

Die Rolle von FOXO1 im Glukokortikoid-induzierten Betazelltod und dessen Regulation durch die Kinasen AKT und SGK1

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Gabriele Kaiser, geb. Schulz-Raffelt
aus Düsseldorf

Tübingen
2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

03.04.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Susanne Ullrich

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gisela Drews

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Prof. Dr. Susanne Ullrich. Ich habe eine sehr gute und lehrreiche Betreuung erfahren dürfen und danke insbesondere auch für die vielen Möglichkeiten an Kongressen teilzunehmen und speziell die großartige Chance einen Forschungsaufenthalt in Genf und Dundee erleben zu dürfen. Ebenso bedanke ich mich für ihre motivierende Art und Begeisterungsfähigkeit, die zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. H.-U. Häring danke ich für die Möglichkeit an der Uniklinik Tübingen zu arbeiten und seine freundliche Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Gisela Drews danke ich sehr für die Möglichkeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen zu promovieren. Insbesondere danke ich auch für die Begutachtung meiner Arbeit und den unkomplizierten freundlichen Umgang.

Desweiteren danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für die sehr angenehme Atmosphäre und große Hilfsbereitschaft, die den Alltag sehr positiv gestaltet haben.

Meiner Schwester Miriam gilt ein extra großer und herzlicher Dank für die ständige Bereitschaft zur produktiven Diskussion und ihren großen unterstützenden Motivationstalent!

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen eingegangen:

PAPER:

G.Kaiser, F. Gerst, D. Michael, S. Berchtold, B. Friedrich, N. Strutz-Seebohm, F. Lang, H.-U. Häring, S. Ullrich
Regulation of forkhead box O1 (FOXO1) by protein kinase B and glucocorticoids: different mechanisms of induction of beta cell death in vitro.
Diabetologia 56, 1587-95 (2013)

POSTER:

G. Schulz-Raffelt, F. Ranta, F. Lang, H.-U. Häring, S. Ullrich
Apoptotic beta cell death independent of activation of transcription factor FOXO1: effects of glucocorticoids and the role of PKB/AKT isoforms
Diabetologia, September 2011, Volume 54, Issue 1 Supplement, pp 1-542 ; EASD 2011, Lissabon

G. Schulz-Raffelt, D. Michael, S. Berchtold, F. Ranta, H.-U. Häring, S. Ullrich
Regulation des Transkriptionsfaktors FOXO1 durch AKT1, AKT2 und SGK1 in insulinsezernierenden Zellen.
Diabetologie und Stoffwechsel, Juni 2011, P192, DDG 2011, Leipzig

G. Schulz-Raffelt, S. Berchtold, D. Michael, F. Ranta, H.-U. Häring and S. Ullrich
The role of serum glucocorticoid inducible kinase 1 (SGK1) in insulin secreting cells
XI International Symposium on Insulin Receptors and Insulin Action, Naples, Italy, 2010

G. Schulz-Raffelt, S. Berchtold, D. Michael, F. Ranta, H.-U. Häring, S. Ullrich
Increased phosphorylation of FOXO1 during glucocorticoid excess is not mediated by SGK1 in insulin secreting cells.
EASD Stockholm 2010

VORTRAG:

Gabriele Schulz-Raffelt
Apoptotic cell death independent of FoxO1 activation in insulin secreting cells: Effects of glucocorticoids and the role of AKT isoforms.
DZD Satellite Workshop Meeting, März 2012, Tübingen

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	5
2.1. Glukose, Insulin und Diabetes mellitus	5
2.1.1. Blutglukosehomöostase	5
2.1.2. Diabetes mellitus und die Rolle der Betazell dysfunction	6
2.1.3. Metabolische Wirkung von Insulin	8
2.2. Pankreas und Langerhans'sche Inselzellen	8
2.2.1. Insulinsekretion und dessen Regulation	9
2.3. Insulin Signaltransduktion	12
2.3.1. Insulin Signalweg	12
2.3.2. AKT	14
2.3.3. SGK1	16
2.3.4. Forkhead box Transkriptionsfaktoren der Klasse O	20
2.3.5. FOXO1 in der pankreatischen Betazelle	27
2.4. Apoptose und Betazelluntergang im T2DM	28
2.5. Glukokortikoide	30
2.5.1. Die Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors	32
3. ZIELSTELLUNG	33
4. MATERIAL UND METHODEN	34
4.1. Material	34
4.1.1. Geräteliste	34
4.1.2. Organismen	34
4.1.3. Chemikalien und Substanzen	35
4.1.4. Kommerzielle Kits	36
4.1.5. siRNA	37
4.1.6. Plasmide	37
4.1.7. Primersequenzen	38
4.1.8. Antikörper	40
4.1.9. Lösungen, Puffer und Medien	41
4.2. Methoden	43
4.2.1. Arbeiten mit Zellen und zellbiologische Methoden	43
4.2.1.1. Zellkultur im Allgemeinen	43
4.2.1.2. Behandlung der Zellen	44
4.2.1.3. Messung der Glukose-induzierten Insulinsekretion	45
4.2.1.4. Transfektion von INS-1E Zellen	45

4.2.1.5. Beschichtung von Glasplättchen mit Poly-L-Ornithin	48
4.2.1.6. Immunfluoreszenzfärbung	49
4.2.1.7. TUNEL-Assay	50
4.2.2. Molekularbiologische Methoden	51
4.2.2.1. Transformation von Plasmiden in Bakterien und Präparation der Plasmid-DNA	51
4.2.2.2. Agarose Gelelektrophorese	52
4.2.2.3. RNA-Isolation	52
4.2.2.4. Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	52
4.2.2.5. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	53
4.2.2.6. Primerdesign	53
4.2.2.7. Quantitative real time (RT) PCR	54
4.2.3. Biochemische Methoden	56
4.2.3.1. Lyse von Zellen	56
4.2.3.2. Trennung von nukleärer und zytosolischer Fraktion	56
4.2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford Assay)	57
4.2.3.4. SDS-Gele	57
4.2.3.5. Westerntransfer und immunologischer Proteinnachweis	58
4.2.4. Arbeiten mit Mäusen	59
4.2.4.1. Präparation von Langerhans'schen Inseln	59
4.2.5. Statistische Auswertung	62
5. ERGEBNISSE	63
5.1. Molekulare Effekte des Glukokortikoid-Analoga Dexamethason in INS-1E Zellen	63
5.1.1. Dexamethason reduziert die Aktivität von AKT ohne die Phosphorylierung von FOXO1 zu erniedrigen	63
5.1.2. Dexamethason stimuliert die Transkription von FoxO-Isoformen Glukokortikoidrezeptor-abhängig	65
5.1.3. Die Transkription von Sgk1, nicht aber der Akt-Isoformen, wird durch Dexamethason Glukokortikoidrezeptor-abhängig stimuliert	66
5.2. Die Regulation von FOXO1 in Glukokortikoid-exponierten INS-1E Zellen	69
5.2.1. FOXO1 wird nicht von SGK1 phosphoryliert	69
5.2.1.1. Transfektion von INS-1E Zellen mit spezifischer siRNA gegen <i>Sgk1</i>	69
5.2.1.2. Transfektion von INS-1E Zellen mit konstitutiv aktiver oder Kinase-inaktiver SGK1	70
5.2.1.3. Effekte des Zellkulturmediums auf die zellulären Lokalisation von FOXO1 in INS-1E Zellen	71
5.2.1.4. Behandlung der Zellen mit dem spezifischen SGK1- Inhibitor GSK650394	73
5.2.2. Rolle der upstream Kinasen AKT und ERK in der Regulation von FOXO1 unter Gabe von Dexamethason	76
5.2.2.1. Behandlung der Zellen mit dem MEK1-Inhibitor PD98059	76
5.2.2.2. Behandlung der Zellen mit dem AKT-Inhibitor Akti-1/2	77
5.2.2.3. Analyse der zellulären Verteilung von FOXO1 durch Fraktionierung von Zytosol und Kernen	81
5.2.3. Phosphorylierung und zelluläre Lokalisation von FOXO1 ist abhängig von AKT1, AKT2 und AKT3	83
5.2.3.1. Herunterregulation einzelner Akt-Isoformen	83
5.2.3.2. Parallele Hemmung der Expression zweier Isoformen von AKT	86
5.2.3.3. Parallele Herunterregulation der drei Akt-Isoformen 1, 2 und 3	87
5.2.4. Rolle von SGK3 und AKT2 auf die Regulation von FOXO1 bei Dexamethason-Exposition	89

5.3. Funktion von FOXO1 in der Dexamethason-induzierten Apoptose in INS-1E Zellen	91
5.3.1. Dexamethason-induzierte Apoptose in INS-1E Zellen mit verringertem FOXO1-Gehalt	91
5.3.2. Expression von FOXO1-Targetgenen in INS-1E Zellen mit verringertem FOXO1-Gehalt unter Behandlung mit Dexamethason	94
5.4. Beobachtungen in murinen Inselzellen unter Behandlung mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason	96
5.4.1. Transkription von FoxO-Isoformen und deren Targetgenen	96
5.4.2. FOXO1 bleibt in murinen Inselzellen in Anwesenheit von Dexamethason zytosolisch lokalisiert	97
6. DISKUSSION	99
6.1. Möglichkeiten des verwendeten Modellsystems	99
6.2. Die Initiation der Glukokortikoid-induzierten Apoptose ist unabhängig von FOXO1	101
6.3. Alle drei AKT-Isoformen sind für die Regulation von FOXO1 verantwortlich	104
6.4. FOXO1 wird nicht von SGK1 phosphoryliert	106
6.5. SGK3 und AKT2	109
6.6. ERK-1/2 ist nicht in die Glukokortikoid-abhängige starke Phosphorylierung von FOXO1 involviert	111
6.7. Weitere mögliche Mechanismen der Dexa-vermittelten Effekte	113
6.7.1. STAT3	113
6.7.2. Phosphatasen	114
6.7.3. GILZ	115
6.8. Glukokortikoide sensibilisieren Betazellen für zytotoxische Effekte, die eine FOXO1-Aktivierung verursachen	115
6.9. Schlussfolgerung	117
REFERENZEN	118
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	138

