wesentlich direktere Ansätze zur Untersuchung von Proteinfunktionen werden durch zielgerichtete Freisetzung bereits bestehender funktionstüchtiger Proteine erreicht. So wurden aktivierbare Konstrukte der Proteinkinase B (Kohn et al. 1998) und des Transkriptionsfaktors Myc (Jansen-Durr et al. 1993) hergestellt, indem Fusionsproteine mit der hormonbindenden Domäne von modifizierten Estrogenrezeptoren gebildet wurden (Littlewood et al. 1995). Derartige Hybridproteine sind im inaktiven Zustand durch das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) maskiert und können durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen freigesetzt werden um biologische Funktionen zu beeinflussen.

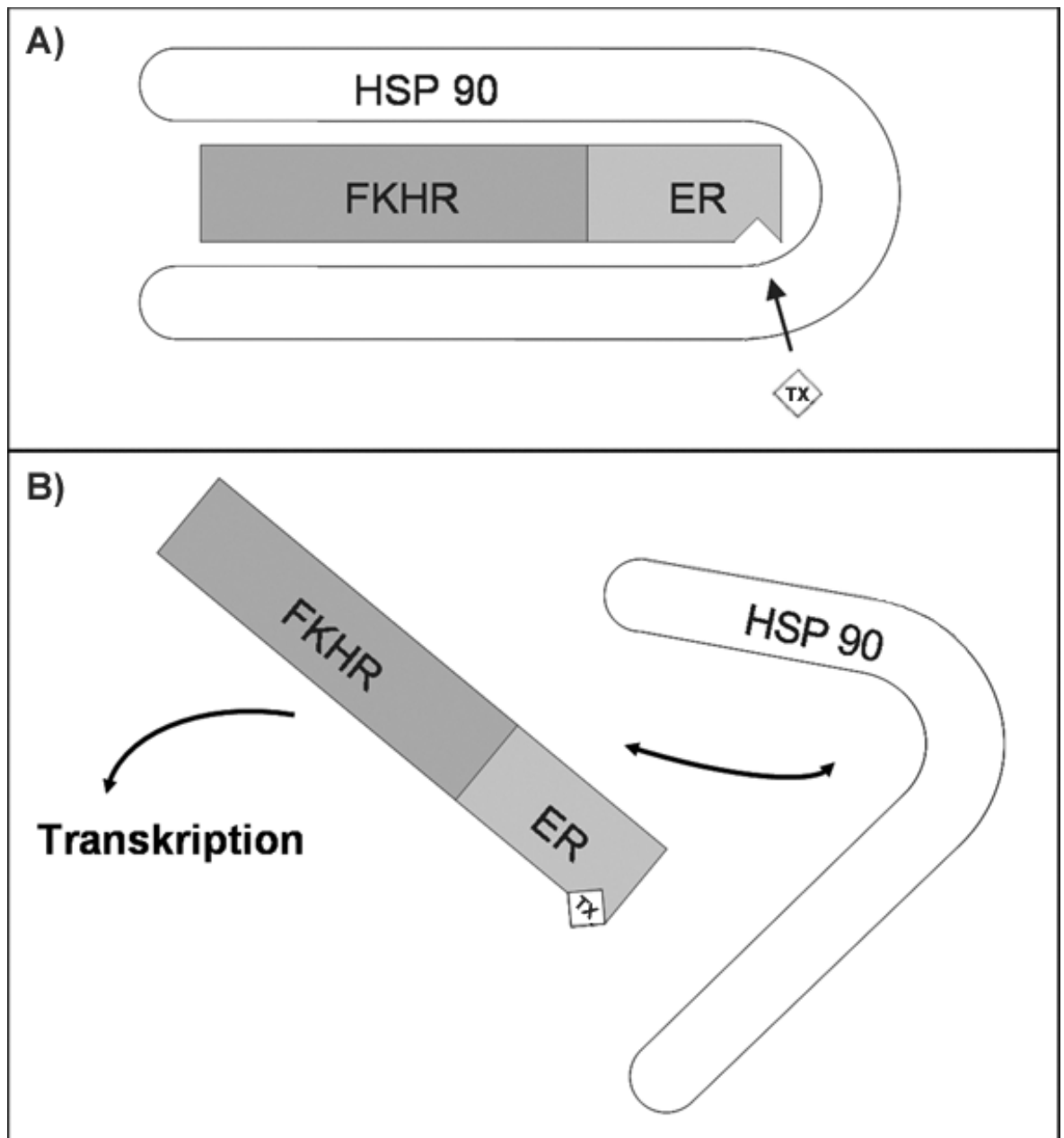


Abbildung 4: Funktionsweise von durch Hydroxytamoxifen regulierbaren Fusionsproteinen mit der hormonbindenden Domäne des Estrogenrezeptors (ER). Das inaktive FOXO1a-ER-Fusionsprotein ist durch das Hitzeschockprotein „HSP90“ maskiert und wird durch Hinzugabe von 4-Hydroxytamoxifen (Tx), welches an die Estrogenrezeptordomäne (ER) bindet, freigesetzt, um anschließend im Zellkern Transkriptionsvorgänge zu vermitteln.

1.2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Der vorgelegten Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass der Transkriptionsfaktor FOXO1a eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung insulinabhängig regulierter metabolischer Funktionen besitzt. Die zentrale Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, zunächst ein konditionell aktivierbares Konstrukt des Transkriptionsfaktors FOXO1a herzustellen und mittels dieses Konstruktes die biologische Funktion des Transkriptionsfaktors FOXO1a in Leberzellen zu charakterisieren. Hierzu sollte das Konstrukt stabil in einer hochdifferenzierten Hepatoma-Zelllinie exprimiert werden. Eine prinzipielle Eignung dieser Zelllinie zur Analyse FOXO1a-abhängiger Transkriptionsvorgänge sollte anhand der Regulation der Glucose-6-Phosphatase (G6Pase), eines zentralen gluconeogenen Enzyms der Leber in einem Zellmodell untersucht werden.

2 Material und Methodik

2.1 Allgemeine Herstellerangaben

Sämtliche nicht näher bezeichneten Trockenchemikalien stammen von der Firma Merck.

Sämtliche nicht näher bezeichneten Flüssigsubstanzen stammen von der Firma Merck-Suchard.

Sämtliche Glasware stammt von der Firma Schott.

Sämtliche High-Performance Zentrifugen stammen von der Firma Beckman-Coulter.

Sämtliche Tischzentrifugen stammen von der Firma Eppendorf.

Sämtliche Pipetten stammen von der Firma Eppendorf.

2.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.2.1 Enzymverdau

Dient zum Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen an spezifischen DNA-Abschnitten. Dazu wurden sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen und spezifische Reaktionspuffer entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Reagenzien stammen von den Firmen NEB, Pharmacia und Gibco.

2.2.2 Sticky-End-Ligation

Die Sticky-End-Ligation zur kovalenten Bindung von DNA-Abschnitten mit korrespondierenden Basenüberhängen erfolgte mittels T4-DNA-Ligase (Gibco) nach Herstellerangaben.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Agarose-Gelelektrophorese wurden 0,7%ige bis 2%ige Gele (Seakem® LE Agarose) verwendet. Das Ethidiumbromid-Konzentrat stammte von der Firma ICN Biomedicals. Die Proben wurden mit Hilfe eines Basenstandards (0,1 / 1kb, Bio

Rad) in ihrer Länge klassifiziert. Falls eine Aufreinigung für eine Weiterverarbeitung erforderlich war, so wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte dreimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gewaschen und zuletzt mit Isopropanol gefällt.

2.2.4 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Eine PCR zur selektiven Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte erfolgte mit dem TAQ-Polymerase-Kit der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben.

Je nach Bedarf erfolgten 20 bis 40 Amplifikationsschritte im Thermocycler (Hybaid Touch Down). Da unter Verwendung der TAQ-Polymerase statistisch etwa alle 9.000 Basen eine Mutation auftritt (Herstellerangaben), wurde vor einer Weiterverarbeitung eines mittels PCR vervielfältigten DNA-Abschnittes die Sequenz verifiziert.

2.2.5 Sequenzreaktion nach Sanger (Sanger et al. 1992)

Für jede der vier Basen wurde – je nach Herstellerangaben - ein Ansatz aus zu sequenzierender DNA-Lösung, DMSO 1M, Strangabbruch-Mixes (G, C, T, A) (Amersham Pharmacia) und evtl. Wasser pipettiert. Das Programm für den Cycler (Hybaid Touch Down) lief folgendermaßen ab:

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
1	2min	94°C	
2	15s 15s 30s	94°C T _a 72°C	30x
3	∞	4°C	

T_a ist dabei die (sequenzspezifische) Temperatur, bei der die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte binden, während bei 72°C die Taq-Polymerase nahe dem Temperaturoptimum arbeitet und bei 94°C die DNA denaturiert wird. Nach Ende des Programms wurde auf 4°C gekühlt, um die DNA zu stabilisieren.

Anschließend wurden ca. 5-8 µl der Stopp-Lösung (Amersham Pharmacia) hinzugegeben.

Die Elektrophorese erfolgte im LiCor® (dna Sequencer model 4000) in einem Polyacrylamid-Urea-Gel.

2.2.6 Blunt-End-Ligation

Zur kovalenten Bindung von DNA-Abschnitten ohne Basenüberhang wurde das SureClone Ligation Kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) verwendet, Anwendung laut Herstellerangaben. Zum Auffüllen bzw. Entfernen von Basenüberhängen vor einer Blunt-End-Ligation wurde das CIAP-Kit der Firma Amersham Pharmacia verwendet (entsprechend den Herstellerangaben).

2.2.7 Herstellen kompetenter Bakterien (DH5α)

Dient der Anzucht von für eine Transformation geeigneten Colibakterien des Stammes DH5α.

Die Bakterien wurden für ca. 12h bei Raumtemperatur in 400ml SOC-Medium (Trypton (Gibco), Hefe-Extrakt (Sigma, Steinheim), NaCl, KCl, H₂O, MgCl₂ 1M, Glucose 20%) kultiviert, bis sie im Photometer (Eppendorf 1101M) bei 600nm eine Optische Dichte von 0,4-0,6 erreichten. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gekühlt und bei 2.500g und 4°C pelletiert. Dann wurden sie in 100ml eisgekühltem TB-Puffer (Pipes (Sigma, Steinheim), CaCl₂, KCl, MnCl₂) resuspendiert und nach 10min erneut pelletiert, diesmal in 30ml TB resuspendiert. Dann wurde DMSO (Merck, Darmstadt) hinzugegeben auf eine Endkonzentration von 7%. Die Bakterien wurden aliquotiert (je 500µl) und noch 10min bei 4°C gekühlt, bevor sie in flüssigem N₂ tief gefroren und vor Verwendung aufgetaut wurden.

2.2.8 Bakterientransformation mittels Elektroporation

Die Bakterien wurden zunächst im Schüttler bei 37°C in LB-Medium kultiviert

(100µl Bakteriensuspension auf 50ml Medium) bis sie im Photometer bei 600nm eine optische Dichte von 0,6 gegenüber LB-Medium erreichten. Daraufhin wurden die Bakterien bei 3.000g pelletiert und insgesamt dreimal in 50ml H₂O resuspendiert und erneut abzentrifugiert, bevor sie in 1ml H₂O resuspendiert wurden. Die aufgereinigte DNA-Lösung wurde in eine Elektroporations-Küvette (Eurogentec, Seraing, Belgien) pipettiert, mit 100µl der Bakterien-Suspension versetzt und bei 2,5kV, 25µF und 200Ω (mit Bio-Rad Gene Pulser) elektroporiert. Danach wurde die Suspension mit ca. 0,5-1ml LB-Medium versetzt und 1h bei 37°C im Schüttler inkubiert, bevor sie kurz abzentrifugiert, dekantiert und dann auf den Selektivagar ausplattiert wurde. Dort wurde sie für mindestens 12h bei 37°C inkubiert.

2.2.9 Hitzeschocktransformation

Ein Einbringen von DNA in Bakterien mittels Hitzeschock erfolgte insbesondere bei Vorhandensein großer Mengen hochkonzentrierter DNA wobei kein besonderer Reinheitsgrad der DNA erforderlich ist. Es wurden dazu 100µl der Bakteriensuspension mit 2-20µl (je nach Konzentration) der Plasmidlösung vermengt, 10min auf Eis gekühlt, dann zur Transformation für 2min im Wasserbad auf 42°C erhitzt und wieder auf Eis gekühlt. Danach wurden sie für 1h bei 37°C in LB-Medium im Schüttler inkubiert, bevor sie auf einen Selektivagar ausplattiert wurden.

2.2.10 Northern-Blot

Die mit dem RNEasy Mini Kit (Qiagen) laut Herstellerangaben extrahierten RNA-Proben (jeweils ca. 10 µg) wurden mit der gleichen Menge an Ladepuffer (96µl Formamid, 20µl MOPS 10x, 35µl Formaldehyd, 29µl Glycerin 37%, 20µl Bromphenolblau 0,1%, 1µl Ethidiumbromid-Lösung) vermengt und für 10min auf 68°C erhitzt bevor sie auf ein 0,8%iges Agarose/Formaldehyd-Gel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese lief für ca. 3-4h bei 100V.

Gebloftet wurde per Diffusion auf eine Nitrozellulose-Membran. Anschließend

wurde die RNA mit der Nitrozellulose unter UV-Licht (Biometra) bei 0,4 mW/cm² quervernetzt.

2.2.11 Herstellung von [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten Sonden

Zunächst wurden 1 μl Hexanukleotid-Primer (HNP) (MWG Biotech) mit 100ng der spezifischen DNA und 2 μl OLB-Puffer (250 mM Tris-HCl pH 6,9, 50 mM MgSO₄, 0,5 mM DTT, 0,3 mM dATP, 0,3 mM dGTP, 0,3 mM dTTP) zusammengegeben und mit H₂O auf ein Volumen von 16 μl aufgefüllt. Die Lösung wurde für 5-10min aufgeköcht. Daraufhin wurde die Lösung für ca. 1min auf Eis gekühlt, wo die nun einzelsträngig vorliegende DNA mit den Hexanukleotidprimern binden konnte. Im Anschluß wurden 3 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (Hartmann-Analytic) und 1 μl Klenow-Fragment (5U/ μl) (NEB) hinzugegeben, die Polymerase-Reaktion erfolgte daraufhin für eine Stunde bei 37°C.

Die Sonden wurden im Anschluss entweder mit Qiaquick Spin Columns oder durch zweimaliges Fällern in 70%igem Ethanol von freiem [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP gereinigt und in H₂O gelöst.

2.2.12 Hybridisieren des Northern-Blot

Der Northern-Blot wurde in einem Glaszylinder bei 72°C mit 10 ml Hybridisierungslösung (ExpressHyb®, Firma Clontech) für 30min unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde für 5min aufgeköcht und hinzupipettiert. Die Temperatur des Heizofens wurde auf 42°C herunterreguliert woraufhin über Nacht hybridisiert wurde. Das Waschen der hybridisierten Filter erfolgte zunächst für 10min mit 2xSSC (17,53g NaCl, 8,82g Trinatriumcitrat, ad 1l H₂O) bei 42°C, anschließend zweimal für je 20min bei 55°C mit 0,2xSSC. Die Filter wurden auf Phospho-Imager-Screens aufgebracht, welche im Anschluss an die Exposition mit Scannern der Hersteller Amersham und Packard gescannt wurden. Eine Auswertung erfolgte mittels der Opti-Quant Software (Packard, Meriden).