Abkürzungsverzeichnis

SI Standardeinheiten werden nicht aufgezählt

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Akti	pan-AKT-Inhibitor Akti-1/2
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APS	Ammonium Persulphat
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
C-terminal	carboxyterminal
Ctr	Kontrolle
Dexa	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FFA	freie Fettsäure
FITC	Fluorescein isothiocyante
<i>frw</i>	<i>forward</i>
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
Gi	inhibitorische Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
GK	Glukokortikoid
GK-R	Glukokortikoid-Rezeptor
GLP-1	<i>Glucagon-like-peptide-1</i>
GLUT	Glukosetransporter
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Gq	PLC aktivierende Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
GRE	<i>Glucocorticoid response element</i>
GS	Glykogensynthase
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HRS	Meerrettichperoxidase
HWZ	Halbwertszeit
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IGF-1	<i>Insulin like growth factor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
Il	Interleukin
IRE	<i>insulin response element</i>
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
KO	<i>Knockout</i>
KRB	Krebs-Ringer-Puffer

MEK-1	<i>ERK activator kinase 1</i>
miRNA	micro RNA
N	beliebige Base
NES	Kernexportmotiv
NLS	Kernlokalisationsignal
N-terminal	aminoterminal
OT	Objektträger
P-	Phospho-
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PH-	<i>Pleckstrin homology</i>
PLC	Phospholipase C
PTM	posttranskriptionelle Modifikation
qRT-PCR	quantitative Realtime PCR
RAU	<i>relative arbitrary Unit</i>
<i>rev</i>	<i>reward</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SGKi	SGK1-Inhibitor GSK650394
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SYBR-Green	$C_{32}H_{37}N_4S^+$
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
Thr	Threonin
TOPRO3	TO-PRO®-3 Iodide
TRITC	Tetramethylrhodamin-5-(und 6)-Isothiocyanat/Rhodamin
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
WB	Westernblot
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Steroiddiabetes ist eine häufige Nebenwirkung der Langzeitbehandlung mit hohen Dosen von Glukokortikoiden. Die Betazelle ist hierbei nicht in der Lage die erhöhte hepatische Glukoneogenese und periphere Insulinresistenz durch eine ausreichende Insulinsekretion zu kompensieren. Publierte Studien zeigen, dass eine Aktivierung des pro-apoptischen Transkriptionsfaktors (TF) *forkhead box O1* (FOXO1) einen wesentlichen Faktor des Glukokortikoid-induzierten Betazelltodes darstellt. FOXO1 wird durch posttranskriptionelle Modifikation, wie u.a. Phosphorylierung reguliert. Stimulation des IGF-1 Insulin-PI3K-Signalweges führt zu einer AKT-vermittelten Phosphorylierung von FOXO1 an Thr24, Ser256 und Ser319, was den Ausschluss des TFs aus dem Zellkern und somit dessen Inaktivierung bewirkt. In früheren Untersuchungen konnte eine massive Induktion der SGK1 (*serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1*) durch das synthetische Glukokortikoid (GK) Dexamethason (Dexa) in Betazellen festgestellt werden. SGK1 weist eine hohe Homologie (54%) in der katalytischen Domäne zu AKT-Kinasen auf. Wie AKT wird SGK1 über den PI3K-Signalweg aktiviert und wirkt in der Zelle anti-apoptisch und proliferativ. Frühere Experimente zeigten, dass Dexa in INS-1E Zellen bei gleichzeitiger Erniedrigung der Phosphorylierung von AKT, Apoptose auslöst. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass Dexa die Gesamtmenge an FOXO1-Protein erhöht, welches trotz erniedrigter AKT-Aktivität und erhöhter Apoptose im phosphorylierten Zustand im Zytosol vorlag. Die Rolle und Regulation von FOXO1 im GK-induzierten Betazelltod sollte nun in dieser Arbeit untersucht werden. Als erstes wurden die Effekte von Dexa auf FOXO1 in INS-1E Zellen analysiert. Die erhöhten FOXO1 Gesamtproteinmengen spiegelten sich auch in einer signifikant erhöhten Transkription wieder. Gleichzeitig war auch die mRNA der Isoformen *FoxO3* und *4* erhöht. Dieser Effekt konnte durch den GK-Rezeptor-Inhibitor RU486 aufgehoben werden. Die Phosphorylierung und damit auch die zytosolische Lokalisation von FOXO1 wurde durch Dexa nicht verändert, was mittels immunfluoreszenter Anfärbung sichtbar gemacht wurde. Ergänzend zeigte eine subzelluläre Fraktionierung, dass Dexa nicht nur einen Anstieg des FOXO1-Proteins im Zytosol, sondern auch im Zellkern vermittelt. Die Phosphorylierung und zelluläre Verteilung von FOXO1 wurde durch eine Reduzierung der SGK1-Produktion mittels siRNA oder einer Hemmung der SGK1-Aktivität durch den spezifischen Inhibitor GSK650394 nicht verändert. Auch die Transfektion mit einer Kinaseinaktiven oder konstitutiv aktiven SGK1 veränderte nicht die FOXO1-Phosphorylierung. Eine

Beteiligung der ERK1/2-Kinase an der FOXO1-Phosphorylierung konnte nach Einsatz des MEK-1-Inhibitors PD98059 auch ausgeschlossen werden. In einer publizierten Studie wurde in einer SGK3-AKT2 Doppelknockoutmaus eine verschlechterte Betazellfunktion festgestellt, welche möglicherweise auf eine veränderte FOXO1-Regulation in der Betazelle hinweisen könnte. Eine parallele Herunterregulation der SGK3 und AKT2 mittels siRNA führte allerdings auch zu keiner veränderten FOXO1-Phosphorylierung und zellulären Verteilung. Der pan-AKT-Inhibitor Akti-1/2 hingegen löste signifikant die Dephosphorylierung und nukleäre Akkumulation des TFs aus. Ob dies ein AKT-Isoform spezifischer Effekt ist, wurde im Weiteren untersucht. Die Reduktion einer einzelnen, sowie die parallele Reduzierung zweier AKT-Isoformen veränderte allerdings nicht die Phosphorylierung von FOXO1 und dessen zelluläre Verteilung. Erst der Knockdown aller drei Isoformen zeigte eine Dephosphorylierung von FOXO1 und führte zu dessen Akkumulation im Zellkern. Alle drei Isoformen scheinen somit für die Regulation von FOXO1 verantwortlich zu sein. Im nächsten Schritt wurde die Funktion von FOXO1 in der GK-vermittelten Apoptose untersucht. Tatsächlich konnte nach Dexa-Behandlung eine Induktion gespaltener Caspase3 in den Zellen, in denen FOXO1 überwiegend zytosolisch lokalisiert war, mittels immunfluoreszenter Anfärbung sichtbar gemacht werden. Weiter hatte unerwarteterweise eine Reduzierung der *FoxO1*-Synthese mittels siRNA keinen Effekt auf die Dexa-induzierte Apoptose (TUNEL-Analyse/gespaltenes PARP) und Expression des proapoptotischen Zielgens *Bim*. Die zusätzliche Behandlung mit dem pan-AKT-Inhibitor erhöhte aber signifikant die Apoptose (TUNEL-Assay) und *Bim*-Transkription in den Kontrollzellen. Dieser Effekt wurde komplett durch *siFoxO1* aufgehoben. Weitere proapoptotische FOXO1-Zielgene, *FasL* und *Bad*, wurden nicht durch Dexa erhöht. Die Dexa-induzierte Hemmung des TFs *Pdx-1* hingegen war FOXO1 unabhängig. Dexa und die Aktivierung von FOXO1 durch Akti-1/2 wirkten somit synergistisch auf die Apoptose und Transkription von *Bim*. Die Induktion der Transkription von *FoxO1*, *3* und *Bim* wurde auch in aus der Maus isolierten Inselzellen festgestellt. So war auch die zelluläre Verteilung des TFs in diesem Modell vergleichbar reguliert und nur die Behandlung mit dem pan-AKT-Inhibitor führte zu einer nukleären Akkumulation des TFs.

Diese Arbeit zeigt, dass FOXO1 in Betazellen durch alle drei AKT-Isoformen reguliert wird. SGK1 hat keinen Einfluss auf die zelluläre Verteilung und Phosphorylierung von FOXO1 an Ser256 oder Ser319. Es wird zudem erstmalig gezeigt, dass FOXO1 nicht den Initiator der Glukokortikoid-vermittelten Apoptose in Betazellen darstellt. Vielmehr

führt aber die zusätzliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch eine Hemmung der AKT zu einem dramatischen Anstieg des Betazelltodes. Glukokortikoide und aktives FOXO1 führen somit synergistisch zum Betazelltod.

2. Einleitung

2.1. Glukose, Insulin und Diabetes mellitus

Glukose ist einer der wichtigsten energieliefernden Hauptnährstoffe der Zellen des Organismus. Das Gehirn ernährt sich hauptsächlich von Glukose. Für die Erythrozyten ist Glukose sogar essentiell. Somit ist eine ausgeklügelte Regulation des Glukosehaushaltes lebensnotwendig.

2.1.1. Blutglukosehomöostase

Die Blutglukosekonzentration wird im gesunden Menschen konstant zwischen 4,5 mM und 6,5 mM (80–120 mg/dl) gehalten. Bei massiver Kohlenhydratzufuhr kann postprandial eine vorübergehende (alimentäre) Hyperglykämie auftreten. Ein sensibel regulierter Hormonhaushalt ist für die Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes verantwortlich. Hier ist dem aus den Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse stammenden Hormon Insulin eine wesentliche Funktion zuzuordnen. Die Insulinsekretion aus den Betazellen des Pankreas wird bei hoher Blutglukose stimuliert und bewirkt als einziges Hormon eine Senkung der Blutzuckerkonzentration. Es bewirkt die Aufnahme der Glukose in die insulinsensitiven Zielzellen (vgl. 2.1.3.). Einer Hypoglykämie wird hauptsächlich durch die Wirkung folgender Hormone entgegengewirkt: Glukagon, das aus den Alphazellen der Langerhans'schen Insel sezerniert wird, und Adrenalin, welches im Nebennierenmark produziert wird. Diese Hormone erhöhen über die Stimulation der Glukoneogenese aus Aminosäuren und Laktat und über die Stimulation der Glykogenolyse in der Leber den Blutzuckerspiegel. Adrenalin stimuliert außerdem die Glykogenolyse in der Muskelzelle. Somatostatin aus den Langerhans'schen Gammazellen wird postprandial bei erhöhter Blutglukose- und Blutargininkonzentration freigesetzt und bewirkt parakrin eine Hemmung der Insulinsekretion. Die Glukagonsekretion wird auch durch Somatostatin gehemmt. Längerfristig bewirkt das Hormon aber eine Blutzuckererhöhung. Weitere Hormone, wie das Glukokortikoid Kortisol (vgl. 2.5.) aus der Nebennierenrinde oder Thyroxin aus der Schilddrüse können den Blutzuckerspiegel zusätzlich beeinflussen. Eine stressbedingte Sympathikusaktivierung kann bedingt durch eine Hemmung der Insulinsekretion zu einem erhöhten Blutzuckerspiegel führen. Aus dem Darmepithel stammende Hormone, die Inkretine, wie GLP-1 (*glucagon-like-peptide1*) und GIP (*glucose dependent insulinotropic peptide*), führen bei Blutglukosewerten, die über dem

Nüchternwert liegen, zu einer Steigerung der Insulinsekretion (vgl. 2.2.1.) mit gleichzeitiger Hemmung der Glukagonsekretion ¹. Somit haben Inkretine eine regulierende Wirkung auf die Blutglukosehomöostase.

2.1.2. Diabetes mellitus und die Rolle der Betazellfunktion

Eine defekte Insulinsekretion und -wirkung führt zu diversen metabolischen Anomalien, die sich durch Hyperglykämien auszeichnen und einen Diabetes mellitus beschreiben. Es wird zwischen verschiedenen Formen des Diabetes unterschieden, wobei Typ 1 (T1DM) und Typ 2 (T2DM) Diabetes mellitus, die am häufigsten vorkommenden sind. Auch der Gestationsdiabetes stellt mit einer Prävalenz von 4% aller Schwangeren in Deutschland eine häufige Form des Diabetes dar (Evidenzbasierte Leitlinien Gestationsdiabetes DDG, 08/2011). T1DM wird durch eine autoimmune Zerstörung der pankreatischen Betazellen hervorgerufen, was zu einem absoluten Insulinmangel führt. Der Patient ist somit auf die exogene Zufuhr von Insulin angewiesen.

Die weltweite Prävalenz des T2DM liegt 2012 bei über 371 Millionen Menschen, was ca. 8,3 Prozent der erwachsenen Weltbevölkerung ausmacht. (IDF Atlas, Update 2012). Die WHO rechnet mit einer weiterhin zunehmenden Inzidenz in den kommenden Jahren. So besteht ein starkes Interesse daran, die Krankheit und ihre Komplikationen zu verstehen und zu bekämpfen. Nicht zuletzt auch deshalb, da die durch diese Krankheit verursachten staatlichen Kosten immens sind (2011 waren es 11% der gesamten Gesundheitsausgaben für Erwachsene in den USA) (IDF Atlas; Update 2012).

Die Pathogenese des T2DM ist ein komplexer Prozess. Unterschiedliche Faktoren, wie Überernährung und Fehlernährung, insbesondere wie die Western-Style Diät, mangelnde Bewegung und genetische Prädisposition sind an der Entstehung beteiligt. Auch der epigenetischen Prägung wird in den letzten Jahren ein Einfluss auf die T2DM-Entstehung zugeschrieben ². Häufig geht der Erkrankung ein Metabolisches Syndrom, gekennzeichnet durch Adipositas, wobei insbesondere die viszerale Adipositas relevant ist, Hypertonie, Dyslipidämie, Hyperglykämie und Insulinresistenz voraus. Die Insulinresistenz der peripheren Organe, wie Muskel, Leber und Fettgewebe, bedingt einen erhöhten Bedarf an Insulin ³. Dieser Mehrbedarf kann über einen bestimmten Zeitraum durch eine erhöhte Betazellmasse, bedingt durch eine erhöhte Zellzahl, aber auch durch eine Betazell-Hypertrophie, und damit erhöhter Insulinproduktion ausgeglichen werden ^{4 5}. Der Triggerfaktor, der zur Manifestation eines T2DM führt, ist

schließlich das Betazellversagen. Dieses ist durch eine gestörte Glukose-stimulierte Insulinsekretion gekennzeichnet und geht mit einer Reduktion der Betazellmasse einher⁵. Ob dieser Verlust der Betazellmasse ausschließlich durch Apoptose bedingt ist oder eine Dedifferenzierung der Betazellen mitbeteiligt ist, ist derzeit in der Diskussion⁶. Ausgelöst wird die Dysfunktion durch die Glukotoxizität oder auch Lipoglukotoxizität, der die Betazelle durch die veränderten Blutglukose- und Blutfettwerte ausgesetzt ist. Die Betazellfunktion ist also entscheidend für die Pathogenese des T2DM. Zudem konnten in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) eine Vielzahl von mit Diabetes mellitus assoziierten Suszeptibilitätsgenen identifiziert werden, die in der pankreatischen Betazelle exprimiert werden und für deren Funktion und Wachstum relevant sind^{7 8}.

Die genauen molekularen Mechanismen zur Entstehung des T2DM und dessen Folgeerkrankungen, wie kardiovaskuläre Erkrankungen, diabetische Neuropathie, Nephropathie und Retinopathie, sind allerdings noch nicht vollständig verstanden. Die typischen Symptome in den peripheren Geweben, die mit einem T2DM einhergehen, sind eine Insulinresistenz und Hemmung der Insulintransduktion im Skelettmuskel, häufig die Entstehung der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD), erhöhte inflammatorische Aktivität des Fettgewebes und schließlich eine Dysfunktion des Pankreas⁹. Neben diesen metabolischen Auswirkungen der Überernährung, spielt insbesondere auch der inter-organische Crosstalk eine große Rolle. Dieser geschieht über von den Organen ins Blut sezernierte Botenstoffe, wie u.a. Peptide, Proteine oder Zytokine¹⁰. Diese Botenstoffe sind nach ihrem Syntheseort benannt. So wird unter den Adipokinen, aus dem Fettgewebe stammend, den Myokinen aus der Muskulatur und Hepatokinen, aus der Leber stammend, unterschieden. Als Adipokine sind Leptin, Adiponektin oder Resistin und Zytokine, wie TNFalpha oder MCP-1 zu nennen, wobei Leptin und Adiponektin als „anti-diabetisch“ eingeteilt werden^{11 10}. Myokine, wie u.a. IL-6 oder BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) scheinen einen Teil der positiven Effekte von körperlicher Aktivität, wie eine verbesserte Insulinsensitivität oder Fettsäureoxidation im Fettgewebe, zu vermitteln. Zudem scheinen Myokine auch einem Teil der negativen Effekte von Adipokinen, wie der Proinflammation entgegenzuwirken¹². Das Hepatokin FetuinA ist in den letzten Jahren in Zusammenhang mit T2DM und kardiovaskulären Erkrankungen stark in die Diskussion geraten. FetuinA ist ein Glykoprotein, welches von der Leber, verstärkt bei Leberverfettung, sezerniert wird und

positiv mit der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen und Insulinresistenz korreliert ¹³. Dessen Einfluss auf die Insulinsekretion ist allerdings noch ungeklärt.

2.1.3. Metabolische Wirkung von Insulin

Insulin wirkt über Aktivierung des Insulin-/IGF-1-Rezeptors, welcher an der Plasmamembran lokalisiert ist. Der molekulare Mechanismus der Insulin Signaltransduktion wird in Kapitel 2.3. beschrieben.