2.3 Zellbiologische Arbeitstechniken

2.3.1 Zelllinien

Es wurden insgesamt drei Zelllinien zu verschiedenen Zwecken verwendet:

Für Untersuchungen des induzierbaren FOXO1a-Konstruktes in transient transfizierten Zellen wurden humane Hepatomzellen vom Typ HEP G2 verwendet.

Zur Herstellung der stabil transfizierten Zelllinie wurden H4IIEC3-Zellen (Ratte) verwendet. Die freundlicherweise von Dr. Dieter Schmoll (Frankfurt) zur Verfügung gestellten Zellen enthalten bereits ein stabil exprimiertes FOXO1a-sensibles Reporter-Konstrukt. Darüber hinaus eignen sich diese Zellen besonders zur Untersuchung des FKHR-Konstruktes, da sie eine hohe Insulinempfindlichkeit sowie eine hohe Differenzierung (erhaltene Regulation der Gluconeogenese) aufweisen und darüber hinaus gut charakterisiert sind.

Für die Herstellung der stabil transfizierten Zelllinie wurde zudem eine Verpackungs-Zelllinie vom Typ Phoenix-HEK 293 („Φ“) verwendet.

2.3.2 Kulturmedien und Kulturbedingungen

Als Kulturmedium wurde DMEM High Glucose (PAA Laboratories, Linz, Österreich) verwendet, welches zusätzlich mit 10% fetalem Kälberserum (PAA Laboratories), sowie 50 µg/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (Gibco) versetzt wurde. Das Medium wurde mit entsprechenden Filtersystemen (Falcon) sterilfiltriert.

Zur Verhinderung regulatorischer Effekte durch das im Kälberserum vorhandene Insulin wurde alternativ zur Vorbereitung der Zellen für einen Versuch serumferies Medium verwendet.

Die Zellen wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert.

Sämtliche Zellkulturgefäße stammen von der Firma Nunc, die Inkubationsschränke stammen von der Firma Heraeus

2.3.3 Subkultivierung

Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dies geschah durch Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß mit Hilfe 0,05%iger Trypsinlösung (Gibco), anschließender Resuspension der Zellen in frischem Medium und Verteilung der Suspension auf neue Kulturgefäße.

2.3.4 Transfektion von Zellen

2.3.4.1 *FuGENE – Transfektion*

Dient der hocheffektiven Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmiden

Mit FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA) laut Herstellerangaben. Anwendung bei Hep G2-Zellen.

2.3.4.2 *Kalziumphosphat-Transfektion*

Diese weniger effektive aber günstigere Methode zur Transfektion eukaryotischer Zellen wurde bei HEK-293-Zellen verwendet.

Zunächst wurden etwa 25 µg der zu transfizierenden DNA in H₂O, 0,5 µg pEGFP in H₂O als Marker, 183 µl CaCl₂, 2M sowie H₂O auf 1,5 ml zusammenpipettiert, geschüttelt, und kurz abzentrifugiert. Dann wurden 1,5 ml HBS (275 mM NaCl, 1,4mM Na₂HPO₄, 10mM KCl, 12mM Glucose, 40mM HEPES pH 7,0) tropfenweise dazugeben und anschließend etwa 30s lang Luftblasen mit einer Pasteurpipette durchperlen gelassen. Die Lösung trübte aufgrund der Bildung von Kalziumphosphat-Kristallen leicht ein. Sie blieb etwa 15 min bei Raumtemperatur stehen und wurde dann tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen ca. 12h bei 37°C inkubiert. Der Transfektionserfolg wurde bei Verwendung von pEGFP nach 24-48 Stunden mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert.

2.3.5 Retroviraler Gentransfer

Jedes Retrovirus enthält die Gene GAG (gruppenspezifisches Antigen), POL (reverse Transkriptase) und ENV (Hüllprotein). Das Plasmid pWZL-Blasto enthält das GAG-Gen, während die Verpackungszellen (Phoenix-Zellen) POL und ENV exprimieren. Nach Transfektion von Phoenix-Zellen mit pWZL-Blasto ergibt sich ein komplettes Retrovirus-Basisgenom, welches zusätzlich die in den Vektor eingebrachte DNA enthält und somit eine stabile Expression dieser DNA-Abschnitte in infizierten Zellen ermöglicht.

Die Transfektion der Verpackungszellen erfolgte mittels Kalziumphosphat-Transfektion, am darauf folgenden Tag wurden die Zellen jedoch in einen Brutschrank mit 32°C überführt, um die produzierten Retroviren zu stabilisieren. Der retrovirushaltige Überstand konnte weitere 24h später abpipettiert werden. Er wurde auf -20°C gekühlt, um möglicherweise mit abgenommene nicht transfizierte Verpackungszellen durch den Gefrierprozeß zu eliminieren und die Zielzellen vor Kontamination zu schützen.

Die zu infizierenden Zellen wurden auf zentrifugierbaren Kulturschalen kultiviert, bis sie eine Konfluenz von ca. 50% erreichen. Die Zellen wurden im Anschluß mit 1ml frischem Medium pro Feld, sowie 3µl Polybrene und 3µl 10⁻³ M Insulin (Roche Molecular Biochemicals) überschichtet. Darauf wurden jeweils 2ml des virushaltigen Medium pipettiert. Die Kulturplatte wurde nun für 1,5h bei Raumtemperatur und 3.400U/min zentrifugiert, um die Retroviren auf die Zelloberfläche zu bringen. Die Zellen wurden anschließend für ca. 2d bei 32°C inkubiert.

2.3.6 Selektionierung der Zellen

Nach der Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien wurde eine hohe Reinheit der Kultur angestrebt, um messbare Effekte zu stabilisieren. Als Selektionskriterium dienten auf dem Plasmid liegende Antibiotika-Resistenzgene. Da die Ausprägung der Resistenz mit der Expression durch den Vektor eingebrachter Gene korreliert (s. 3.2), wurden unterschiedliche Antibiotika-

Konzentrationen gewählt um Zellkulturen zu erhalten, die das Zielgen unterschiedlich stark exprimieren sollten. Bei gegebener Konstellation wurden Blasticidinkonzentrationen von 2µg/ml, 5µg/ml oder 10µg/ml gewählt. Das Medium wurde in zweitägigen Abständen gewechselt, um die Antibiotikakonzentration in der Zellkultur stabil zu halten. Zur Kontrolle wurden parallel nicht infizierte Zellen mit gleichen Antibiotikakonzentrationen behandelt, bis diese abgestorben waren.

2.4 Proteinchemische Arbeitstechniken

2.4.1 Immunpräzipitation

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 10cm-Kulturschale wurden mit 500µl Akt-LB (50mM Hepes (pH 7,6), 150mM NaCl, 10%vol Glycerin, 1%vol Triton X100, 1mM PMSF, 1mM Benzamidin, 1mM Na₃VO₄, 30mM Na₄P₂O₇, 10mM NaF, 1mM EDTA, 1mM DDT, 100 nM Ocadaïnsäure) lysiert und anschließend für 15min bei 14.000U/min und 4°C abzentrifugiert. 300-500µl vom Überstand wurden mit 30µl einer Suspension Antikörper-Tragender Protein-G-Sepharosekügelchen (Amersham Pharmacia) versetzt und für mindestens 2h bei 4°C im Überkopfschüttler vermengt. Daraufhin wurden die Kügelchen abzentrifugiert und zweimal mit TBS-T-Puffer gewaschen.

2.4.2 Western Blot

Sämtlichen Western Blots ging zur Erhöhung der Trennschärfe eine Immunpräzipitation (s. 2.4.1) voran. Die daraus resultierenden Sepharose-Beads wurden in 30µl Laemmli-Lösung (Formamid 96µl, 10x Mops 20µl, Formaldehyd 35µl, 37% Glycerol 29µl, 0.1% Bromphenolblau 20µl) suspendiert und etwa 5min bei 95°C aufgelöst. Ca. 10-15µl der Lösung wurden elektrophoretisch für etwa 45min bei 200V im 7,5% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Zum Größenvergleich diente der Kaleidoskop Proteinstandard (Bio-Rad).

Anschließend wurden die Proben elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membran, Schleicher&Schuell) aufgebracht (30min bei 400mA). Nicht mit Proteinen besetzte Areale der Membran wurden mit BSA geblockt. Die Membran wurde daraufhin für mindestens 1h bei 4°C in der proteinspezifischen Antikörperlösung (Verdünnung laut Hersteller, meist etwa 1:5.000 bis 1:10.000) und anschließend für mindestens 1h in Peroxidase-gekoppeltem Anti-IgG (1:5000) geschwenkt. Nach 5 Waschgängen in TBS-T von jeweils 5min Dauer wurde die Membran kurz in Entwicklungslösung (100µl Cumarinsäure; 200µl Luminol; 500µl TrisCl, 3M, pH8,8; H₂O auf 20ml und unmittelbar vor Gebrauch 20µl H₂O₂, 30%) geschwenkt.

Unmittelbar anschließend erfolgte eine Exposition auf einen Röntgenfilm für 5min, 1min und 15s, sowie anschließende Entwicklung des Filmes.

2.4.3 Luziferase-Assay

Das Luziferase-Assay ist ein Reporter-gen-Assay, d.h. in den zu untersuchenden Zellen ist der Promotorregion eines spezifischen Gens die Luziferase-Sequenz nachgeschaltet, so dass das Luziferase-Gen bei Aktivierung der entsprechenden Promotorregion exprimiert wird.

Nach proteinschonender Lyse der Zellen konnte somit nach Zugabe des Luziferase-Substrates die Promotoraktivität einfach in Form von Lichtaktivität nachgewiesen und im Luminometer (EG&G Berthold Lumat LB9507) quantifiziert werden. Puffer und Substrat stammten von der Firma Promega (Luciferase Assay kit).

2.4.4 BCA-Assay

Das BCA-Assay (Pierce) zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die Messung erfolgte im Photometer (LAMBDA E, MWG-BIOTECH) gegen einen Leerwert (nur Lösungsmittel) und verschiedene Proteinstandards (BSA, im für die Zell-Lyse verwendeten Lösungsmittel). Ausgewertet wurde mit der Software KC4-Kineticalc (Bio-Tec Instruments Corporation).

2.5 Statistische Analyse

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Experimente wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests auf Signifikanz überprüft. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Das Erreichen des Signifikanzniveaus ist in den Grafiken mit „*“ gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellen des induzierbaren FOXO1a-Konstruktes

Schematische Darstellung der Arbeitsschritte:

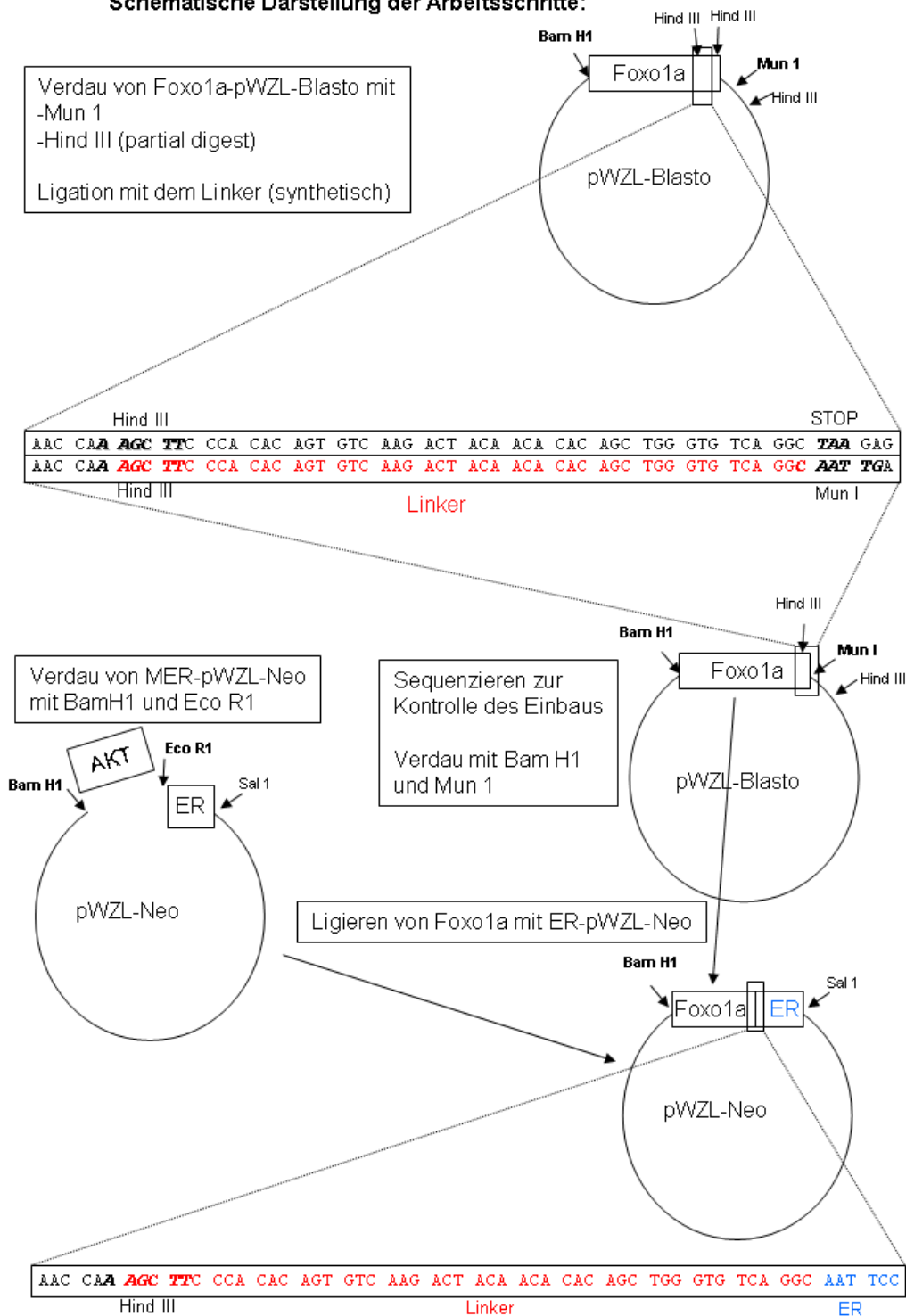


Abbildung 5: Herstellung des induzierbaren FOXO1a-Konstruktes: Nach Verdau des Vektors FOXO1a-pWZL-Blasto mit Mun1 sowie partiellem Verdau mit Hind III wurde die FOXO1a-CDS mit einem synthetisch hergestellten Linker ligiert, in welchem das Stop-Codon der FOXO1a-Sequenz eliminiert worden war. Durch Verdau mit Bam H1 und Mun1 wurde dieses FOXO1a-Segment separiert und in den Vektor MER-pWZL-Neo (Kohn et al., 1998) kloniert, aus dem zuvor mittels Bam H1 und Eco R1 die Akt-CDS entfernt worden war. Der so entstandene ORF des FOXO1a-ER-Konstruktes wurde mittels Sequenzierung gesichert.