Im insulinsensitiven Muskel- und Fettgewebe führt eine Aktivierung des Insulin-signalweges zum Einbau des in Vesikeln vorliegenden Glukosetransporters GLUT4 in die Plasmamembran. Dieser Einbau ermöglicht die darauffolgende Glukoseaufnahme aus dem Blut in die Zelle. Eine weitere Wirkung des Insulins ist der Umbau von Nährstoffen in dessen Speicherformen ¹⁴. So wird über Hemmung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 beta (GSK3 β) und somit Aktivierung der Glykogensynthase (GS) die Glykogensynthese in der Leber und im Skelettmuskel aktiviert. GS katalysiert den finalen Schritt der Glykogensynthese. Zudem wird die Triglyzeridsynthese im Fettgewebe und der Leber induziert. Auf der anderen Seite wird durch Hemmung der glukoneogenen und lipolytischen Enzyme die Glukoneogenese in der Leber und Lipolyse in der Leber und dem Fettgewebe gehemmt ¹⁴. Dies unterstützt zusätzlich den Blutzucker senkenden Effekt von Insulin und verringert die Konzentration freier Fettsäuren im Blut. Neben dem Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, beeinflusst Insulin auch den Proteinstoffwechsel. Die zelluläre Aufnahme von Aminosäuren wird stimuliert und die Proteinsynthese im Skelettmuskel aktiviert ¹⁵.

Insulin wirkt somit als Wachstumsfaktor. In den letzten Jahren wurde die Frage verstärkt untersucht und diskutiert, ob erhöhte Insulinblutwerte im Zusammenhang mit einer Insulintherapie, bzw. Insulinsekretion steigernden Medikation bei bestehendem Diabetes mellitus, einen Einfluss auf die Proliferation von Krebszellen hat oder haben kann ^{16 17 18}.

2.2. Pankreas und Langerhans'sche Inselzellen

Insulin wird in der Bauchspeicheldrüse, dem Pankreas, produziert. Diese größte Drüse des menschlichen Organismus besteht jedoch zu 98 Prozent aus exokrinen und nur zu ca. 2 Prozent aus endokrinem Gewebe. Somit hat diese Drüse neben der

Insulinproduktion weitere wichtige Funktionen. Die Azinuszellen des exokrinen Gewebes produzieren Verdauungsenzyme, welche nach einer Mahlzeit über den Ductus pancreaticus in den Dünndarm abgegeben werden. Das endokrine Gewebe bildet als funktionelle Einheit die Langerhans'sche Insel. Ein erwachsener Mensch besitzt ca. 1 Mio. Langerhansinseln. Diese bestehen zu jeweils 15-20 Prozent aus Glukagonproduzierenden Alphazellen, zu 3-10 Prozent aus Somatostatin-produzierenden Gammazellen und zu ca. 1 Prozent aus pankreatisches Polypeptid-produzierenden PP-Zellen. Den größten Anteil mit 65-80 Prozent machen die Insulin-produzierenden Betazellen aus ¹⁹. Die Langerhans'schen Inseln sind stark vaskularisiert und sezernieren die genannten Hormone direkt ins Blut. Im Gegensatz zu den im Labor für Untersuchungen häufig herangezogenen murinen Inseln sind humane Inseln schwächer innerviert ¹⁹. Auch die Architektur der humanen Insel unterscheidet sich von der der murinen. Murine Inseln bestehen aus einem klar abgegrenzten Kern aus Betazellen, welcher von einem Kranz aus nicht-Betazellen umgeben wird. In humanen Inseln hingegen umsäumen die nicht-Betazellen die Kapillaren am äußeren Rand der Insel, reichen aber bis in den betazellreichen Kern hinein und sind direkt neben diesen lokalisiert. Diese Architektur könnte somit auch eine parakrine Interaktion beeinflussen ^{20 21}.

2.2.1. Insulinsekretion und dessen Regulation

Die postprandiale Insulinsekretion findet in einem biphasischen Prozess statt und wird über Nährstoffe und hormonelle Signale gesteuert. Der Hauptregulator (der ersten Phase) ist Glukose. Freie Fettsäuren, Inkretine und Aminosäuren können als Potentioren (in der zweiten Phase), in der Literatur auch *'amplifying signals'* genannt, wirken. Für deren Wirkung muss aber eine Grundstimulation der Betazelle durch Glukose gegeben sein.

In Abbildung 2.1 ist eine Übersicht zum Ablauf der Insulinsekretion gezeigt. Glukose gelangt über GLUT2-Transporter in die Betazelle. Dieser Transporter zeichnet sich durch eine geringe Affinität für Glukose aus (K_m -Wert 17 mM) und wird in der Betazelle stark exprimiert, wodurch der Transport bei normalen Blutglukosekonzentrationen noch nicht gesättigt ist ^{22 23}. Die Glukose wird nach Aufnahme in die Zelle oxidativ metabolisiert, wobei ATP entsteht. Bei der Glykolyse ist die Glukokinase, die den ersten Schritt, die Phosphorylierung von D-Glukose zu Glukose-6-Phosphat katalysiert, der limitierende Faktor ²³. Funktionelle Mitochondrien, in dessen Membranen die ATP-

Produktion stattfindet, sind somit eine entscheidende Voraussetzung für eine gesunde Betazellfunktion. Das erhöhte Verhältnis von ATP zu ADP führt zur Hemmung und damit Schließung der ATP-sensitiven Kaliumkanäle. Der verminderte Ausstrom von Kalium aus der Zelle hat eine Depolarisation der Plasmamembran zur Folge. Das unter substimulatorischen Glukose-konzentrationen ($\leq 3\text{mM}$) vorliegende Ruhepotential der Plasmamembran liegt bei -70 mV . Wird durch die K^+ -ATP-Kanal (Sulfonylharnstoff-Rezeptor)-abhängige Membrandepolarisation der Schwellenwert von -40 mV erreicht, öffnen sich die spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle über die Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol strömen. Typische Ca^{2+} -getriggerte Aktionspotentiale (APs) treten auf ^{24 25}. Das intrazelluläre Ca^{2+} vermittelt die Exozytose der Insulin-enthaltenden Vesikel. Dieser Prozess wird auch als „*triggering pathway*“ bezeichnet ²⁶. Zudem existiert ein „*metabolic amplifying pathway*“, der allerdings nicht völlig verstanden ist. Dieser Signalweg ist physiologisch für beide Phasen der Glukose-induzierten Insulinsekretion relevant. Zudem spielt er auch bei der Glukose-abhängigen Potenzierung der durch nicht-metabolisierte Sekretionsstimuli (z.B. Arginin)-induzierten Insulinsekretion eine Rolle ^{27 28}. Hier kann die Beteiligung der Mitochondrien auch wichtig sein. So führt zum Beispiel auch die Glukose-induzierte Generierung von Glutamat in den Mitochondrien zu einer verstärkten Exozytose von Insulin ^{29 30}. Spannungsabhängige K^+ -Kanäle, die sich ab einem Membranpotential von -50 mV öffnen ³¹, sowie Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle ³², führen zu einer Repolarisation der Plasmamembran. Die Betazelle zeigt ein charakteristisches Muster elektrischer Aktivität, sowie Oszillationen der zytosolischen Kalziumkonzentration. Aus diesem Grund findet die Insulinsekretion pulsatil statt ^{33 34}. Die Exozytose der Insulin-enthaltenden Vesikel wird durch die zytosolisch erhöhte Ca^{2+} -Konzentration auf unterschiedlichen Wegen vermittelt. Ca^{2+} bindet direkt an Proteine des SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*)-Komplexes und stimuliert so die Exozytose. SNARE vermittelt die Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran ³⁵. Weiterhin kommt es zu einer Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase C (PKC), was die Phosphorylierung spezifischer für die Exozytose wichtiger Proteine zur Folge hat. Auch für die Gq-GPCR (G-Protein-gekoppelter Rezeptor) gekoppelte Phospholipase C (PLC) stellt Ca^{2+} einen Kofaktor dar. PLC hydrolysiert PIP₂ aus der Plasmamembran in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). DAG wiederum aktiviert PKC. IP₃ führt zur Freigabe von Ca^{2+} aus dem intrazellulären Speicher des endoplasmatischen Retikulums (ER). Der muskarine M₃-Rezeptor und die Bindung von Acetylcholin ³⁶, sowie der

Fettsäurerezeptor FFA1/GPR40 und die Bindung von mittel- und langkettigen ungesättigten freien Fettsäuren (FFA) ³⁷ sind Beispiele für diesen Gq-GPCR-vermittelten Mechanismus.