Die Herstellung des Konstruktes setzte sich aus mehreren Restriktions- und Ligationsschritten zusammen. Als Vektoren wurden hauptsächlich pWZL-Vektoren verwendet, da diese sich zur Herstellung von Retroviren eignen, was für die spätere Herstellung der stabilen Zelllinie nötig war.

Zunächst wurde FOXO1a-pWZL-Blasto mit MUN1 verdaut. Das Edukt, ein linearisierter Vektor wurde nun mit Hind-3 partiell verdaut. Dies war wichtig, da eine der drei vorhandenen Hind-3-Schnittstellen beibehalten werden musste. Der partielle Verdau erfolgt durch Verdau von vier Ansätzen, die unterschiedlich lange (15, 30, 45, 60min) der Reaktionstemperatur von 37°C und anschließend für kurze Zeit einer Temperatur von 94°C ausgesetzt wurden, um die Enzyme zu denaturieren. Es konnte nun untersucht werden, bei welcher Reaktionszeit der Verdau noch unvollständig war. Da die Längenunterschiede sehr gering (180bp und 220bp) sind, erfolgt eine Auftrennung der Edukte in einem 2%igen Agarosegel unter Verwendung einer 100bp-Leiter.

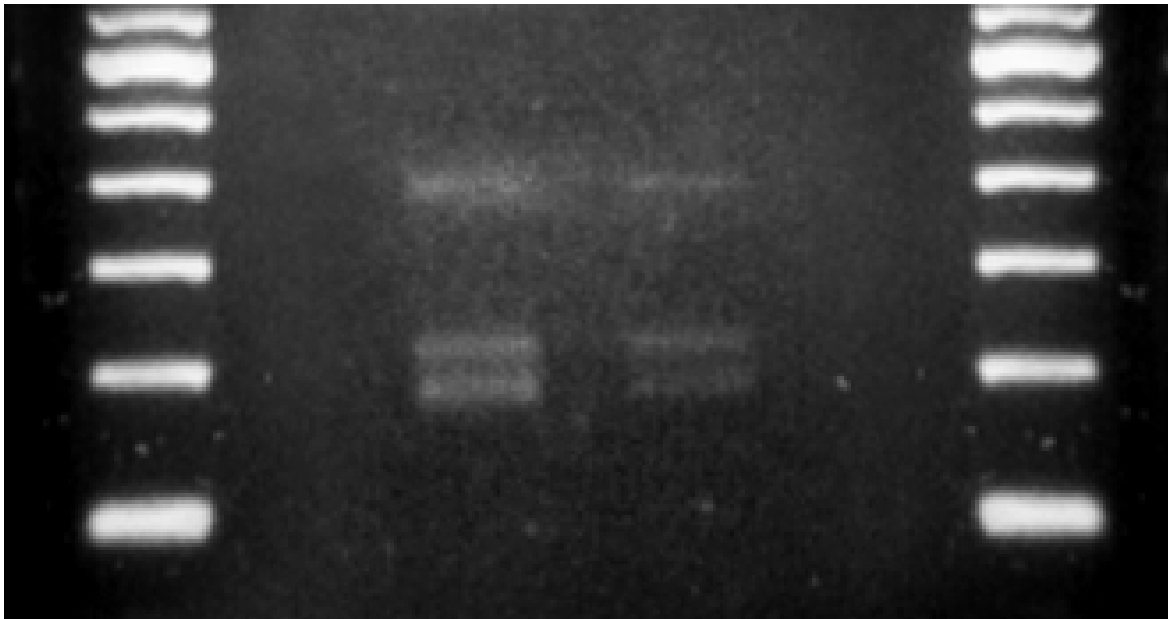


Abbildung 6: DNA-Gelelektrophorese zur Gewinnung eines Zwischenproduktes der Klonierung: mittels partiellen Verdau mit Hind-3 (nach 45 und 60 min). Ganz rechts und links befindet sich der 100bp-Standard. Die beiden mittleren Ansätze entsprechen den kurzen Segmenten aus dem partiellen Verdau (400, 220 und 280 bp; links 45min, rechts 60min). Während im Ansatz links (45min Verdau) noch größere Mengen des 400 bp langen Segmentes (jeweils obere Bande) erkennbar sind, ist die entsprechende Bande nach 60min (rechts) kaum noch erkennbar, was auf einen nahezu vollständigen Verdau sämtlicher HIND-3-Schnittstellen hindeutet.

Hierbei wurden lediglich die kurzen Segmente (180-400bp) betrachtet, da die langen Segmente um 6000 bp aufgrund ihrer relativ geringen Längenunterschiede im Gel nicht sauber differenziert werden können. Die langen Fragmente wurden im Anschluss gemeinsam aus dem Gel extrahiert und mit einem synthetischen 48bp langen DNA-Linker (MWG Biotech) ligiert. Dieser Linker ersetzte den 5'-Terminus des FOXO1a-Gens mit Ausnahme des Stopkodons, und endete mit einer Mun-1-Schnittstelle (s. Abb. 5). Durch die Ligation sollten theoretisch unterschiedlich lange Vektoren entstehen.

Nach Transformation in DH5 α -E.Colis und Anzüchten auf Ampicillin-Agar ergaben sich tatsächlich drei Kolonien, mit denen weitergearbeitet wurde. Der ordnungsgemäße Einbau des Linkers wurde an dieser Stelle zunächst durch einen Restriktionsverdau mit Bgl II im Puffer Gibco III und anschließend durch Sequenzierung gesichert.

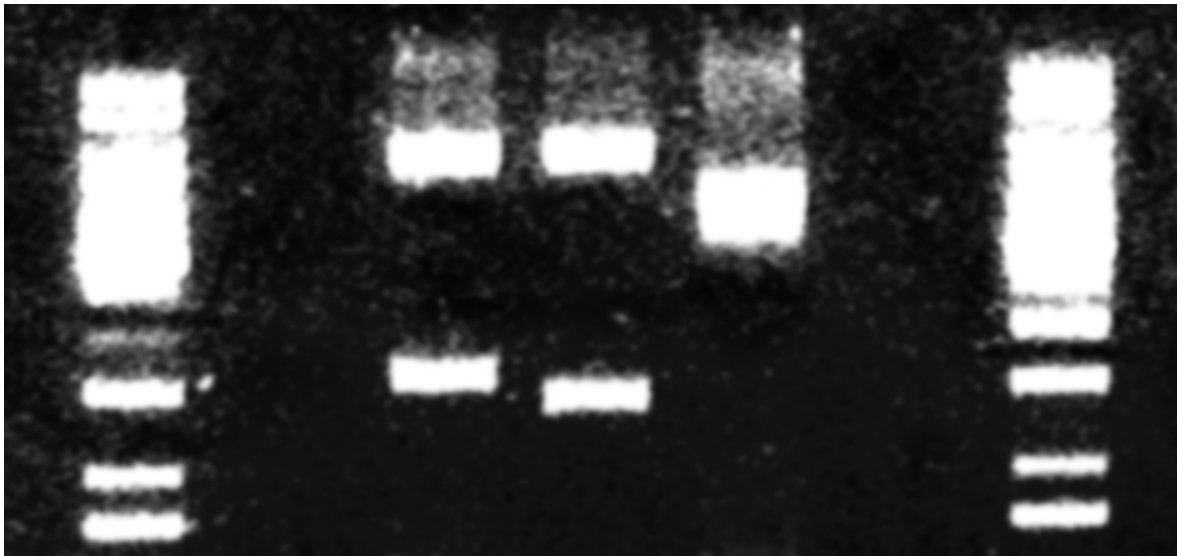


Abbildung 7: Kontrollverdau der drei Plasmide mit Bgl II. Lediglich die beiden linken Ansätze weisen überhaupt die beiden postulierten BGL-II-Schnittstellen auf. Das Plasmid in der Mitte konnte mittels Sequenzierung bestätigt werden und enthielt genau einen eingebauten Linker.

Die entsprechende Kolonie wurde im ampicillinhaltigen LB-Flüssigmedium kultiviert, um genügend Material für die weiteren Arbeitsschritte zu erhalten. Nach Extraktion des Plasmides und Aufreinigung erfolgte ein weiterer Verdau, bei welchem mit Bam H1 und Mun1 das FOXO1a-Linker-Segment aus dem bisherigen Vektor herausgeschnitten wurde. Die Edukte der Reaktion wurden im 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt. Weiter verwendet wurde das erwartete 2000bp lange Segment, welches mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit aus dem Agarosegel extrahiert wurde.

Aus dem ebenfalls bereits vorhandenen Vektor MER-pWZL-Neo (Kohn et al., 1998) wurde mit Bam H1 und Eco R1 die AKT-Sequenz herausgeschnitten. Es erfolgte eine Aufreinigung im Agarosegel. Der Vektor mit der ER-cds wurde aus dem Gel extrahiert und mit dem zuvor aufgereinigten FOXO1a-Linker-Segment ligiert. Das Produkt wurde mittels Restriktionsanalyse und Ansequenzierung bestätigt.

Nun sollten zunächst grundlegende Funktionstests mit dem Konstrukt durchgeführt werden. Dazu wurde das Konstrukt über die Schnittstellen Bam H1 und Sal 1 in den Vektor pECE umkloniert, da dieser über Promotoreigenschaften verfügt, die besonders für eine transiente Expression des Konstruktes in

eukaryotischen Zellen geeignet sind. Als Zellkultur wurde Hep-G2 gewählt. Da aufgrund publizierter Daten zu erwarten war, dass die Promotoraktivität des G6Pase-Gens induziert wird, wurde zur Funktionskontrolle des induzierbaren FOXO1a-Konstruktes ein G6Pase-Reportergenkonstrukt verwendet. Bei diesem Reportergenkonstrukt wird die Expression des Luziferasegens durch den Promotor des G6Pase-Gens reguliert (Schmoll et al. 1999). Eine erhöhte Aktivität von FOXO1a würde also eine erhöhte Aktivität der Luziferase nach sich ziehen.

Beim ersten Versuch wurde der Vektor FOXO1a-ER-pECE in unterschiedlichen Mengen in die Zielzellen transfiziert.

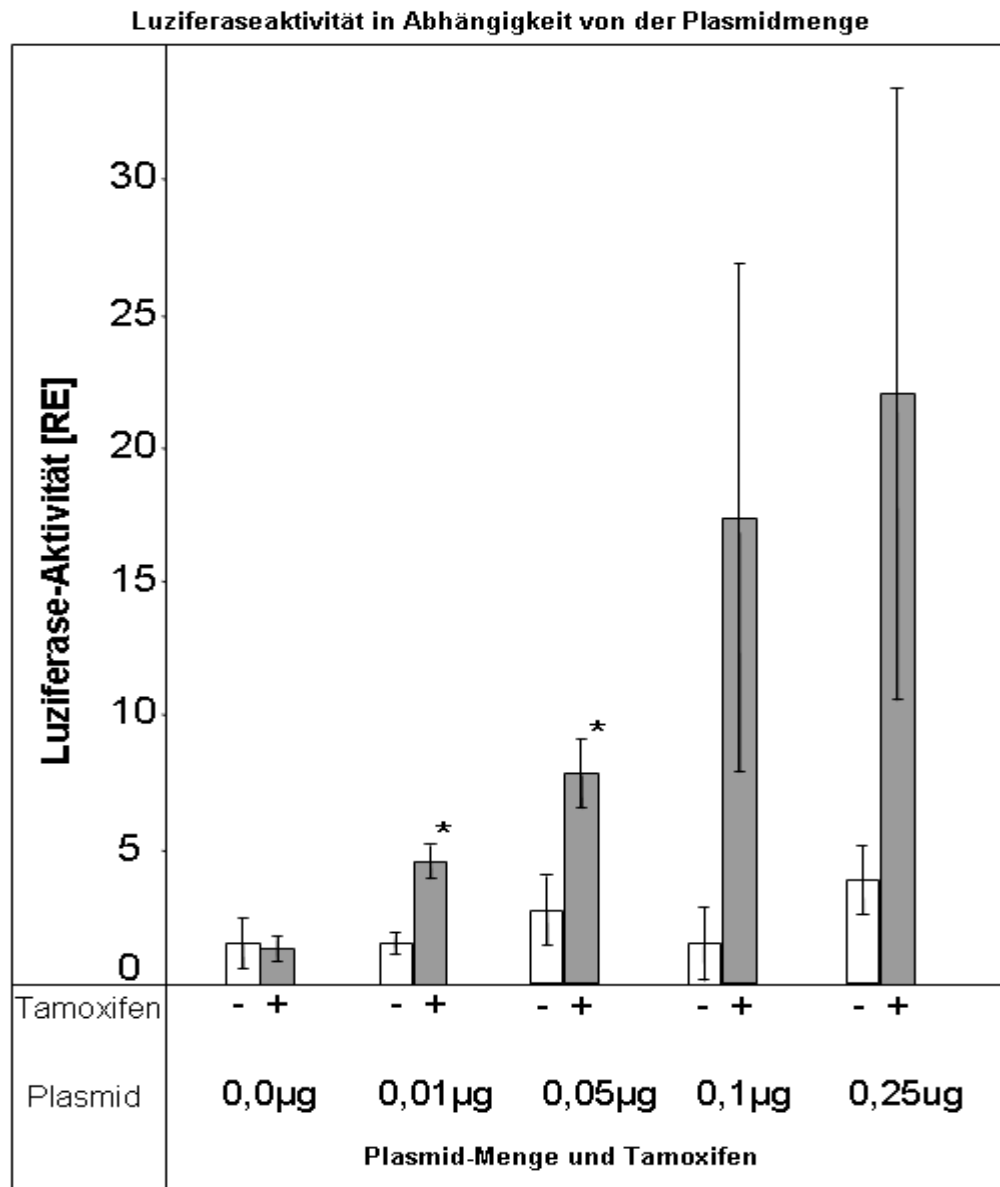


Abbildung 8: Transaktivierung des Glucose-6-Phosphatasepromotors durch das induzierbare FOXO1a-ER-Konstrukt. Das Plasmid FOXO1a-ER-pECE wurde in unterschiedlichen Konzentrationen mittels transients Transfektion in die Zielzellen (Hep-G2) eingebracht. Die Grafik zeigt die Zunahme der Promotoraktivität mit steigenden Konzentrationen des transfizierten Plasmids. Dabei zeigt die basale Aktivität des Konstruktes allenfalls bei hohen Konzentrationen eine Zunahme, während eine deutliche Aktivitätszunahme nach Tamoxifenzugabe (10^{-6} M) mit ansteigenden Plasmidkonzentrationen erkennbar ist. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus insgesamt drei Versuchen ($\pm$ Standardabweichung). Die Signifikanz wurde jeweils bei gleicher Plasmidmenge gegenüber den Zellen ohne Tamoxifenbehandlung ermittelt.

Es zeigte sich, dass die basale Aktivität der Luziferase nur geringen Schwankungen unterlag, während nach Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen eine - in Abhängigkeit von der für die Transfektion verwendeten DNA-Menge ansteigende Luziferaseaktivität erkennbar war.