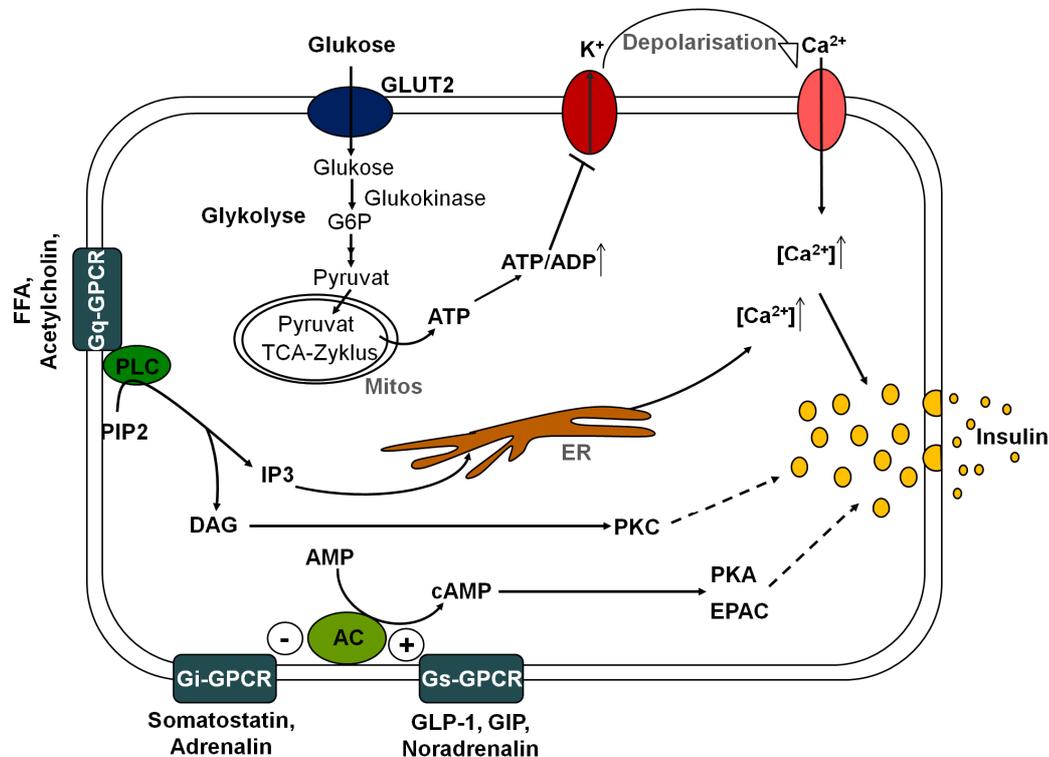


Abbildung 2.1: Vereinfachte schematische Darstellung der Insulinsekretion

Erklärungen siehe Text.

AC, Adenylatzyklase; ER, endoplasmatisches Retikulum; FFA, freie Fettsäuren; GPCR, G-Protein gekoppelter Rezeptor; G6P, Glukose-6-Phosphat; Mitos, Mitochondrien; TCA, Tricarbonsäure

Ein weiterer Signalweg verläuft über Aktivierung der Adenylat-Zyklase, was in einem Anstieg des intrazellulären cAMPs resultiert. cAMP aktiviert Proteinkinase A (PKA) und EPAC (*exchange proteins activated by cyclic AMP*). Folglich führt die Bindung an Gs-GPCR, durch das aus den L-Zellen im Dünndarm stammende Inkretin GLP-1 beispielsweise zu einer erhöhten Insulinsekretion („*neurohormonal amplifying pathway*“) ²⁸.

Weitere Kanäle, wie TRP (*transient receptor potential*)-Kanäle spielen außerdem eine Rolle bei der Regulation der Insulinsekretion ^{38 39 40}. Desweiteren wurde gezeigt, dass auch Gallensäuren einen stimulierenden Effekt auf die Insulinsekretion haben ⁴¹. Durch die Stimulation von Gi-GPCR, z.B. durch Adrenalin (α_2 -Adrenozeptor) ^{42 43} oder

Somatostatin (Somatostatinrezeptor SSTR) ^{44 45} hingegen wird die Sekretion gehemmt. Auch Glukokortikoide führen auf mehreren Wegen zu einer Hemmung der Insulinsekretion (vgl. 2.5.) ^{46 47 48}.

Ein autokriner Effekt von Insulin auf die eigene Sekretion wird kontrovers diskutiert. Eine PI3K-abhängige Aktivierung des K_{ATP} -Kanals durch Insulin, die zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran führt wurde u.a. beschrieben ⁴⁹.

Die Transkription und Translation des Insulingens wird durch viele Faktoren kontrolliert. Der Glukosestoffwechsel ist aber in diesem Zusammenhang das wichtigste physiologische Ereignis ⁵⁰. Insulin bewirkt autokrin eine Stimulation der Insulingen-transkription ^{51 52} und Insulinsekretion ^{53 54}. Chronisch erhöhtes Insulin wirkt aber hemmend auf die Sekretion ^{55 56 57}.

2.3. Insulin Signaltransduktion

Der Insulin-/IGF-1 Signalweg spielt eine wesentliche Rolle für das Überleben und den Stoffwechsel der Zelle. Insulinrezeptoren werden in Leber-, Muskel- und Fettgewebe, aber auch in Betazellen des Pankreas exprimiert. Eine Dysregulation des Signalweges kann somit die Entstehung eines Diabetes mellitus oder von Tumoren begünstigen.

2.3.1. Insulin Signalweg

Der ausgereifte Insulinrezeptor ist ein Transmembranrezeptor, welcher über Disulfidbrückenbindung ein Hetero-tetramer bildet. Das Hetero-tetramer besteht aus jeweils einer extrazellulären Alpha- und einer transmembranen Betauntereinheit. Es sind zwei Isoformen des Insulinrezeptors, IR-A und IR-B, bekannt. Die Transkription der Isoformen variiert in den unterschiedlichen Geweben. Der IGF-1-Rezeptor weist zu diesen außerdem eine starke Homologie auf. So findet die Bildung von Hybridrezeptoren aus IR-A, IR-B und IGF-1-Rezeptor statt. Dies ermöglicht aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten zu Insulin und IGF-1 eine gewebsspezifische Wirkung der den Rezeptor bindenden Agonisten, wie z.B. von Wachstumsfaktoren ⁵⁸.

Die Bindung von Insulin oder IGF-1 an die Alphauntereinheit des Insulinrezeptors, der zur Klasse der Rezeptortyrosinkinasen gehört, begünstigt nach Konformationsveränderung die Autophosphorylierung der Betauntereinheit des Rezeptors an verschiedenen Tyrosinresten ⁵⁸. Der aktivierte Rezeptor phosphoryliert und bindet nun

verschiedene Scaffold-Proteine, wie Insulin-Rezeptor-Substrat Proteine (IRS1, 2, 3, 4), aber auch SHC (*Src-homology-2 containing protein*), *c-Cbl* (CBL) *proto-oncogene* oder GAB1 (*Grb2-associated binding protein1*). Die Aktivierung dieser verschiedenen Scaffold-Proteine wiederum führt zu einer Induktion unterschiedlicher Signalwege ¹⁴. IRS1 und IRS2-Tyrosin-Phosphorylierung führt zu einer Rekrutierung und Bindung der regulierenden Untereinheit p85 der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Durch Konformationsveränderung wird deren katalytische Untereinheit p110 aktiviert. Aktivierte PI3K phosphoryliert Inositol enthaltende Membranlipide an der 3'-OH Position des Inositolringes und bildet somit Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3). PH (*pleckstrin homology*)-Domäne-beinhaltende Proteine, wie AKT und PDK-1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase1*) werden durch Bindung an PIP3 aus dem Zytosol an die Membran rekrutiert. Diese Kolo-kalisation von AKT und PDK1 führt zur Konformationsänderung von AKT und ermöglicht somit dessen Phosphorylierung an Thr308 innerhalb der Aktivierungsschleife durch PDK1 ¹⁴. Nach Aktivierung transloziert AKT von der Plasmamembran ins Zytosol und den Zellkern und phosphoryliert dort entsprechende Substrate (vgl. 2.3.2.) (Abb. 2.2.).

Neben den drei AKT-Kinasen AKT1, AKT2 und AKT3, sind die SGK1 und die PKC weitere wichtige Substrate der PDK1.

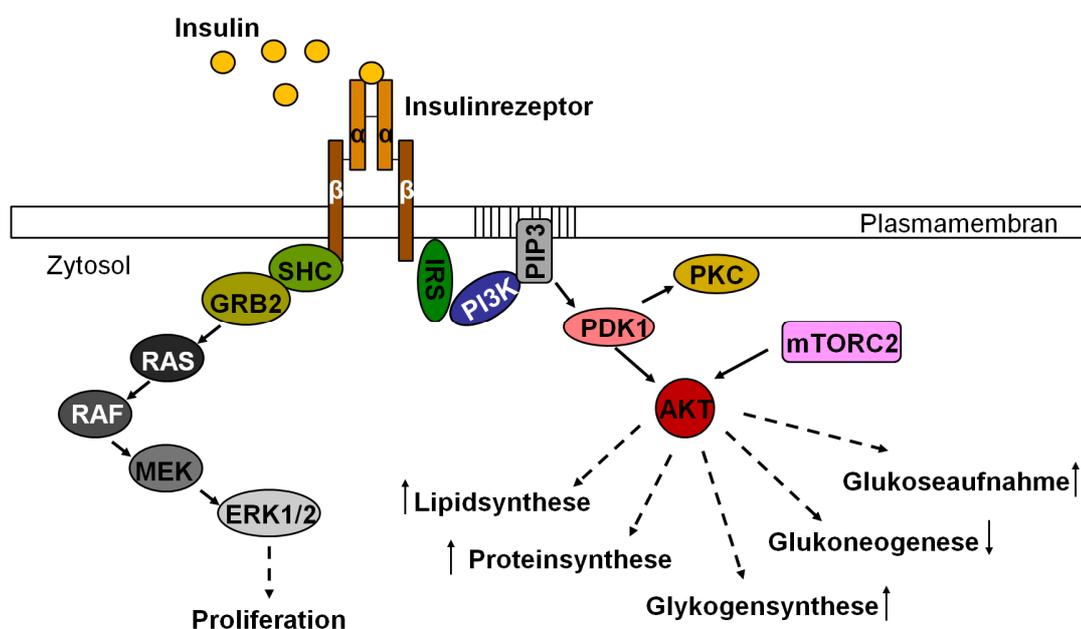


Abbildung 2.2: Insulinsignalweg

Schematische Darstellung des Insulinsignalweges. Erklärungen siehe Text.