In weiteren Versuchen wurde bei mit identischen Konzentrationen des Plasmides transfizierten Zellen die Abhängigkeit der Promotoraktivität von der Tamoxifenkonzentration bestimmt. Die Negativkontrollen wurden dabei mit dem leeren Vektor pECE transfiziert. Die getesteten Konzentrationen lagen bei 10^{-8}M , 10^{-7}M und 10^{-6}M .

Auch hier zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit. Eine Induktion erfolgte lediglich bei den mit Tx behandelten Zellen, die mit dem Vektor FOXO1a-ER-pECE transfiziert wurden. Für die weiteren Versuche wurde mit 10^{-6}M Hydroxytamoxifen stimuliert, da sich erst bei dieser Konzentration signifikante Ergebnisse zeigten.

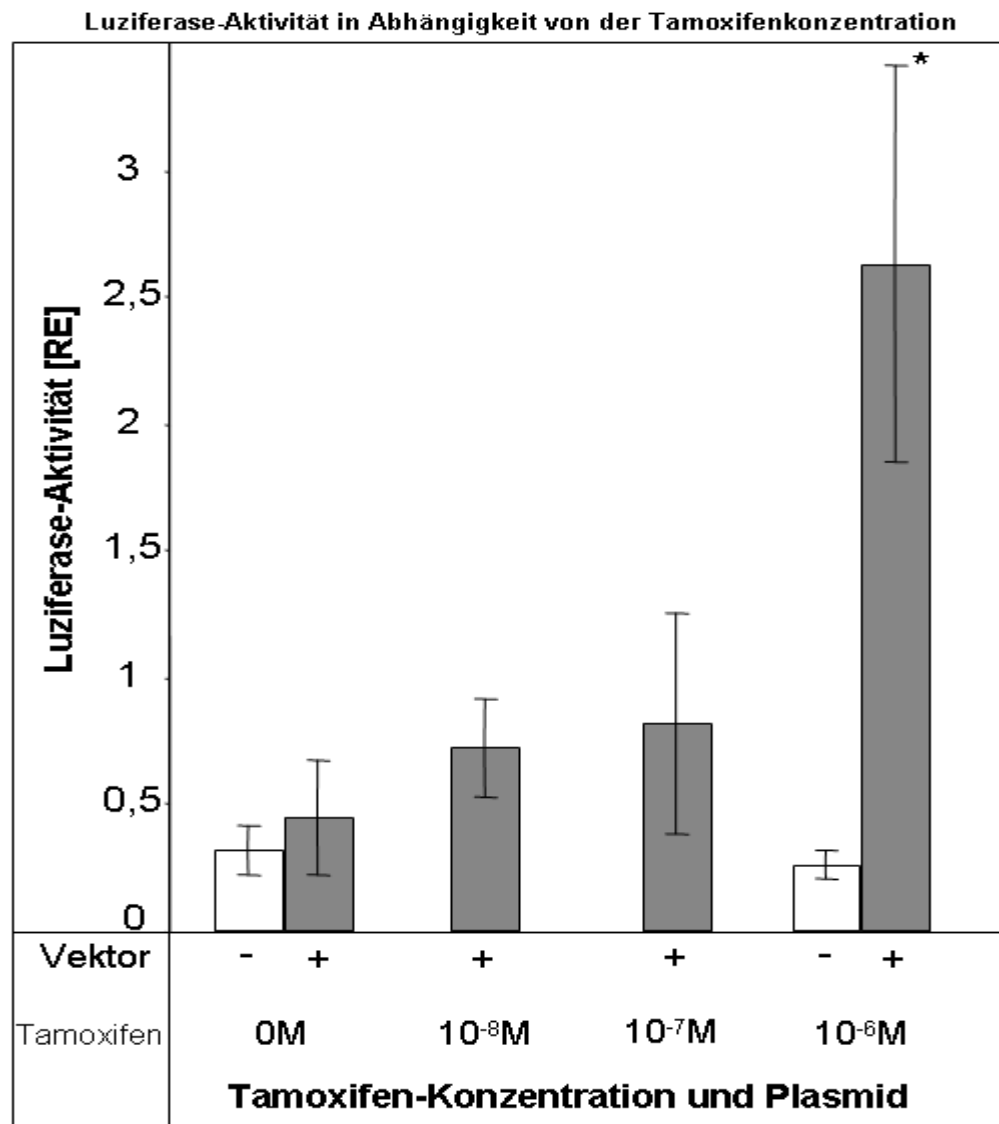


Abbildung 9: FOXO1a-ER-induzierte G6Pasepromotoraktivität in Abhängigkeit von der Tamoxifenkonzentration in HepG2-Zellen. Nach Transfektion mit 0,1µg des oben beschriebenen Vektors und Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen Hydroxytamoxifen wurden die Zellen lysiert und die Lysate einem Reporter-Gen-Assay zugeführt. Es zeigt sich ein deutlicher Sprung der Aktivität bei einer Konzentration von 10⁻⁶M Hydroxytamoxifen. Die weißen Balken zeigen Negativkontrollen, dabei wurden die Transfektionsschritte mit dem reinen pECE-Vektor ohne das FOXO1a-ER-Konstrukt durchgeführt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus insgesamt drei Versuchen (± Standardabweichung). Eine Untersuchung der Signifikanz erfolgte zwischen den Ergebnissen der mit Tamoxifen behandelten Zellen gegenüber unbehandelten Zellen mit eingebrachtem Plasmid (2. Balken von links). Eine Signifikanz ließ sich nur bei einer Tamoxifenkonzentration von 10⁻⁶M erreichen.

3.2 Herstellen der stabil transfizierten Hepatomzelllinie

Nachdem sich das Konstrukt als funktionsfähig erwiesen hatte, sollte nun, um konstant reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, eine Zellreihe hepatischen Ursprungs hergestellt werden, die das FOXO1a-ER-Konstrukt stabil exprimiert.

Die Wahl des Zellsystems fiel auf H4-Zellen, da diese sehr gut charakterisiert sind, eine hohe Insulinempfindlichkeit sowie eine hohe Differenzierung (erhaltene Regulation der Gluconeogenese) aufweisen. Es wurde eine H4-Zelllinie eingesetzt, die bereits zuvor mit einem Luziferase-Gen, welches über einen FOXO1a-sensiblen Promotor reguliert wird, stabil transfiziert worden war (sog. H4-CC-Zellen). Aus diesem Grund konnte dann später im Luziferase-Assay schnell und problemlos die transkriptionelle Aktivität von FOXO1a bzw. dem FOXO1a-ER-Konstrukt bestimmt werden.

Das FOXO1a-ER-Konstrukt wurde folgendermaßen in die Zellen eingebracht: Zur Herstellung von Retroviren wurde zunächst eine Kalziumphosphat-Transfektion einer Verpackungs-Zelllinie (Φ -Zellen) mit dem bereits zu Beginn hergestellten Plasmid FOXO1a-ER-pWZL-Neo durchgeführt. Die transfizierten Zellen produzierten nun Retroviren, deren Genom das FOXO1a-ER-Gen und ein Resistenzgen für Blasticidin enthielt. Mit diesen Retroviren wurden nun H4-CC-Zellen infiziert (s. 2.3.5), welche anschließend mit Blasticidin selektioniert wurden (s. 2.3.6). Um die Expression des FOXO1a-ER-Konstruktes zu kontrollieren, wurden mehrere Ansätze der infizierten Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikums selektioniert.

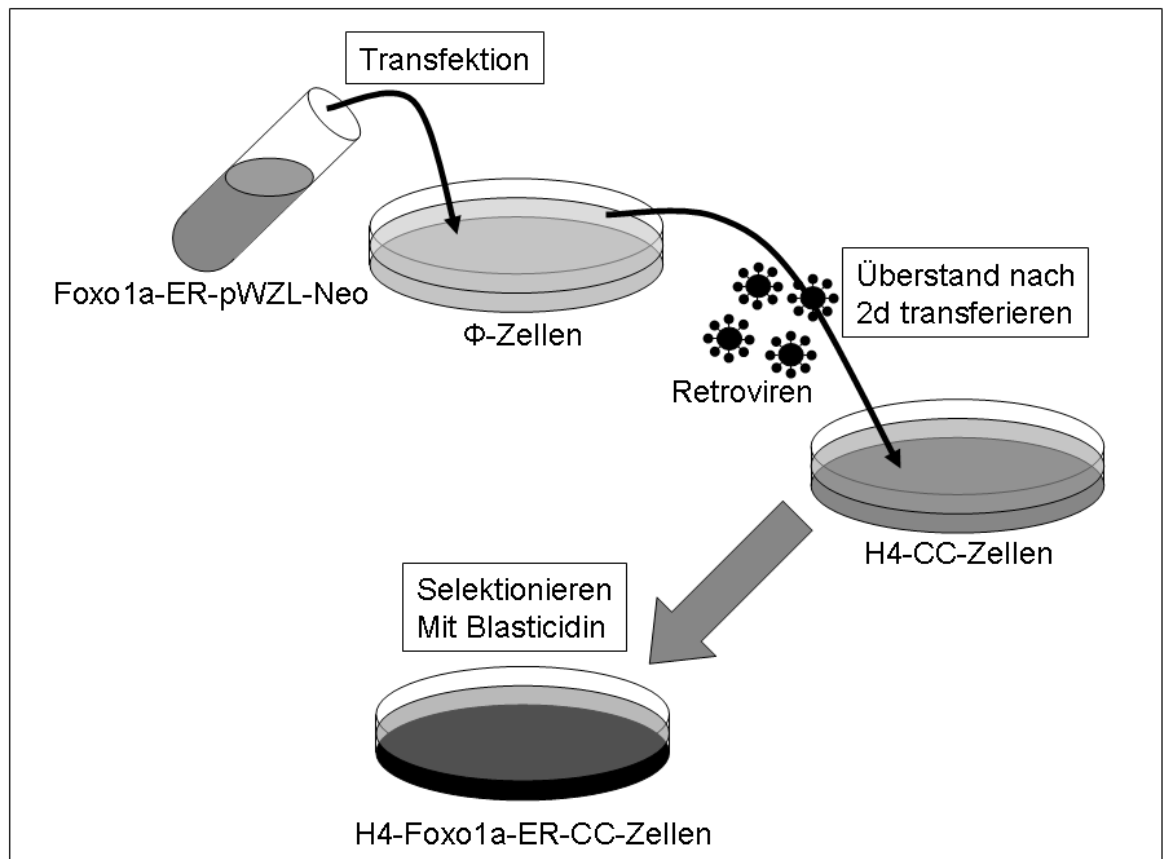


Abbildung 10: retroviraler Gentransfer: Nach Transfektion von Φ -Zellen produzierten diese Retroviren, mit deren Hilfe H4-CC-Zellen stabil mit dem FOXO1a-ER-Konstrukt unter Selektion mit Blasticidin transfiziert werden konnten.

Der Erfolg der Infektion wurde nachfolgend per Luziferase-Assay bestimmt.

Dabei stellte sich heraus, dass bei den mit höheren Konzentrationen (5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ Blasticidin) behandelten Zellen die Luziferase-Aktivität auch im unstimulierten Zustand bereits über dem basalen Niveau lag. Dies lässt sich so interpretieren, dass das vermehrt exprimierte FOXO1a-ER-Konstrukt nicht mehr vollständig durch das zelleigene HSP90 maskiert werden konnte und so die freie, aktive Form des Konstruktes die Transkription beeinflusst. Diese Zellen waren selbstverständlich nicht nutzbar, so dass im Folgenden lediglich mit den mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Blasticidin selektionierten Zellen (FOXO1a-ER-CC-2) weitergearbeitet wurde.

Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von Zellpopulation und Tamoxifenbehandlung

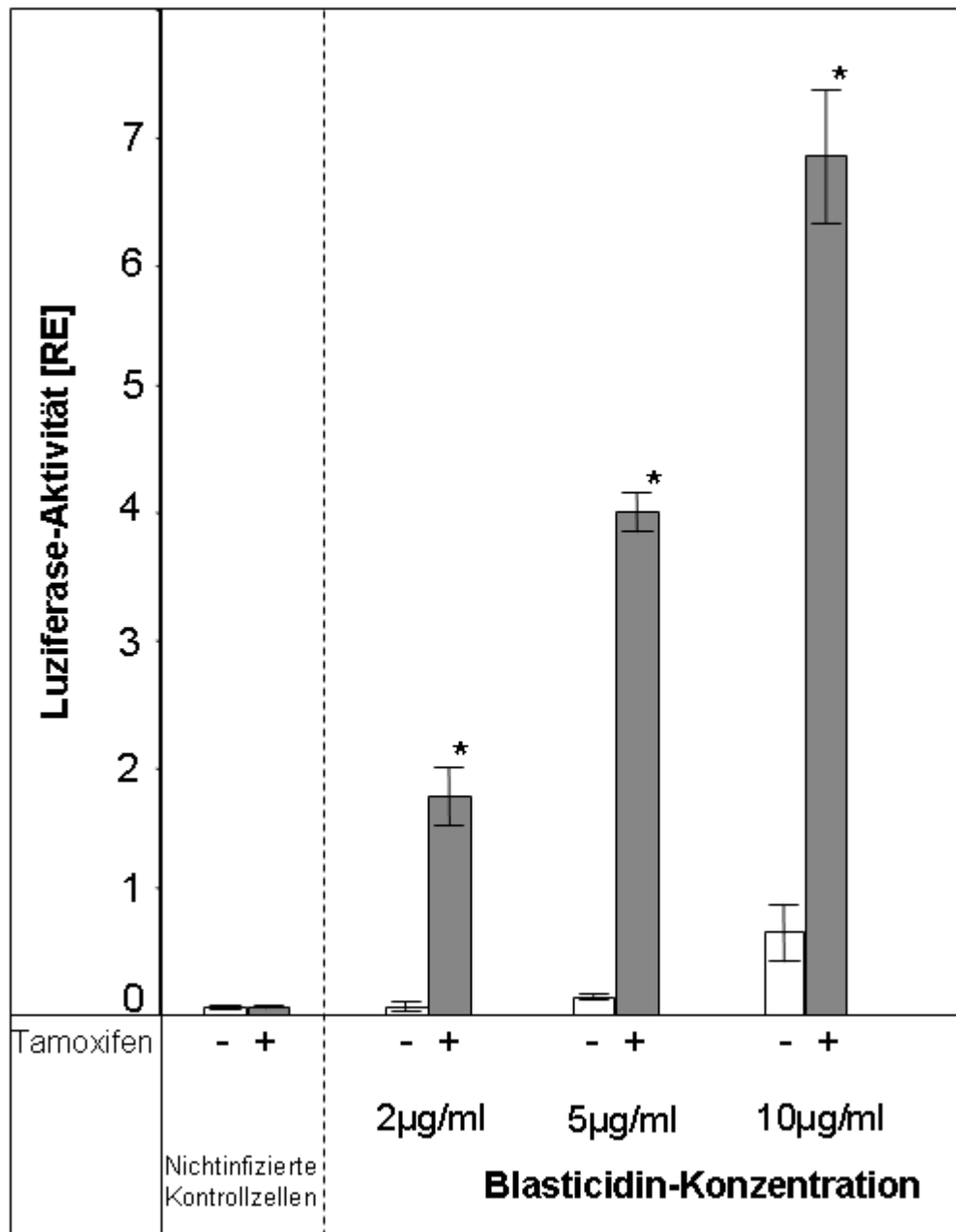


Abbildung 11: Abhängigkeit der FOXO1a-regulierten Promotoraktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des Blasticidin im Selektionsmedium. Tamoxifen: 10^{-6} M. Nach Selektionierung der infizierten Zellen zeigte sich bei höheren Antibiotika-Konzentrationen bereits eine basal erhöhte Aktivität. In der niedrigsten gewählten Konzentration war dieser Effekt nicht nachweisbar, dies belegt eine hohe Spezifität des Konstruktes für die Aktivierung durch Tamoxifen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus insgesamt drei Versuchen ($\pm$ Standardabweichung).