Der Insulin-/IGF-1-/PI3K-Signalweg wird durch die Phosphatasen PTEN (*Phosphatase and tensin homologue*) und SHIP2 (*SH2-domain-containing inositol-5'-phosphatase-2*), die PIP3 dephosphorylieren, wieder inaktiviert ⁵⁹.

In der Muskelzelle und im Adipozyt ist der Signalweg über IRS1 der Schlüsselmediator für die GLUT4 Rekrutierung an die Membran. In der Leber wird die anabole Wirkung von Insulin hingegen überwiegend über IRS2 vermittelt. Für die pankreatischen Betazelle ist IRS2 wesentlich für das Überleben und die Funktion. So führt die betazellspezifische Reexpression von IRS2 zum Überleben von IRS2-KO-Mäusen. Eine Betazellspezifische Überexpression von IRS2 wirkt in Mäusen auch dem Streptozotocin- oder durch Adipositas-induzierten Diabetes mellitus entgegen ⁶⁰.

Ein weiterer wichtiger Signalweg, der über den Insulinrezeptor aktiviert wird, ist die MAPKinasen-Kaskade. Über SHC, GRB2 ¹⁴ oder PKC wird der RAS (*Rat sarcoma*)/RAF/MEK1/ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*) Signalweg aktiviert, der eine wesentliche Rolle für die Zellproliferation, die Differenzierung und die Stressantwort der Zelle spielt ^{61 58}.

2.3.2. AKT

Die AKT-Kinasen, auch Proteinkinasen B (PKB) genannt, haben eine Vielzahl an Substraten, die Zellwachstum, Zellgröße, Differenzierung und Überleben der Zelle beeinflussen. Diese Eigenschaft spricht ihnen eine erhebliche Funktion in der Regulation der Homöostase der Zelle zu. Als einer der wichtigsten Vermittler des PI3K-Signalweges spielen AKT-Kinasen deswegen eine wichtige Rolle bei vielen Erkrankungen des Menschen, wie Diabetes mellitus und Krebs.

AKT Kinase gehören zu der Unterklasse der AGC - (*cAMP-dependent protein kinase A* (PKA) *cGMP dependent protein kinase G/ phospholipid dependent protein kinase C* (PKC)) Kinasen. Drei Isoformen der AKT sind bekannt, die am häufigsten vorkommende AKT1 (PKBalpha), AKT2 (PKBbeta) und AKT3 (PKBgamma). Die 60 kDa großen Proteine werden durch separate Gene kodiert, teilen aber eine Sequenzhomologie von über 80% ⁶². Auch haben sie eine sehr ähnliche strukturelle Organisation. Alle Isoformen tragen eine aminoternale PH-Domäne (vgl. 2.3.1.), eine zentrale katalytische, sowie eine carboxyterminale regulatorische Domäne ⁶³. AKT1 wird in fast allen Geweben exprimiert. AKT2 wird in den insulinsensitiven Geweben besonders stark exprimiert, während AKT3 im Gehirn und Testis am stärksten exprimiert wird ⁶². Die AKT1-Knockout-Maus weist ein vermindertes Wachstum auf, hat aber keinen metabolischen

Phänotyp ⁶⁴ ⁶⁵. AKT2-Knockdown führt zu einer starken Insulinresistenz und zur Entwicklung eines Diabetes mellitus. Das Wachstum dieser AKT2-KO-Mäuse ist nur geringfügig retardiert ⁶⁶. AKT3-Knockout in Mäusen führt zu einer Reduktion der Gehirngröße; die Körpergröße und der Metabolismus sind aber unverändert ⁶⁷. Der Doppel-Knockdown von AKT1 und AKT2 führt zu einem schweren neonatal letalen Phänotyp ⁶⁸.

Wie in Kapitel 2.3.1. beschrieben, führt die Phosphorylierung durch PDK1 an Thr308 zur Aktivierung der AKT-Isoenzyme. Zur vollen Aktivität ist jedoch eine weitere Phosphorylierung an Ser473 notwendig. Hier wird u.a. der mTor (*mammalian target of rapamycin*)-Rictor-Komplex (mTORC2) als phosphorylierende Kinase beschrieben ⁶⁹. Außerdem sind weitere Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen in der Lage AKT zu phosphorylieren, was vom jeweiligen Stimulus abhängt ⁷⁰. Die Tyrosinkinasen Ack1/TNK2 (*Activated CDC42 kinase 1*), Src, PTK6 (*Protein tyrosine kinase 6*), sowie die Serin/Threonin-Kinasen TBK1 (*TANK-binding kinase 1*), IKKEpsilon (*I-kappa-B kinase epsilon*) und DNA-PK (*DNA-dependent Protein kinase*) ⁷¹ beispielsweise führen über die Phosphorylierung von AKT zu dessen erhöhten Aktivität ⁷⁰. Weitere PI3K-unabhängige Mechanismen wurden beschrieben. So wurde eine Aktivierung von AKT durch erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen via CaMKK (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*), welche AKT direkt an Thr308 phosphoryliert, nachgewiesen ⁷². Burton *et al.* konnten auch eine modulierende Rolle von ER-Stress auf die Phosphorylierung von AKT und eine folglich veränderte Substratspezifität aufzeigen ⁷³. Die Dephosphorylierung von AKT erfolgt durch die Phosphatasen PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) und PHLPP alpha (*PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) ⁷⁴ ⁷⁵. Weiterhin kann die Aktivierung von AKT auch direkt durch Bindung von TRB3 (*Tribbles homolog 3*) verhindert werden ⁷⁶. Weitere, die Aktivität von AKT modulierende Proteine, wie HSP90 (*Heat shock protein-90*) ⁷⁷ ⁷⁸, CTMP (*C-terminal modulator protein*), JIP1 (*JNK-interacting-protein1*), GRB10 (*Growth factor receptor-binding protein-10*) oder Girdin/APE (*AKT phosphorylation enhancer*) ⁷⁹ sind bekannt.

Viele der in Kapitel 2.1.3. beschriebenen Wirkungen durch den Insulin/PI3K-Signalweg werden durch AKT vermittelt. Hier ist insbesondere die anti-apoptotische Wirkung hervorzuheben: Die hemmend wirkende Phosphorylierung von FOXO, sowie die Phosphorylierung des pro-apoptotischen BAD, die zur Hemmung von BAD führt, sind zwei wichtige AKT-abhängige anti-apoptotischen Signale ⁸⁰ ⁸¹ (vgl. 2.4.). Zudem hemmt AKT die proteolytische Spaltung und damit die Aktivierung der Procaspase9 ⁸².

Durch Phosphorylierung und damit Hemmung der Zellzyklusinhibitoren p27^{Kip} und p21^{Cip1/Waf1} hat AKT eine proliferative Wirkung auf die Zelle ⁸³. Desweiteren führt die Phosphorylierung der E3-Ubiquitin Proteinligase MDM2 (*Mouse double minute 2 homolog*) zu einer Degradation des durch DNA-Schädigung und andere genomische Aberrationen aktivierten Tumorsuppressors p53. Auf diese Weise wird die Expression der p53-Zielgene und somit die p53-abhängige Apoptose gehemmt, und die Proliferation der Zelle unterstützt ⁸⁴. Durch die hemmende Phosphorylierung von TSC2 (*Tuberous sclerosis complex 2, Tuberin*), und damit folgende Aktivierung von mTORC1 (*Mammalian target of rapamycin complex 1*), aktiviert AKT indirekt den mTOR-Komplex. Die Aktivierung dieses Signalweges führt zu einer erhöhten Proteinsynthese (über S6K1 (*ribosomal s6 kinase 1*) und eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*)), Ribosomenbiogenese und Transkription ⁸⁵ und somit zu verstärktem Zellwachstum. Für das Wachstum von Gewebe ist die Angiogenese von Bedeutung. Hier kann AKT durch Aktivierung von eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) und HIF (*Hypoxia-inducible factor*) stimulierend wirken. eNOS und HIF induzieren die Expression endothelialer Mitogene, wie VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) ⁸⁶.

Im Fett-, Muskel- und Lebergewebe wird der PI3K-Signalweg über eine negative Rückkopplung gehemmt und so eine Überstimulation vermieden. Durch AKT aktiviertes mTORC1 führt zu einer Stimulation der S6Kinase woraufhin S6K1 IRS1 inhibitorisch phosphoryliert ⁸⁵. Die im Muskel und der Leber Insulin-induzierte Hemmung der GSK3beta wird auch über AKT vermittelt (vgl. 2.1.3.). AKT stimuliert außerdem direkt die GLUT4 Mobilisierung an die Plasmamembran ⁸⁷. Somit regulieren AKT-Kinasen auch den insulinabhängigen Glukosetransport in die Zelle und den Glukosemetabolismus.

2.3.3. SGK1

Serum-und-Glukokortikoid-induzierte Kinasen (SGK) gehören strukturell, wie AKT, zu der großen Gruppe der AGC-Threonin/Serin-Kinasen. SGK1 wurde ursprünglich als *immediate early gene* entdeckt, welches in Mammatumorzellen von Ratten transkriptionell durch Serum und Glukokortikoide stimuliert wird und eine sehr kurze Halbwertszeit von ca. 20 Minuten hat ⁸⁸. Unter basalen Bedingungen wird die 50 kDa große Kinase sehr schnell über den am ER assoziierten Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Weg abgebaut ⁸⁹. Eine besondere Charakteristik von SGK1 im Vergleich zu vielen anderen Kinasen ist dessen Eigenschaft der strikten stimulusabhängigen Regulation der Transkription, subzellulären Lokalisation und enzymatischen Aktivität.

In Mäusen und im Menschen sind zwei weitere Isoformen, die SGK2 und SGK3 (auch CISK (*cytokine-independent survival kinase*) genannt) bekannt^{90 91}. Die Isoformen unterscheiden sich im N-terminalen Bereich und tragen eine Homologie von ca. 75% der Aminosäuresequenz in der katalytischen Domäne⁸⁹. SGK2 und SGK3 werden allerdings nicht von Glukokortikoiden reguliert⁹⁰. Die katalytische Domäne der SGK1 weist eine Sequenzhomologie von über 50% zu denen der AKT-Kinasen auf. SGK1 besitzt allerdings keine PH-Domäne, und kann somit nicht, wie die AKT-Kinasen, mit PIP3 interagieren⁹².

SGK1 wird ubiquitär exprimiert, jedoch variiert die mRNA Konzentration in den unterschiedlichen Zelltypen stark. Hohe Transkriptionslevel wurden u.a. in den Azinuszellen des Pankreas⁹³ oder im distalen Tubulus der Niere gefunden⁹⁴. Typische Expressionsmuster werden darüberhinaus während der Embryogenese, sowie der postnatalen Entwicklung beschrieben^{95 91}. SGK3 ist in den unterschiedlichen Geweben ähnlich präsent wie SGK1, und besonders hoch im Herz, der Milz und im Embryo exprimiert^{96 90}. SGK2 wird überwiegend in der Leber, Niere und im Pankreas exprimiert⁹⁰.

Die Struktur der SGK1 ist evolutionär hoch konserviert. Die Proteinkinase wird in allen untersuchten eukaryontischen Organismen exprimiert, einschließlich *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, Fischen und Säugetieren⁹⁷. Die Expression der SGK1 ist einer starken Regulation unterworfen. In der Promotorregion wurden Bindestellen für verschiedene TFs, wie beispielsweise für den GK-R (Glukokortikoid-Rezeptor), für den MR (Mineralokortikoidrezeptor), den VDR (Vitamin D-Rezeptor), PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*), den RXR (Retinoid-X-Rezeptor), für den FXR (Farnesoid-X-Rezeptor), CREB, p53, AP-1, ATF6, oder NfkappaB identifiziert⁹⁵.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Funktionsregulation der Kinase ist deren zelluläre Lokalisation, welche je Zustand der Zelle variiert: die durch Serum, FSH (*follicle stimulation hormone*) oder LH (luteinisierendes Hormon) aktivierte SGK1 bindet über ihre NLS (Kernlokalisierungssignal)-Region an den nukleären Import-Rezeptor Importin-alpha und gelangt so in den Zellkern. Die durch hyperosmotischen Schock oder Glukokortikoide aktivierte SGK1 befindet sich überwiegend im Zytosol^{95 98}. Demnach befindet sich die SGK1 in wachstumsstimulierten Zellen im Zellkern, in Zellen unter Wachstumsarrest hingegen im Zytosol. SGK1 pendelt auch synchron mit dem Zellzyklus⁹⁸. Auch an der mitochondrialen Membran wurde SGK1 detektiert⁹⁵.

Der Phänotyp der SGK1-Knockout-Maus fällt sehr mild aus und die Maus zeigt keine Auffälligkeiten. Unter einer Salz-defizienten Diät offenbart sich aber eine verminderte Fähigkeit der Salzretention, sowie der adäquaten verstärkten Kaliumausschüttung nach Kaliumgabe. Außerdem ist der stimulierende Effekt von Glukokortikoiden auf die intestinale Glukoseaufnahme verringert⁹⁹, sowie auf die Aufnahme von Glukose in Fett- und Muskelgewebe nach einem intraperitonealen Glukosestimulus¹⁰⁰. Die SGK3-Knockout-Maus weist einen transienten Haarverlust sowie ein erhöhtes Körpergewicht auf. Eine Doppelknockout-Maus zeigt den Haar-Phänotyp der SGK3-Knockout-Maus und den renalen Phänotyp der SGK1-Knockout-Maus⁹¹.

SGK1 wird durch Phosphorylierung an Thr256 durch PDK1 und Phosphorylierung an Ser422 durch *PDK2/H-motif Kinase* über den PI3K-Signalweg aktiviert. Außerdem wurde der mTORC-Komplex 2, nicht aber der mTORC Komplex 1 als relevante Kinase für die Phosphorylierung an Ser422 identifiziert¹⁰¹. Zudem wurden weitere Phosphorylierungsstellen beschrieben, die zu einer verstärkten Aktivität führen^{102 103}. Neben dem PI3K-Signalweg, wird SGK1 auch durch HGF (*hepatic growth factor*) und FSH induziert⁹¹. Zytosolisches Kalzium aktiviert CaMKK-abhängig SGK1. cAMP und Oxidation stellen weitere Aktivatoren dar⁹¹. Insulinunabhängig stimulieren mTor^{104 101} und RAC1¹⁰⁵ die Aktivität von SGK1. Außer über einen schnellen Abbau der SGK1, kann diese auch über Dephosphorylierung durch PP2A gehemmt werden¹⁰⁶.

SGK1 scheint auch Tumorwachstum beeinflussen zu können. In Mikroarray-Transkriptom-Untersuchungen von Androgen-abhängigen Prostatakrebszellen wurde das für SGK1 kodierende Gen als besonders stark hochreguliertes Gen identifiziert. Aus diesem Grund wurde von Glaxo Smith Kline 2008 ein Inhibitor (GSK650394) gegen SGK1 als Therapie-Target entwickelt und dessen Spezifität untersucht¹⁰⁷. Der Inhibitor wird als mögliche Substanz für die Therapie einer Prostatakrebsvariante diskutiert, bei der eine Mutation in der PI3K oder PTEN vorliegt, was zu einer Verstärkung des downstream liegenden Signalweges führt^{107 108}. Auch in Mammatumorzellen scheint SGK1 eine Schlüsselrolle zu spielen. Ein entscheidendes Merkmal für den proliferativen Zustand der Tumorzelle ist das Pendeln der Kinase zwischen dem Zellkern und Zytosol⁹⁸. Zudem wird SGK1 durch den Tumorsuppressor APC, welcher im Wnt-Signalweg wirkt, gehemmt. Ein aktiver Wnt-Signalweg ist ein häufiges Kennzeichen vieler Krebsarten und besonders des kolorektalen Krebses¹⁰⁹.

Funktion

SGK1 spielt eine große Rolle im elektrolytischen Haushalt, bei der Regulation des extrazellulären Volumens, beim metabolischen Syndrom, Tumorwachstum, Entzündung und fibrösen Erkrankungen (50). Die Substrate der SGK-Isoformen überschneiden sich zu einem großen Anteil mit denen von AKT. Die GSK3^{110 106}, FOXO3¹¹¹ oder b-Raf-Kinase¹¹² sind Beispiele solcher gemeinsamen Substrate. SGK- und AKT-Kinasen erkennen und phosphorylieren einen Serin- oder Threoninrest innerhalb des Sequenzmotives 5'-RXXXS/T-3' (X stellt eine variable Aminosäure dar)^{110 113 114}.

Als spezifisches Substrat für SGK1 wird das ubiquitär exprimierte NDRG1 und NDRG2 (*n-myc downstream-regulated gene1 and 2*) beschrieben. NDRG1 wird durch Phosphorylierung an Thr328, Ser330 und Thr346 (äquivalent zu Thr330, Ser332 und Thr348 an NDRG2) durch SGK1 stimuliert¹¹⁴. Die Aktivierung dieser Kinasen unterstützt das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben der Zelle. So wurde für NDRG1 auch eine Rolle in der Progression von Krebs beschrieben^{115 116}. Auch durch die hemmende Wirkung auf FOXO3, b-Raf und MEKK3 wirkt SGK1 proliferativ¹¹⁷.

Ein Teil der Wirkungen von SGK1 kann dadurch erklärt werden, dass über die Phosphorylierung und somit Hemmung der Ubiquitin E3-Ligase Nedd4-2 indirekt die Degradation der NEDD4-2-Zielproteine gehemmt wird. Außerdem regulieren sich SGK1 und NEDD4-2 gegenseitig durch einen Rückkopplungsmechanismus. Die Phosphorylierung von NEDD4-2 durch SGK1 führt einerseits zu einer reduzierten Bindung von NEDD4-2 an dessen Zielproteine, andererseits aber auch zu einer NEDD4-2 abhängigen Degradation von SGK1 selber¹¹⁸. Eine gut untersuchte Funktion der SGK1 ist ihre Rolle im elektrolytischen Haushalt. So verlängert SGK1 indirekt die Halbwertszeit (HWZ) des Ionenkanals ENAC, ein durch Mineralkortikoide wie Aldosteron regulierter renaler epithelialer Natriumkanal. Auch Transportproteine, wie der intestinale Natrium/Glukose-Transporter SGLT1, der Glutamattransporter EAAT1, der Phosphat-Transporter NaPiIIb und die Na⁺/K⁺-ATPase werden über diesen Mechanismus indirekt durch SGK1 induziert.