Weiterhin sollte im Western Blot die Expression des Fusionsproteins in den Zellen überprüft werden. Nach Immunpräzipitation von H4-CC-FOXO1a-ER Zelllysaten mit Anti-FOXO1a-IgG (Lampire Biological Laboratories, Pipersville, PA) wurden die Präzipitate im SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und jeweils mit Anti-FOXO1a- oder Anti-ER-Antikörpern (Santa Cruz) detektiert.

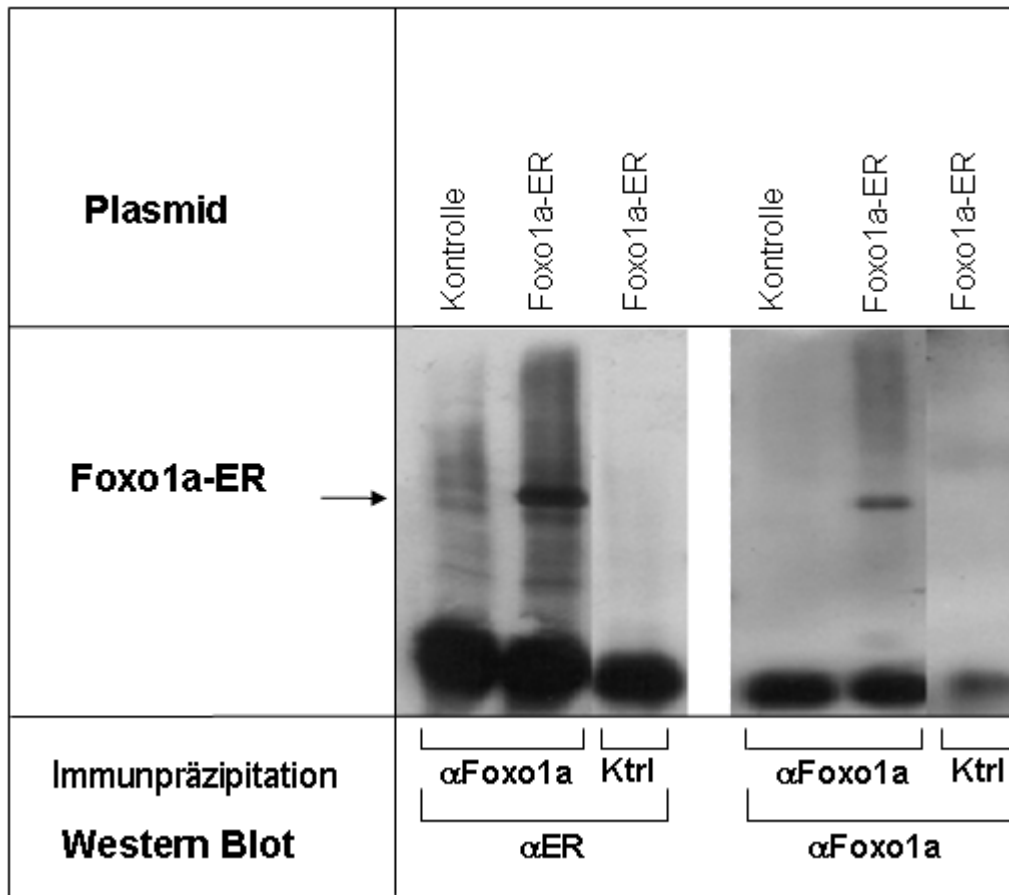


Abbildung 12: Nachweis der Expression von FOXO1a-ER in den stabil transfizierten H4-CC-Zellen mittels Western Blot. Foxo1a-ER-exprimierende Zellen wurden lysiert, die Zellysate wurden daraufhin mit Anti-Foxo1a-Antiserum immunpräzipitiert. Eine Kontroll-Immunpräzipitation ohne spezifisches Antiserum wurde ebenfalls separat durchgeführt und getrennt. Die Präzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Anti-ER-Antikörpern (links) oder Anti-Foxo1a-Antikörpern (rechts) detektiert. Die Abbildung zeigt, dass in beiden Fällen ein Protein mit dem apparenten Molekulargewicht von 120 kDa detektiert wurde (aus der Aminosäuresequenz errechnete Größe des Konstruktes ca. 105 kDa), welches sowohl durch Anti-FOXO1a als auch durch Anti-ER gebunden wurde. In den Kontrollzellen ließ sich ein solches Protein nicht nachweisen. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich um das eingebrachte Hybridprotein handelte.

3.3 Charakterisierung der H4-Zelllinie

Nachdem eine Expression des FOXO1a-ER-Konstruktes in den H4-CC-Zellen erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurden die resultierenden H4-CC-FOXO1a-ER-Zellen systematisch charakterisiert.

Um Effekte durch eine direkte Einwirkung des Hydroxytamoxifens auf die Genexpression zu minimieren, erschien es dabei sinnvoll, mit möglichst niedrigen Konzentrationen an Hydroxytamoxifen zu arbeiten. Zu diesem Zweck sollte untersucht werden, wie sich unterschiedliche Tx-Konzentrationen auf die Luziferase-Aktivität auswirkten.

Es wurden Zellen mit Tamoxifenkonzentrationen von 10^{-10}M bis 10^{-6}M im serumfreien Nährmedium über Nacht inkubiert. Diesen Zellen wurden Negativkontrollen ohne Tamoxifen gegenübergestellt. Die Zellen wurden am Folgetag lysiert und die Promotoraktivität wurde im Reporteragen-Assay gemessen. Die Messwerte wurden über die Proteinkonzentrationen (repräsentativ für die Zellzahl) im Lysat normiert.

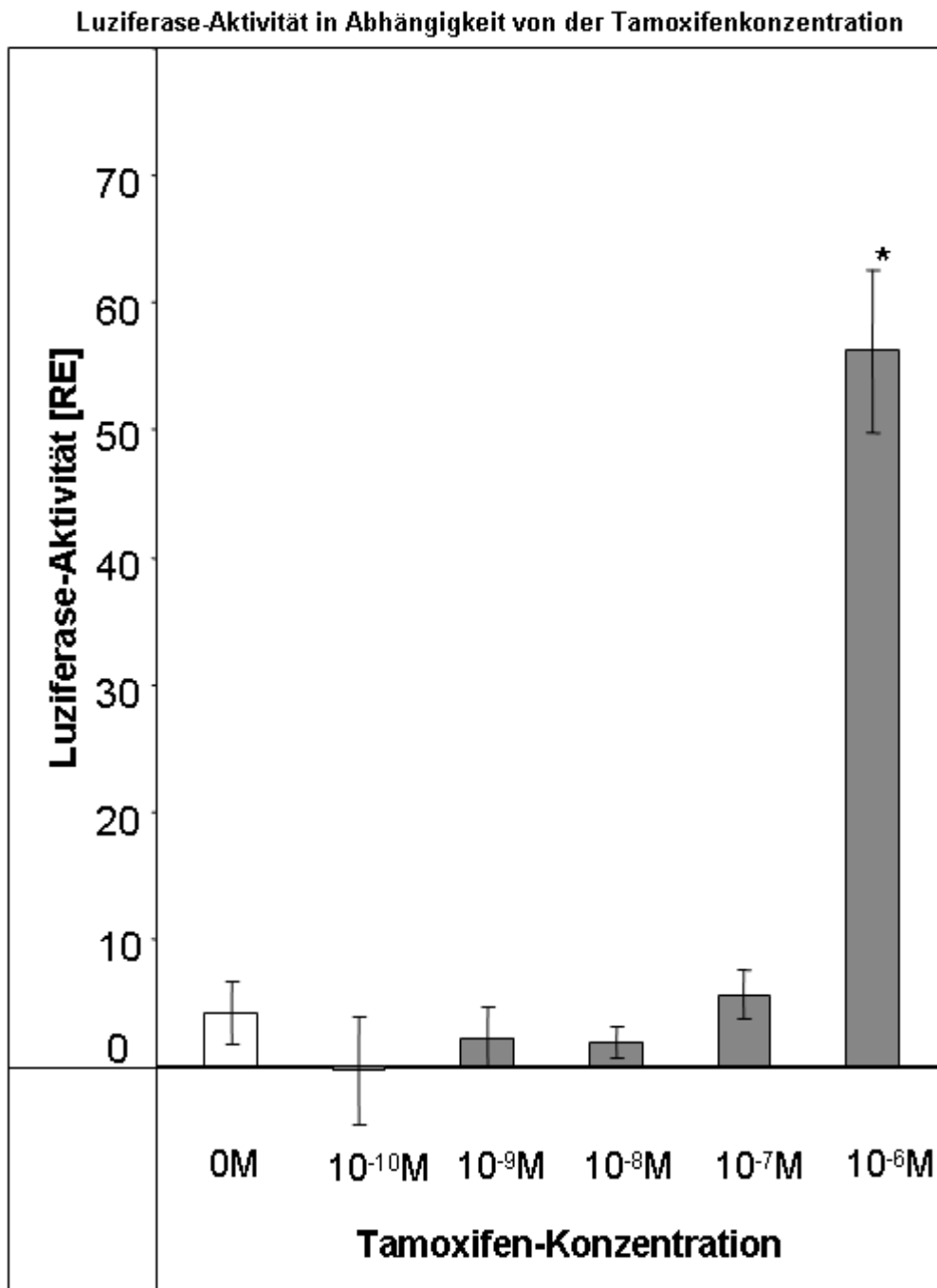


Abbildung 13: FOXO1a-ER-induzierte Promotoraktivität in Abhängigkeit von der Tamoxifenkonzentration in H4-CC-Zellen. Die Zellen wurden mit ansteigenden Tx-Konzentrationen zwischen $10^{-10}M$ und $10^{-6}M$ über Nacht in serumfreiem Medium stimuliert und anschließend lysiert und einem Reporter-gen-Assay zugeführt. Es zeigt sich ein deutlicher Sprung der transkriptionellen Aktivität zwischen $10^{-7}M$ und $10^{-6}M$ Hydroxytamoxifen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus insgesamt drei Versuchen ($\pm$ Standardabweichung).

Signifikanz konnte auch hier erst bei $10^{-6}M$ aufgezeigt werden, so dass in den nachfolgenden Untersuchungen standardmäßig eine entsprechende Hydroxytamoxifen-Konzentration verwendet wurde.

Des Weiteren sollte die Einwirkzeit des Hydroxytamoxifens auf einen möglichst

kurzen Zeitraum reduziert werden, bei dem bereits eine relevante Wirkung erreicht werden konnte, um unspezifische Effekte zu vermeiden.

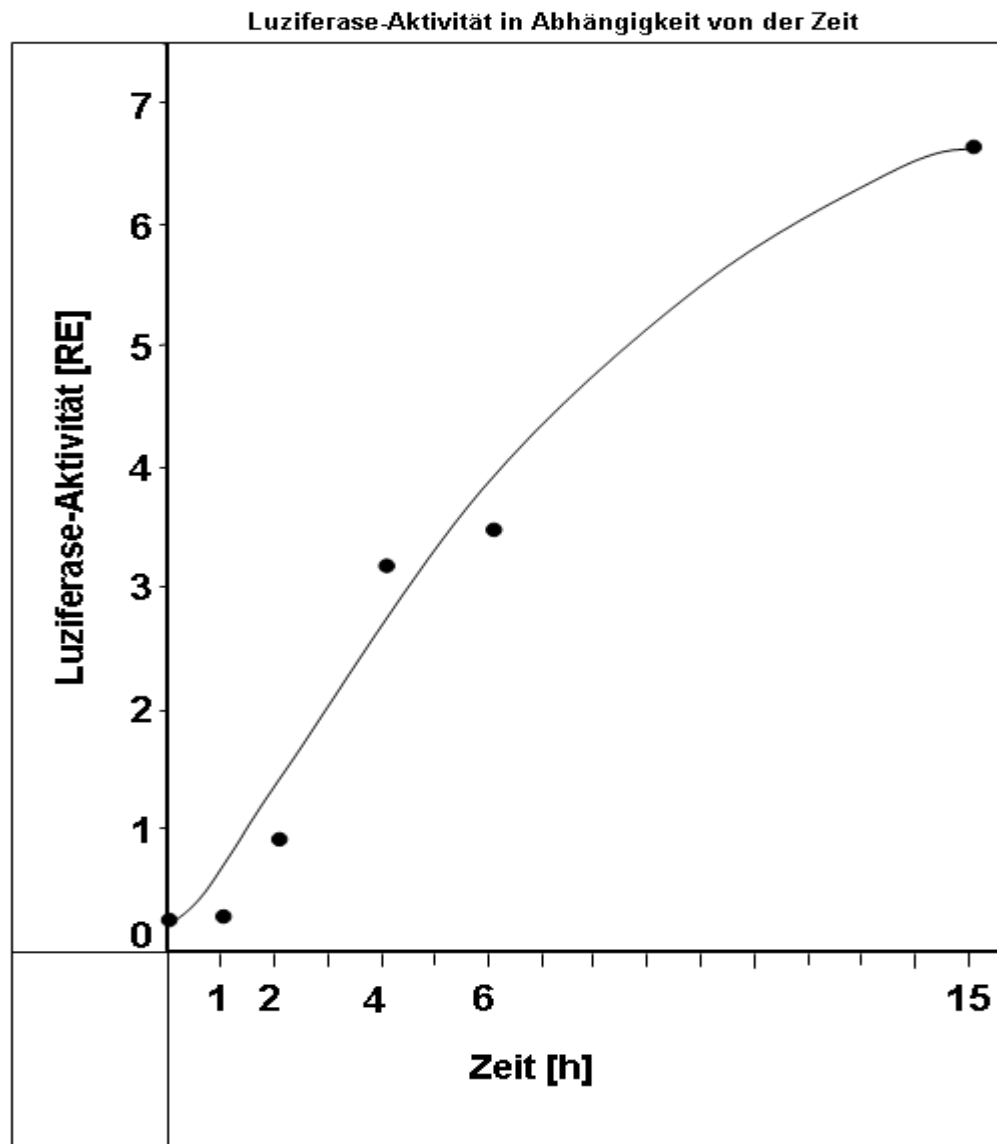


Abbildung 14: Zeitabhängigkeit der FOXO1a-abhängig induzierten Promotoraktivität in H4-CC-Zellen. Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume (0, 1, 2, 4, 6, 15h) mit 10^{-6} M Tx behandelt und anschließend lysiert und einem Reporter-Gen-Assay zugeführt. Bereits nach 4-6 Stunden ist ein deutlicher Effekt erkennbar. Der Versuch wurde mit vergleichbaren Resultaten wiederholt.

Es zeigte sich dabei, dass bereits nach vier bis sechs Stunden ein deutlicher Effekt messbar war, der auch durch die deutlich längeren Expositionsdauern von 15h nicht maßgeblich übertroffen wurde. Die folgenden Versuche erfolgten daher bei einer Expositionsdauer von sechs Stunden.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob das FOXO1a-ER-Konstrukt wie zu erwarten (s. Einleitung) durch Insulin regulierbar ist. Prinzipiell sollte sich also

auch in dem induzierbaren Konstrukt durch Insulin-induzierte Phosphorylierung der oben beschriebenen Aminosäuren eine Abschwächung der Aktivität am synthetischen FOXO1a-Promotor erzielen lassen.

Dazu wurden Kulturen der FOXO1a-ER-CC-Zellen angelegt und für 6h entweder mit Hydroxytamoxifen (1 μ M) oder Hydroxytamoxifen (1 μ M) und Insulin (1nM) inkubiert, zur Kontrolle diente eine Kultur ohne Hydroxytamoxifen oder Insulin.

Die Zellen wurden nach 6-stündiger Behandlung lysiert und die Promotoraktivität wurde im Reporter-gen-Assay gemessen. Die Ergebnisse wurden wie bereits zuvor über die Proteinkonzentration normiert.

Es zeigte sich, dass durch Insulinbehandlung die durch Zugabe von Hydroxytamoxifen induzierte Genexpression am Reporter-gen um etwa 70% supprimiert werden kann. Somit konnte insgesamt ein der physiologischen Regulation entsprechendes Verhalten des induzierbaren FOXO1a-Konstruktes im Zusammenspiel mit dem Promotor-Konstrukt aufgezeigt werden (Abb. 15).

Luziferase-Aktivität in Abhängigkeit von Insulin und Hydroxytamoxifen

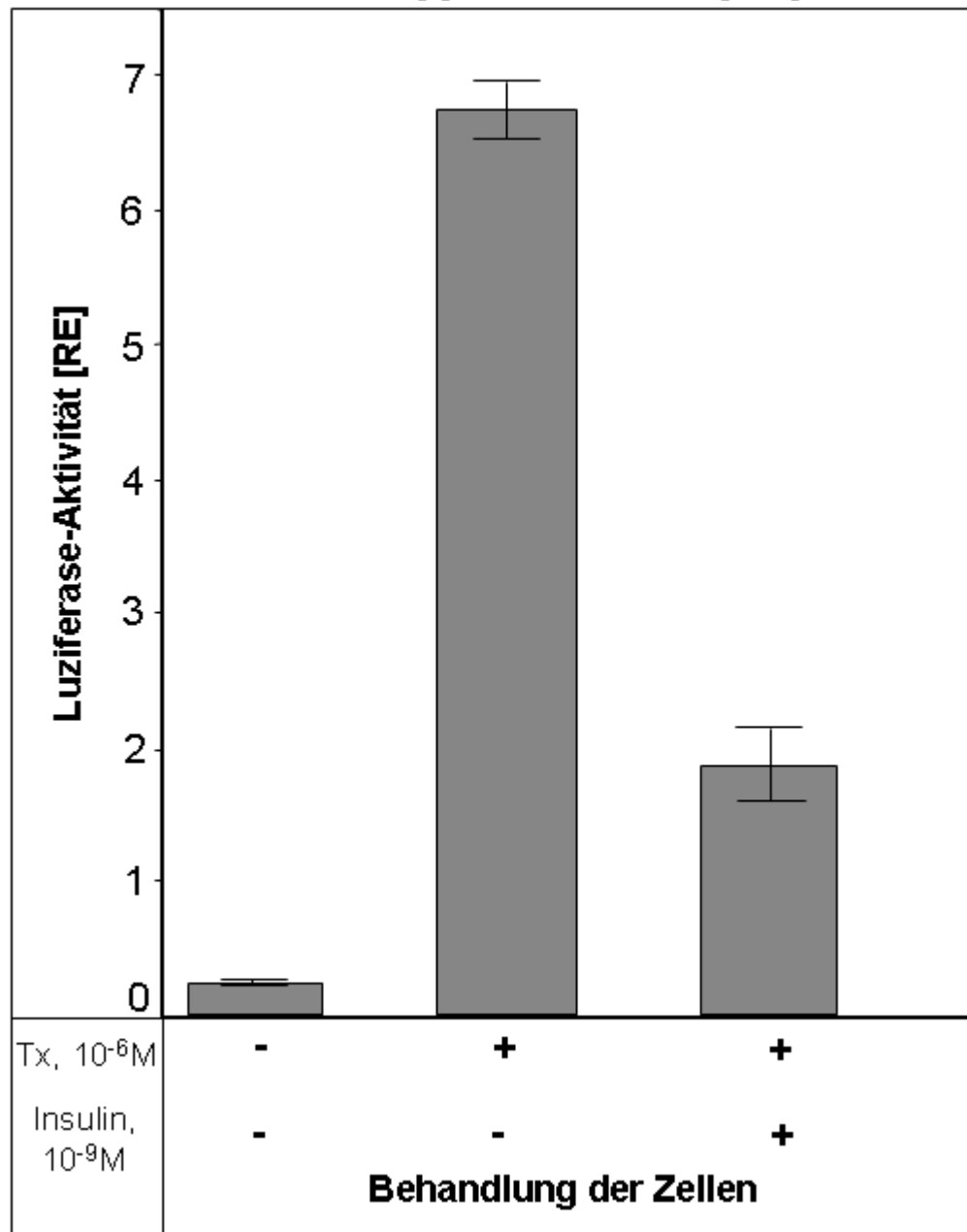


Abbildung 15: Hemmung der induzierbaren FOXO1a-ER-Aktivität durch Insulin in H4-CC-Zellen. Foxo1a-ER-exprimierende H4-Zellen wurden mit 10^{-6} M Hydroxytamoxifen (Mitte) und teilweise zusätzlich mit 10^{-9} M Insulin (rechts) behandelt. Die Zellen wurden lysiert und einem Reporterassay zugeführt. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. Mittels Insulinbehandlung kann die Tamoxifenwirkung weitestgehend antagonisiert werden. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus insgesamt vier Versuchsansätzen ($\pm$ Standardabweichung).

3.4 Regulation der endogenen G6Pase-Expression

3.4.1 Regulation der G6Pase mRNA

Zur Gewinnung der mRNA wurden FOXO1a-ER-CC-Zellen für 18 Stunden mit Hydroxytamoxifen, 1µM und/oder Insulin, 10nM behandelt. Den unbehandelten Zellen wurde die identische Menge des Lösungsmittels (Ethanol) hinzugegeben. Zur Erhöhung der Trennschärfe wurde in sämtlichen Zellen zusätzlich die G6Pase-Aktivität durch Hinzugabe von 500nM Dexamethason und 100µM cAMP stimuliert.

Nach Reinigung der Zellen und Kühlung auf -80°C wurde die Gesamt-RNA extrahiert (RNEasy Mini Kit, Qiagen) und jeweils 10µg der RNA-Proben für die Analyse per Northern-Blot (s. 2.2.10) verwendet.

Der Northern Blot wurde sowohl mit einer Glucose-6-Phosphatase-Sonde, als auch mit einer Aktin-Sonde hybridisiert. Die Messwerte für die G6Pase-Sonde konnten somit über die Messwerte der Aktin-Sonde normiert werden, da die Aktinsynthese nicht reguliert wird.

Da zunächst keine Glucose-6-Phosphatase-Sonde zur Verfügung stand, wurde diese zunächst hergestellt. Dazu wurde die Sequenz „G6Pase, *rattus norvegicus*, L37333, Abschnitt 323-944“ in den Vektor pUC-18 kloniert (s. 2.2.6). Dieser wurde nun durch Elektroporation in *E. coli* eingebracht und durch Kultivieren des Bakteriums vervielfältigt. Es folgte eine Plasmidextraktion nach Holmes und Quigley, eine Sequenzierung zum Verifizieren der korrekten Sequenz (2.2.5) und – nachdem diese gesichert war – eine erneute Anzüchtung des Bakteriums mit darauf folgender Plasmid-Extraktion (Plasmid Maxi Kit, Qiagen). Das G-6-Pase-Fragment mit einer Länge von 621 Basenpaaren konnte nun mit den Restriktionsendonukleasen Bam H1 und Eco R1 ausgeschnitten werden (2.2.1). Eine Auftrennung erfolgte in der Agarose-Gelelektrophorese (2.2.3). Die Sonde wurde daraufhin nach Aufreinigung des DNA-Abschnittes laut Protokoll (2.2.11) synthetisiert. Die Abbildung 16 zeigt ein repräsentatives Ergebnis der Northern

Blots. Dabei fällt auf, dass eine G-6-Pase-Suppression durch Insulin durch die Aktivierung des FOXO1a-Konstruktes mit Hydroxytamoxifen weitgehend aufgehoben wird. Eine Quantifizierung der Banden mit der OptiQuant-Software (Packard, Meriden) verdeutlicht den Effekt.

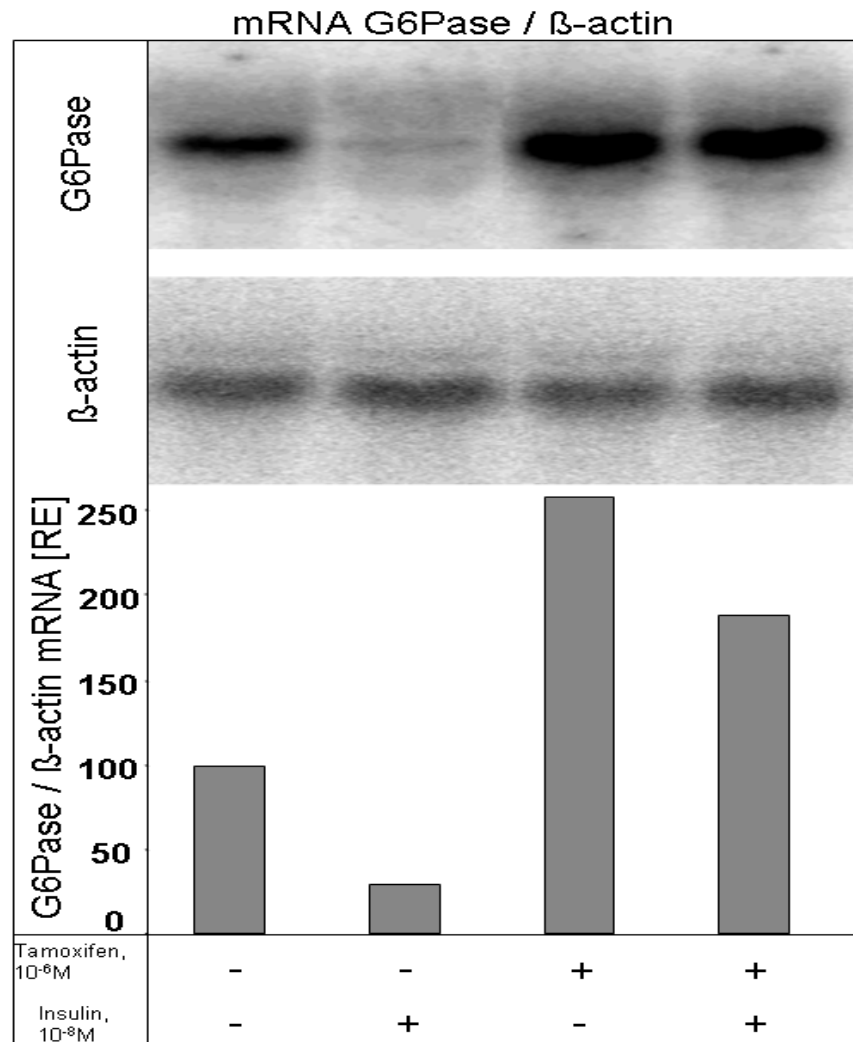


Abbildung 16: Analyse der G6Pase-mRNA-Expression mittels Northernblot. Foxo1a-ER-exprimierende H4-Zellen wurden für 18h nach Hinzugabe von 500nM Dexamethason, 100 μ M cAMP, sowie 10nM Insulin und / oder 1 μ M Tamoxifen oder keiner der beiden Substanzen inkubiert. Im Northern-Blot der Zelllysate zeigt sich eine deutliche Suppression der G-6-Pase-mRNA-Synthese durch Insulin, während eine Induktion durch Tamoxifen erreicht wird. Bei Behandlung mit Tx und Insulin zeigt sich nur noch eine mäßige Suppression durch Insulin. Der Messwert bei den unbehandelten Zellen wurde auf 100 gesetzt. Die angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.4.2 Regulation der G6Pase-Enzymaktivität

Weiterhin sollte auch auf Enzymebene die Induktion der G6Pase-Expression durch das FOXO1a-ER-Konstrukt untersucht werden. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde ein Verfahren verwendet, welches auf einer photometrischen Quantifizierung eines Phosphomolybdat-Komplexes basiert, der mit dem freien Phosphat aus dem aufgespaltenen Glucose-6-Phosphat gebildet wird (Hers 1964).

Dazu wurden zunächst FOXO1a-ER-CC-Zellen zur Induktion des Konstruktes für 0, 8, 20 und 32h mit 10^{-6} M Hydroxytamoxifen inkubiert. Nach Reinigung der Zellen mit PBS-Puffer wurden diese mit 300µl Wasser lysiert und mit 50mM Glucose-6-Phosphat (pH 6,5) versetzt. Um Effekte durch unspezifische Phosphatasen zu korrigieren, wurden zunächst Kontrollen der einzelnen Proben mit 10mM Natriumacetat (pH 5,0) inkubiert. Die eigentliche enzymatische Reaktion lief bei 37°C für 0min und für 20min ab, sie wurde durch Hinzugabe von 33mM H_2SO_4 (Endkonzentration) gestoppt, der farbige Komplex wurde dann durch Hinzugabe von Ammoniummolybdat/ FeSO_4 -Lösung (8mM/144mM) gebildet. Die optische Dichte konnte daraufhin bei 700nm gemessen werden. Die spezifische enzymatische Aktivität wurde über die Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Proben mittels BCA-Assay normiert (2.4.4). Die basale spezifische G6Pase-Aktivität wurde mit 0.127 (± 0.009) U/mg Protein bestimmt. Insgesamt wurde das Experiment drei Mal durchgeführt. Daraus wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das FOXO1a-ER-Fusionsprotein auch am endogenen Promotor des Glucose-6-Phosphatasegens eine Induktion der Expression bewirkt und somit in seiner Wirkung dem endogenen FOXO1a entspricht.

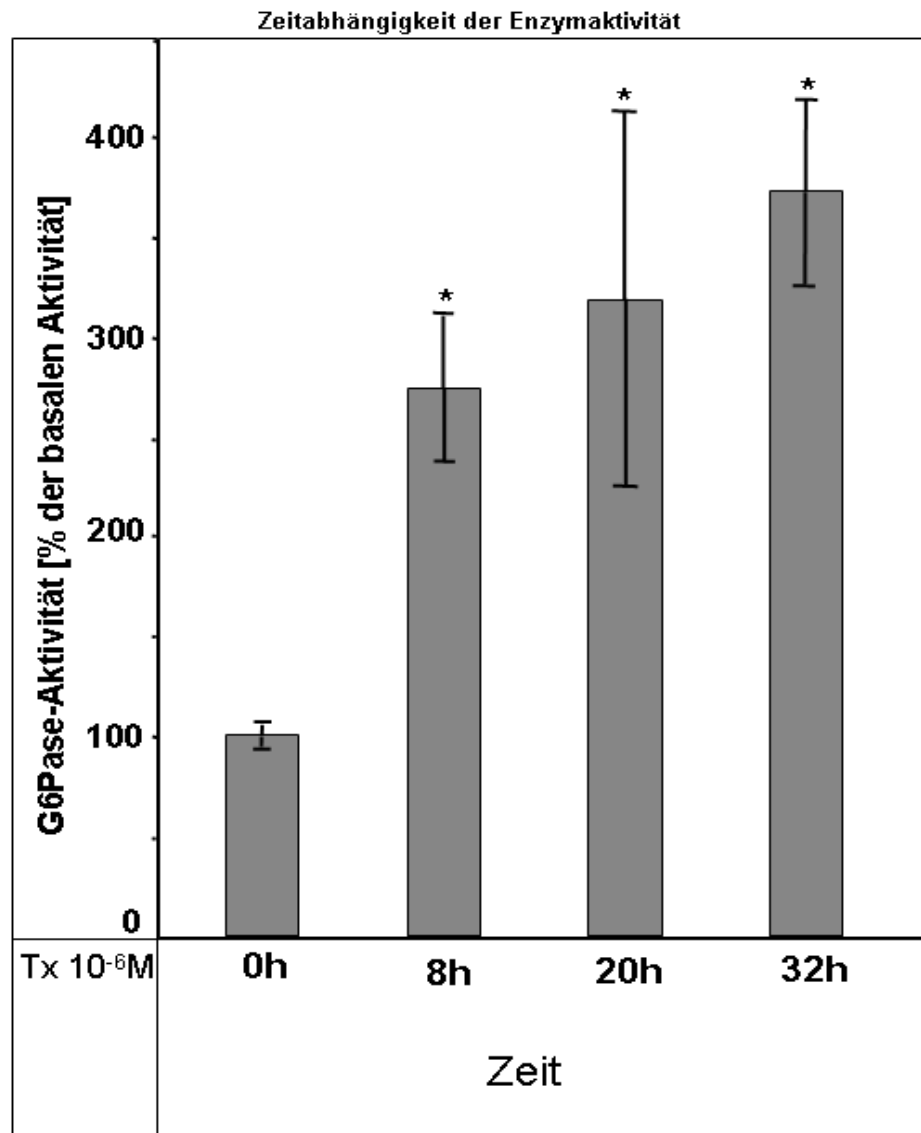


Abbildung 17: Induktion der G6Pase-Enzymaktivität durch das FOXO1a-ER-Konstrukt in H4-CC-Zellen. Foxo1a-ER-exprimierende H4-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume mit 10⁻⁶M Hydroxytamoxifen behandelt und lysiert. Den Lysaten wurde Glucose-6-Phosphat hinzu gegeben. Die G6Pase-Aktivität wurde durch photometrische Quantifizierung des freigesetzten Phosphats bestimmt. Dargestellt ist die mittlere spezifische G6Pase-Aktivität bezogen auf die basale Aktivität, sowie Standardabweichungen aus insgesamt drei Experimenten. Bereits 8h nach Inkubation mit 10⁻⁶M Hydroxytamoxifen zeigt sich auch auf enzymatischer Ebene eine deutliche Induktion durch das FOXO1a-Konstrukt.

4 Diskussion

4.1 Das induzierbare FOXO1a-Konstrukt

Um die Funktion des "Forkhead"-Transkriptionsfaktors FOXO1a zu untersuchen, wurde eine konditionell aktivierbare Version von FOXO1a hergestellt, deren Aktivität durch Hinzugabe von 4-Hydroxytamoxifen induziert werden kann. Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch die Fusion des C-terminalen Endes von FOXO1a mit der hormonbindenden Domäne des Estrogenrezeptors die transkriptionelle Aktivität dieses Fusionsproteins (FOXO1a-ER) durch exogenes Hydroxytamoxifen induziert werden kann.

Nach der Zugabe von Hydroxytamoxifen wird in kurzer Zeit die Aktivität des FOXO1a-ER-Fusionsproteins induziert, was anhand von Reporter-gen-Konstrukten auf der Basis des G6Pase-Promotors in humanen HepG2 sowie Rattenhepatomzellen (H4IIEC3) gezeigt werden konnte.

Zur genaueren Analyse der biologischen Funktion von FOXO1a wurde das Gen für das FOXO1a-ER-Fusionsprotein in einer H4IIEC3-Zelllinie mittels eines retroviralen Systems stabil exprimiert. H4IIEC3-Zellen sind eine hoch differenzierte Ratten-Hepatom-Zelllinie, deren insulinabhängige Regulation von Stoffwechselvorgängen weitgehend der physiologischen Regulation in Hepatozyten entspricht. Aufgrund ihrer erhaltenen hohen Insulinempfindlichkeit sowie des hepatozytenartigen Phänotyps mit erhaltener Gluconeogenese und insbesondere der erhaltenen Expression gluconeogener Enzyme wie der G6Pase sind diese Zellen besonders gut für die Untersuchung insulinabhängiger metabolischer Prozesse geeignet. Aus diesem Grund wurde dieses Zellsystem in der Vergangenheit von vielen Arbeitsgruppen erfolgreich als Modell für die Untersuchung der Insulinwirkung in der Leber eingesetzt (Liao et al. 1998; Hall et al. 2000; Lochhead et al. 2000; Schmoll et al. 2000; Barthel et al. 2001).

Die hier verwendeten H4-Zellen exprimierten bereits stabil ein FOXO1a-responsives Luziferase-Reporter-Konstrukt auf Basis des G6Pase-Promotors (H4-CC-Zellen). Im Gegensatz zum üblicherweise verwendeten 1.3 kb großen

G6Pase(-1227/+57) Promotor ist der in diesen Zellen verwendete trunkierte Promotor jedoch zusätzlich zu seiner hohen Sensitivität für eine FOXO1a-Aktivierung auch noch durch eine sehr niedrige basale Aktivität gekennzeichnet. Die Insulinresponsivität der Promotorregulation beruht auf (dem Vorliegen mehrerer sogenannter insulinresponsiver Elemente (IRE; T(G/A)TTT) (Schmoll et al. 2000).

Durch Titration der Blastocidin-Konzentration zur Selektionierung der stabil das FOXO1a-ER Konstrukt exprimierenden Zellen konnte eine Zelllinie hergestellt werden, bei der die Expression des Konstruktes und damit die basale Promotor-Aktivität so niedrig ist, dass sie derjenigen Promotoraktivität in den Kontrollzellen entspricht (vgl. Abb. 11). Dies bedeutet, dass unter basalen Bedingungen eine komplette Hemmung des Konstruktes aufgrund einer vollständigen Bindung und „Maskierung“ des FOXO1a-ER-Fusionsproteins durch HSP90 besteht.

Andererseits zeigt sich nach Stimulation der Zellen mit Hydroxytamoxifen und somit Freisetzung des Konstruktes bereits nach zwei Stunden eine drei- bis fünffach gesteigerte transkriptionelle Aktivität, welche nach etwa 15 Stunden ein Maximum von ca. 100-fach gesteigerter Promotoraktivität erreicht.

Die Kombination aus niedriger basaler Aktivität und reproduzierbar hoher Aktivität nach Induktion des Konstruktes ist wesentliche Voraussetzung für die Verwendung der Zelllinie zur Untersuchung FOXO1a-abhängig regulierter Stoffwechselprozesse. Der schnelle Anstieg der transkriptionellen Aktivität des FOXO1a-ER-Konstruktes nach Stimulation mit Hydroxytamoxifen in den H4-Zellen minimiert dabei das Risiko von zellulären Kompensationsmechanismen und sekundären, unspezifischen Effekten durch längeres Einwirken von Hydroxytamoxifen. Deshalb eignet sich die hier hergestellte H4-FOXO1a-ER-CC-Zelllinie besonders gut zu diesem Zweck.

Insbesondere aufgrund der einfachen und komfortablen Möglichkeit, die transkriptionelle Aktivität des FOXO1a-ER-Konstruktes durch Bestimmung der Luziferase-Aktivität zu kontrollieren, liegt eine ausgezeichnete Möglichkeit der Funktions- und Qualitätskontrolle für diese Zelllinie vor.

4.2 Die Glucose-6-Phosphatase

Die Glucose-6-Phosphatase ist das zentrale insulinabhängig regulierte Enzym der hepatischen Glucoseproduktion. Eine Fehlregulation dieses Stoffwechselvorganges ist ein wesentlicher Faktor der Hyperglykämie beim Typ-2-Diabetes. Insulin hemmt unter physiologischen Bedingungen die Glucoseproduktion der Leber unter anderem über eine Hemmung der Expression des G6Pase-Gens. Aufgrund der Insulinresistenz besteht beim Typ-2-Diabetes eine erhöhte hepatische Glucoseproduktion, die sich insbesondere in der Nüchternhyperglykämie äußert. Im Verlauf der vergangenen Jahre wurde deshalb die Regulation der G6Pase-Genexpression auf molekularer Ebene genauer charakterisiert. So hat sich gezeigt, dass insbesondere die Aktivierung der MAP-Kinase und der PI-3-Kinase und ihrer nachgeschalteten Signalkaskaden (Patel et al. 2001; Schmoll et al. 2001) bei diesem Prozess eine wesentliche Rolle spielen. Bei der Regulation über den PI-3-Kinase-Weg handelt es sich vorwiegend um eine insulinvermittelte Wirkung durch Hemmung des Transkriptionsfaktors FOXO1a, welche auf einer PKB-abhängigen Phosphorylierung von FOXO1a beruht (Ayala et al. 1999; Schmoll et al. 2000; Barthel et al. 2001; Nakae et al. 2001; O'Brien R et al. 2001). Da ein genaueres Verständnis dieser Mechanismen Angriffspunkte für die Entwicklung neuartiger medikamentöser Therapiemöglichkeiten bietet und auch zum besseren Verständnis der Wirkmechanismen bereits in der Klinik etablierter Antidiabetika beitragen kann, wurde in der vorliegenden Arbeit die Regulation der Expression des G6Pase-Gens durch FOXO1a und Insulin untersucht.

Die Aktivierung des FOXO1a-ER-Konstruktes in H4-Zellen vermittelt eine etwa zwei- bis dreifache Zunahme der G6Pase-mRNA Menge. Dies spiegelt sich auch auf der Ebene der G6Pase-Enzymaktivität in vergleichbarem Ausmaß wider. Die oben beschriebene wesentlich höhere stimulierte Aktivität des künstlichen G6Pase-Promotor und somit bei der Expression des Reportergens reflektiert die weitgehende Reduktion des Promotorkonstruktes auf die FOXO1a-bindenden Insulin-responsiven Elemente unter Eliminierung anderer regulatorischer Strukturen, wodurch die Trennschärfe gegenüber einer Verwendung des

Wildtyppromotors deutlich gesteigert wird. Weiterhin wird die Quantifizierbarkeit biologischer Effekte möglicherweise durch eine höhere Stabilität des Reportergenproduktes gegenüber dem physiologischerweise regulierten Protein – in diesem Fall G6Pase - begünstigt.

Darüber hinaus können mit dieser Zelllinie auch insulinabhängig regulierte Prozesse auf der Basis der Promotoraktivität untersucht werden. Eine hier gezeigte, etwa 70%ige Suppression der Promotoraktivität nach Behandlung der Zellen mit 10^{-9} M Insulin gegenüber mit Hydroxytamoxifen stimulierten Zellen verdeutlicht die weitgehend physiologische Regulierbarkeit des Konstruktes. Die Tatsache dass Insulin (in submaximalen Konzentrationen) nach Aktivierung von FOXO1a-ER nicht in der Lage war, die Expression von G6Pase mRNA vollständig zu hemmen, ist möglicherweise durch Sättigung von Mechanismen zur Inaktivierung von FOXO1a bedingt. In diesem Zusammenhang könnte einer der limitierenden Faktoren die Interaktion zwischen FOXO1a und 14-3-3-Proteinen sein, welche am Transport von FOXO1a aus dem Zellkern und der Retention dieses Transkriptionsfaktors im Zytosol beteiligt ist (Brunet et al. 1999; Rena et al. 2001; Brunet et al. 2002; Barthel et al., 2005).

Mit den in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Eigenschaften besitzt die H4-FOXO1a-ER-CC-Zelllinie prinzipiell das Potenzial zum high-throughput-Screening zur Identifizierung insulinartig über FOXO1a wirkender Substanzen. Da FOXO1a-vermittelte biologische Effekte nicht nur eine wichtige Rolle in der Regulation metabolischer Prozesse des Insulins spielen, sondern weil sich mittlerweile gezeigt hat, dass FOXO1a auch eine wichtige Funktion bei der Regulation des Zellzyklus sowie der Apoptose spielt, könnte das hier beschriebene H4-FOXO1a-ER-CC-Zellsystem auch zum Screening nach Substanzen eingesetzt werden, die neben einer Relevanz für die Therapie des Diabetes mellitus auch Relevanz in der Behandlung maligner Erkrankungen haben.

Bei zusätzlich zur Stimulation mit Hydroxytamoxifen synergistisch mit Dexamethason/cAMP vorbehandelten Zellen ist der Insulineffekt fast vollständig aufgehoben, was das diabetogene Potenzial von FOXO1a mit einer weitgehenden Insulinresistenz verdeutlicht.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass FOXO1a ein wesentlicher insulinabhängiger Faktor zur Regulation der endogenen G6Pase und damit der hepatischen Glucoseproduktion ist. Dies ist deshalb von möglicher Bedeutung, weil die Mechanismen, die an der Regulation dieses Enzyms beteiligt sind, auch unmittelbaren Einfluss auf die beim Typ-2-Diabetes gesteigerte hepatische Glucoseproduktion ausüben, die ja vor allem für die Nüchternhyperglykämie verantwortlich ist. Eine Hemmung von FOXO1a in der Leber bei Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 könnte somit therapeutisch zur Verbesserung der Stoffwechseleinstellung genutzt werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Antidiabetikum Metformin, ähnlich wie Insulin die Expression der G6Pase in Leberzellen hemmt und auf diese Weise die hepatische Glukoseproduktion hemmen kann (Mues et al., 2009). Weil Metformin die AMP-Kinase aktiviert und weiterhin beschrieben wurde, dass eine Aktivierung der AMPK die transkriptionelle Aktivität von FOXO1a hemmt (Barthel et al. 2002), ist es denkbar, dass FOXO1a auch eine Rolle bei der Vermittlung der Metforminwirkung auf die hepatische Glukoseproduktion spielt.

Eine Hemmung der G6Pase als therapeutisches Prinzip zur Behandlung des Typ-2-Diabetes ist sicher ein äußerst vielversprechender Ansatz, es muss in diesem Zusammenhang jedoch bedacht werden, dass eine vollständige Hemmung dieses Enzyms zum Phänotyp einer Glykogenspeicherkrankheit Typ Ia (hepatorenale Glykogenose von Gierke) mit übermäßiger Glykogenspeicherung insbesondere in der Leber, konsekutiven gravierenden strukturellen Veränderungen der Leber sowie schweren Hypoglykämien führen kann. Dies sind ebenfalls wesentliche Punkte, die bei der Entwicklung von neuartigen Medikamenten, die die hepatische Glucoseproduktion hemmen, bedacht werden müssen.

5 Zusammenfassung

Zur Charakterisierung FOXO1a-vermittelter biologischer Funktionen wurde ein durch 4-Hydroxytamoxifen induzierbares Konstrukt des insulinregulierten Transkriptionsfaktors FOXO1a hergestellt. Dazu wurde die hormonbindende Domäne des Estrogen-Rezeptors (ER) mit dem C-terminalen Anteil des Transkriptionsfaktors FOXO1 fusioniert (FOXO1a-ER).

Es wurde zunächst mit Hilfe eines Reportergen-Assays auf der Basis des G6Pase-Promotors die Funktion des Konstruktes in transient transfizierten HEP-G2-Zellen charakterisiert. 4-Hydroxytamoxifen bewirkte dabei eine signifikante Induktion der Promotoraktivität, wohingegen in unbehandelten Kontrollzellen kein Effekt gesehen wurde.

Daraufhin wurde das Konstrukt unter Verwendung eines retroviralen Transfektionssystems stabil in das Genom einer H4-Rattenhepatom-Zelllinie integriert, welche zusätzlich ein Reportergen-System auf der Basis des G6Pase-Promotors exprimiert. Hier konnte bereits zwei Stunden nach Stimulierung der Zellen mit 4-Hydroxytamoxifen ein Anstieg der Promotoraktivität um das drei- bis fünffache nachgewiesen werden, das Maximum wurde nach etwa 15 Stunden Stimulation erreicht (ca. hundertfache Induktion). Ein halbmaximaler Effekt zeigte sich bei 0,5µM Hydroxytamoxifen. Durch Behandlung der Zellen mit 1nM Insulin konnte die Hydroxytamoxifen-induzierte Promotoraktivität um ca. 70% der maximalen Wirkung reduziert werden. Weiterhin konnte in dieser Zelllinie die Transaktivierung des G6Pase-Gens durch FOXO1a-ER auf mRNA- und Enzym-Ebene gezeigt werden. Nach Stimulation der G6Pase-Aktivität mittels Dexamethason/cAMP und Aktivierung des FOXO-1a-Konstruktes konnte auf mRNA-Ebene eine funktionelle Insulinresistenz im Zellsystem nachgewiesen werden, was den möglichen prodiabetogenen Effekt von FOXO1a verdeutlicht.

Die hier hergestellte H4-Zelllinie eignet sich prinzipiell zur Identifizierung weiterer FOXO-1a-abhängig exprimierter Gene, sowie als Instrument zur Identifizierung von Substanzen, welche die FOXO1a-Aktivität und ihre insulinabhängige Regulation beeinflussen.

6 Literaturverzeichnis

- Alessi, D. R. and Cohen, P. (1998). "Mechanism of activation and function of protein kinase B." Curr Opin Genet Dev **8**(1): 55-62.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. and Cohen, P. (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph." Curr Biol **7**(4): 261-9.
- Arden, K. C. and Biggs, W. H., 3rd (2002). "Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling." Arch Biochem Biophys **403**(2): 292-8.
- Ayala, J. E., Streeper, R. S., Desgrosellier, J. S., Durham, S. K., Suwanichkul, A., Svitek, C. A., Goldman, J. K., Barr, F. G., Powell, D. R. and O'Brien, R. M. (1999). "Conservation of an insulin response unit between mouse and human glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoters: transcription factor FKHR binds the insulin response sequence." Diabetes **48**(9): 1885-9.
- Barthel, A., Schmoll, D., Kruger, K. D., Bahrenberg, G., Walther, R., Roth, R. A. and Joost, H. G. (2001). "Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells." Biochem Biophys Res Commun **285**(4): 897-902.
- Barthel, A., Schmoll, D., Kruger, K. D., Roth, R. A. and Joost, H. G. (2002). "Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase." Endocrinology **143**(8):3183-6.
- Barthel, A., Schmoll, D., Unterman, T. G. (2005). "FoxO proteins in insulin action and metabolism." Trends Endocrinol Metab **16**(4):183-9.
- Biggs, W. H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W. K. and Arden, K. C. (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): 7421-6.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-68.
- Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J. V., Dalal, S. N., DeCaprio, J. A., Greenberg, M. E. and Yaffe, M. B. (2002). "14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport." J Cell Biol **156**(5): 817-28.
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A. and Greenberg, M. E. (2001). "Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a)." Mol Cell Biol **21**(3): 952-65.
- Carter, J. S., Pugh, J. A. and Monterrosa, A. (1996). "Non-insulin-dependent

- diabetes mellitus in minorities in the United States." Ann Intern Med **125**(3): 221-32.
- Currie, R. A., Walker, K. S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C. P., Cohen, P., Alessi, D. R. and Lucocq, J. (1999). "Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1." Biochem J **337** (Pt 3): 575-83.
- Dijkers, P. F., Medema, R. H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N. S., Lam, E. W., Burgering, B. M., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L. and Coffey, P. J. (2000). "Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1)." Mol Cell Biol **20**(24): 9138-48.
- Durham, S. K., Suwanichkul, A., Scheimann, A. O., Yee, D., Jackson, J. G., Barr, F. G., Powell, D. R. (1999). „FKHR binds the insulin response element in the insulin-like growth factor binding protein-1 promoter.“ Endocrinology **40**(7): 3140-6
- Dong, L., Liu, F. (2005). „PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle.“ Am J Physiol Endocrinol Metab **289**(2): 187-96.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. and Bujard, H. (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." Science **268**(5218): 1766-9.
- Guo, S., Rena, G., Cichy, S., He, X., Cohen, P. and Unterman, T. (1999). "Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence." J Biol Chem **274**(24): 17184-92.
- Gutteridge, I. F. (1999). "Diabetes mellitus: a brief history, epidemiology, definition and classification." Clin Exp Optom **82**(2-3): 102-106.
- Hall, R. K., Yamasaki, T., Kucera, T., Waltner-Law, M., O'Brien, R. and Granner, D. K. (2000). "Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins." J Biol Chem **275**(39): 30169-75.
- Hers, H. G. (1964). "Glycogen Storage Disease." Adv Metab Disord **13**: 1-44.
- Holmes, D. S. and Quigley, M. (1981). "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids." Anal Biochem **114**(1): 193-7.
- Hosaka, T., Biggs, W. H., 3rd, Tieu, D., Boyer, A. D., Varki, N. M., Cavenee, W. K. and Arden, K. C. (2004). "Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2975-80.
- Jansen-Durr, P., Meichle, A., Steiner, P., Pagano, M., Finke, K., Botz, J., Wessbecher, J., Draetta, G. and Eilers, M. (1993). "Differential modulation of cyclin gene expression by MYC." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3685-9.
- Kapellen, T. M., Galler, A., Bottner, A. and Kiess, W. (2004). "Epidemiologie, Behandlungsstrategie und Prävention von Typ 2-Diabetes bei Kindern und

- Jugendlichen." Dtsch Med Wochenschr **129**(27): 1519-23.
- King, H., Aubert, R. E. and Herman, W. H. (1998). "Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections." Diabetes Care **21**(9): 1414-31.
- Kohn, A. D., Barthel, A., Kovacina, K. S., Boge, A., Wallach, B., Summers, S. A., Birnbaum, M. J., Scott, P. H., Lawrence, J. C., Jr. and Roth, R. A. (1998). "Construction and characterization of a conditionally active version of the serine/threonine kinase Akt." J Biol Chem **273**(19): 11937-43.
- Kops, G. J., Medema, R. H., Glassford, J., Essers, M. A., Dijkers, P. F., Coffey, P. J., Lam, E. W. and Burgering, B. M. (2002). "Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors." Mol Cell Biol **22**(7): 2025-36.
- Lawlor, M. A. and Alessi, D. R. (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" J Cell Sci **114**(Pt 16): 2903-10.
- Lazar, M. A. (2005). "How obesity causes diabetes: not a tall tale." Science **307**(5708): 373-5.
- Liao, J., Barthel, A., Nakatani, K. and Roth, R. A. (1998). "Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene." J Biol Chem **273**(42): 27320-4.
- Lochhead, P. A., Salt, I. P., Walker, K. S., Hardie, D. G., Sutherland, C. (2000). "5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase." Diabetes **49**(6):896-903.
- Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G. and Evan, G. I. (1995). "A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins." Nucleic Acids Res **23**(10): 1686-90.
- Mues, C., Zhou, J., Manolopoulos, K. N., Korsten, P., Schmoll, D., Klotz, L.-O., Bornstein, S. R., Klein, H. H., Barthel, A. (2009). "Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by insulin and metformin." Horm Metab Res **41**(10):730-5.
- Nakae, J., Biggs, W. H., 3rd, Kitamura, T., Cavenee, W. K., Wright, C. V., Arden, K. C. and 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): 245-53.
- Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D. L. and Accili, D. (2001). "The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression." J Clin Invest **108**(9): 1359-67.
- O'Brien R, M., Streeper, R. S., Ayala, J. E., Stadelmaier, B. T. and Hornbuckle, L. A. (2001). "Insulin-regulated gene expression." Biochem Soc Trans **29**(Pt 4): 552-8.
- Patel, S., Lochhead, P. A., Rena, G. and Sutherland, C. (2001). "Antagonistic effects of phorbol esters on insulin regulation of insulin-like growth factor-

- binding protein-1 (IGFBP-1) but not glucose-6-phosphatase gene expression." Biochem J **359**(Pt 3): 611-9.
- Rena, G., Prescott, A. R., Guo, S., Cohen, P. and Unterman, T. G. (2001). "Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting." Biochem J **354**(Pt 3): 605-12.
- Rena, G., Woods, Y. L., Prescott, A. R., Pegg, M., Unterman, T. G., Williams, M. R. and Cohen, P. (2002). "Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion." Embo J **21**(9): 2263-71.
- Rosenbloom, A. L., Joe, J. R., Young, R. S. and Winter, W. E. (1999). "Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth." Diabetes Care **22**(2): 345-54.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977." Biotechnology **24**: 104-8.
- Schmoll, D., Grempler, R., Barthel, A., Joost, H. G. and Walther, R. (2001). "Phorbol ester-induced activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal-regulated kinase kinase and extracellular-signal-regulated protein kinase decreases glucose-6-phosphatase gene expression." Biochem J **357**(Pt 3): 867-73.
- Schmoll, D., Walker, K. S., Alessi, D. R., Grempler, R., Burchell, A., Guo, S., Walther, R. and Unterman, T. G. (2000). "Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B α and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity." J Biol Chem **275**(46): 36324-33.
- Schmoll, D., Wasner, C., Hinds, C. J., Allan, B. B., Walther, R. and Burchell, A. (1999). "Identification of a cAMP response element within the glucose-6-phosphatase hydrolytic subunit gene promoter which is involved in the transcriptional regulation by cAMP and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells." Biochem J **338** (Pt 2): 457-63.
- Sublett, J. E., Jeon, I. S. and Shapiro, D. N. (1995). "The alveolar rhabdomyosarcoma PAX3/FKHR fusion protein is a transcriptional activator." Oncogene **11**(3): 545-52.
- von Groote-Bidingmaier, F., Schmoll, D., Orth, H. M., Joost, H. G., Becker, W. and Barthel, A. (2003). "DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a)-dependent glucose-6-phosphatase gene expression." Biochem Biophys Res Commun **300**(3): 764-9.
- Woods, Y. L. and Rena, G. (2002). "Effect of multiple phosphorylation events on the transcription factors FKHR, FKHL1 and AFX." Biochem Soc Trans **30**(4): 391-7.
- Woods, Y. L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S., Unterman, T. G. and Cohen, P. (2001). "The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site." Biochem J **355**(Pt 3): 597-607.
- Zhang, L. and Wang, C. (2003). "PAX3-FKHR transformation increases 26 S proteasome-dependent degradation of p27Kip1, a potential role for elevated

Skp2 expression." J Biol Chem **278**(1): 27-36.

Zhang, X., Gan, L., Pan, H., Guo, S., He, X., Olson, S. T., Mesecar, A., Adam, S. and Unterman, T. G. (2002). "Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding." J Biol Chem **277**(47): 45276-84.

Zheng, W. H., Kar, S. and Quirion, R. (2000). "Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells." J Biol Chem **275**(50): 39152-8.

7 Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden zuvor publiziert in:

Barthel, A., Orth, H. M., Kruger, K. D., Schmoll, D. and Joost, H. G. (2002).

"Construction and characterization of a conditionally active construct of the insulin-regulated forkhead transcription factor FKHR." Exp Clin Endocrinol Diabetes **110**(6): 304-9.

Orth, H. M., Kruger, K. D., Schmoll, D., Grempler, R., Scherbaum, W. A., Joost, H. G., Bornstein, S. R. and Barthel, A. (2004). "Cellular models for the analysis of signaling by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR (Foxo1a)." Regul Pept **121**(1-3): 19-24.

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans-Georg Joost danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Bereitstellung der exzellenten Arbeitsbedingungen im Labor, sowie für die beispielhafte Unterstützung über mehrere Jahre hinweg.

Herrn PD Dr. Andreas Barthel danke ich für die intensive Betreuung und die langjährige Bereitschaft, Hilfestellung und Motivation zu geben. Ich danke ihm außerdem für die Durchsicht und Korrektur des Manuskripts und für viele Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Walter Becker danke ich für die Übernahme der Gutachtertätigkeit und Hilfestellung in administrativen Fragen.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Karges danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitz.

Herrn PD Dr. Dieter Schmoll danke ich für die Bereitstellung der verwendeten Zelllinie.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit, insbesondere Herrn Florian von Groote-Bidlingmaier und Herrn Klaus-Dieter Krüger, sowie Frau Katharina Linnartz.

Nicht zuletzt gilt mein größter Dank meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung und Geduld, sowie ihr Vertrauen.

9 Erklärung zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei mir, Hans Martin Orth, Chlodwigstr. 83, 40225 Düsseldorf hinterlegt sind.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hans Martin Orth
Geburtsdatum: 09.09.1976
Geburtsort: Wesel
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schule

Aug. 1982 – Juli 1986 Gemeinschafts-Grundschule Ringenberg
Sept. 1986 – Juni 1995 Konrad-Duden-Gymnasium Wesel

Zivildienst

Juli 1995 – Juli 1996 Marienhospital Wesel

Studium

Okt. 1996 – Dez. 2003 Medizinstudium an der RWTH Aachen, der Real Academia de Medicina in Granada (Spanien) und der University of the West Indies in Port-of Spain (Trinidad und Tobago)
April – Juni 2004 Diplomkurs Tropenmedizin am Bernhard-Nocht-Institut Hamburg

Berufserfahrung

Juli 2004 – Dez. 2005 I. Medizinische Klinik (Kardiologie und Pulmologie) am Universitätsklinikum Aachen
Jan. 2006 – Juni 2007 Medizinische Klinik des St.-Antonius-Hospital Eschweiler
Juli 2007 – Dez. 2011 Medizinische Klinik des Luisenhospital Aachen
Seit Juni 2012 Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf
September 2010 Facharztprüfung Innere Medizin