Weitere durch SGK1 regulierte Ionenkanäle sind der renale und medulläre Kaliumkanal ROMK1¹¹⁹, der renale epitheliale Kalziumkanal TrpV5 (*transient receptor potential cation channel*), die Chloridrezeptoren ClCKa und der ubiquitäre ClC2¹²⁰, CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane regulator Cl-channel*)¹²¹, der kardiale spannungsgesteuerte Na⁺-Kanal SCN5A^{122 123}, der kardiale und epitheliale K⁺-Kanal KCNE1/ KCNQ^{124 125}, die

spannungsgesteuerten K⁺-Kanäle Kv1.3¹²⁵ und Kv4.3, sowie der Kationenkanal 4F2/LAT¹²⁶.

Diverse Transporterproteine und Pumpen, wie der Na⁺/H⁺-Austauscher NHE3¹¹⁹, der Na⁺-Dicarboxylat-Kotransporter NaDCT¹¹⁹, die Glukosetransporter GLUT1 und 4¹²⁷, die Aminosäuretransporter EAAT1-5^{128 129 130 131} oder der Kreatinintransporter Creat werden ebenso durch SGK1 reguliert.

Die oben genannten Funktionen der SGK1 lassen darauf schließen, dass die Entwicklung einer Diabetes mellitus-Erkrankung durch SGK-1 beeinflusst werden kann:

Erhöhte SGLT1 Aktivität geht mit einer verstärkten intestinalen Glukoseabsorption und einer folglich verstärkten Insulinausschüttung einher. Der verstärkte An- und Abstieg der Blutglukose führt zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme und einer Fetttanlagerung. Diese Faktoren führen endgültig zu einer Gewichtszunahme⁹⁵. So zeigte eine Studie, dass Menschen, die eine bestimmte SNP (*single nucleotide polymorphism*)-Kombination im *SGK1*-Gen tragen, einen erhöhten Body Mass Index (BMI) und eine erhöhte Prävalenz für T2DM haben. Der begleitende Bluthochdruck könnte eventuell durch die veränderte SGK1-abhängige Regulation des ENAC und der damit verbundenen erhöhten Aufnahme von NaCl erklärt werden^{132 133}.

Die SGK1-vermittelte Hemmung von NEDD4-2 aktiviert indirekt den Kv1.5 und trägt zur Hemmung der Insulinausschüttung durch Glukokortikoide bei⁴⁸ (vgl. 2.2.1.) Die Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase durch SGK1 während der Repolarisierung der Plasmamembran hat außerdem einen negativen Einfluss auf die Insulinsekretion⁴⁶.

Zusammenfassend ist SGK1 somit in unterschiedliche Zellvorgänge, wie Zellüberleben, zelluläre Stressantwort und renale Natriumausscheidung involviert.

2.3.4. Forkhead box Transkriptionsfaktoren der Klasse O

Die Phosphorylierung von FOXO stellt eine der wichtigsten AKT-abhängigen anti-apoptotischen Signale dar⁸⁰ und kann somit als ein Schlüsselfaktor des Insulinsignalweges genannt werden. FOXO-Faktoren sind wichtige Mediatoren in der Balance zwischen den Reizen, die Zellwachstum und Differenzierung unterstützen und denen, die über Stresssignalwege zur Zellschädigung führen. So wurde FOXO1 mehrfach als ein relevanter Vermittler im Prozess des Betazellversagens und bei der Entstehung eines Diabetes mellitus beschrieben^{134 135}.

Forkhead box O-Transkriptionsfaktoren stellen eine Untergruppe in der Familie der Forkhead Proteine dar. Diese sind durch eine hoch konservierte DNA-Bindedomäne, die

Forkhead (FKH) box charakterisiert. Im Jahr 2000 wurde die Nomenklatur dieser großen Gruppe von Transkriptionsfaktoren (TF) standardisiert, und der Term ‚Forkheadbox, FOX‘ wurde etabliert ¹³⁶. Die Familie der Forkhead Proteine umfasst über 100 Mitglieder von A bis R, wobei Untergruppe O die vier Mitglieder O1 (früher FKHR: *forkhead in human rhabdomyosarcomas*), O3 (früher FKHL1: *forkhead in rhabdomyosarcomas-like protein1*), O4 (früher AFX: *acute leukemia fusion gene*) und O6 umfasst. FOXO1, 3 und 4 wurden durch die Klonierung chromosomaler Translokationen in humanen Tumoren, dem Rhabdomyosarkom und bei akuter Myeloischer Leukämie erstmals identifiziert ¹³⁷. Die FOXO-Proteine der Vertebraten sind Homologe zu dem Protein *Abnormal Dauer Formation-16* (DAF-16) von *C. elegans* und dFOXO von *Drosophila*. DAF-16 korreliert direkt positiv mit der Lebensspanne des Wurmes ¹³⁸.

Struktur

Die Klasse O der Fox-Transkriptionsfaktoren weisen eine N-terminal lokalisierte DNA-bindende FKH-Domäne und eine C-terminale Transaktivierungsdomäne auf (Abb. 2.3a). Die Struktur der monomeren 100 Aminosäure langen DNA-Bindedomäne ist durch ein Helix-turn-Helix-Motiv, bestehend aus drei Alphahelices, drei Betasträngen und zwei charakteristischen großen Schlaufen, den sogenannten ‚wings‘, gekennzeichnet. Aus diesem Grund wird das DNA-Bindemotiv auch Winged-Helix DNA-Motiv genannt ¹³⁶. Dieses Motiv bindet an regulatorische Bereiche der DNA mit der Konsensusstruktur 5'-TTGTTTAC-3' ¹³⁹. Zusätzlich wurden ein nukleäres Exportsequenzmotiv (NES), sowie ein nukleäres Lokalisierungssignalmotiv (NLS) beschrieben (Abb. 2.3a). Diese Motive ermöglichen den nukleo-zytoplasmatischen Hin- und Hertransport der TFs.

Für die Regulation mancher Zielgene ist die DNA-Bindedomäne ohne Bedeutung, da FOXO-Proteine mit anderen Kofaktoren funktionell interagieren können. Dies konnte in einer Arbeit von Ramaswamy *et al.* ¹⁴⁰ gezeigt werden, in der eine FOXO-Mutante, bei der die DNA-Bindedomäne entfernt worden war, dennoch die Expression bestimmter Zielgene induzieren konnte. FOXO-TFs können mit einer Vielzahl anderer TFs, wie STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), PGC-1 α (*PPAR γ coactivator-1*), oder Hormonrezeptoren, wie dem PPAR γ - und dem Glukokortikoid-Rezeptor (GK-R) und anderen Proteinen interagieren und so die Aktivierung oder Hemmung vieler Zielgene beeinflussen ¹⁴⁰. Diese vielfältigen Interaktionen ermöglichen eine enorme Breite der Regulation von FOXO selber und dessen Zielgenen, abhängig vom Gewebe, sowie interner und externer Stimuli.

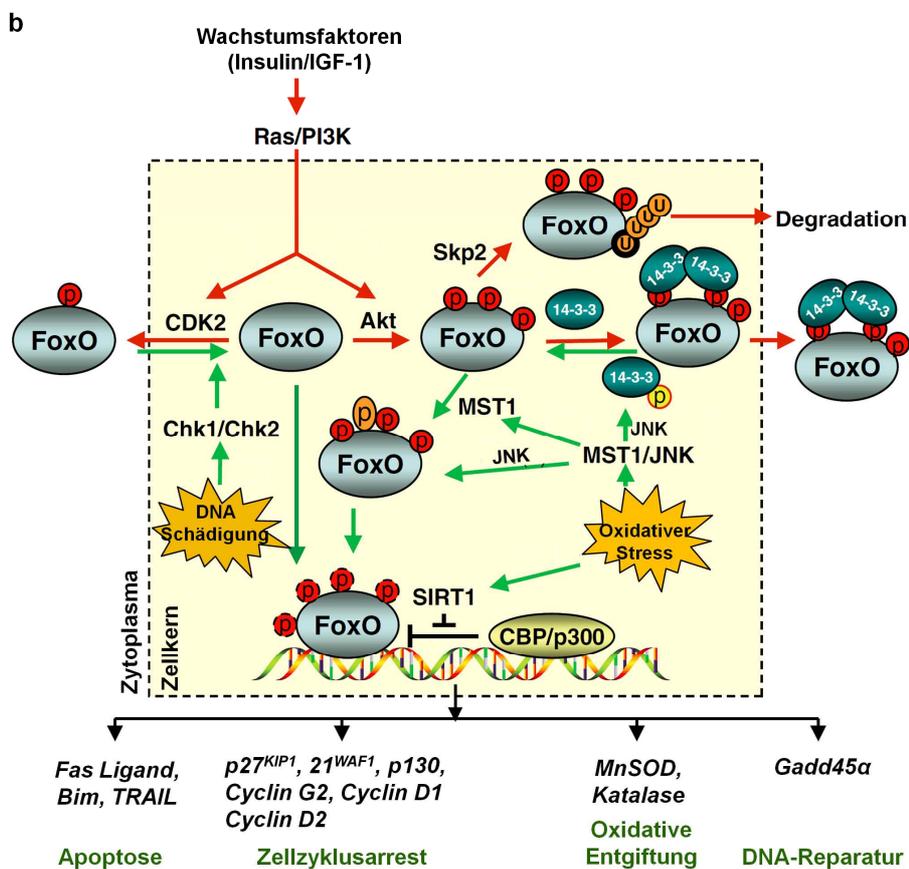
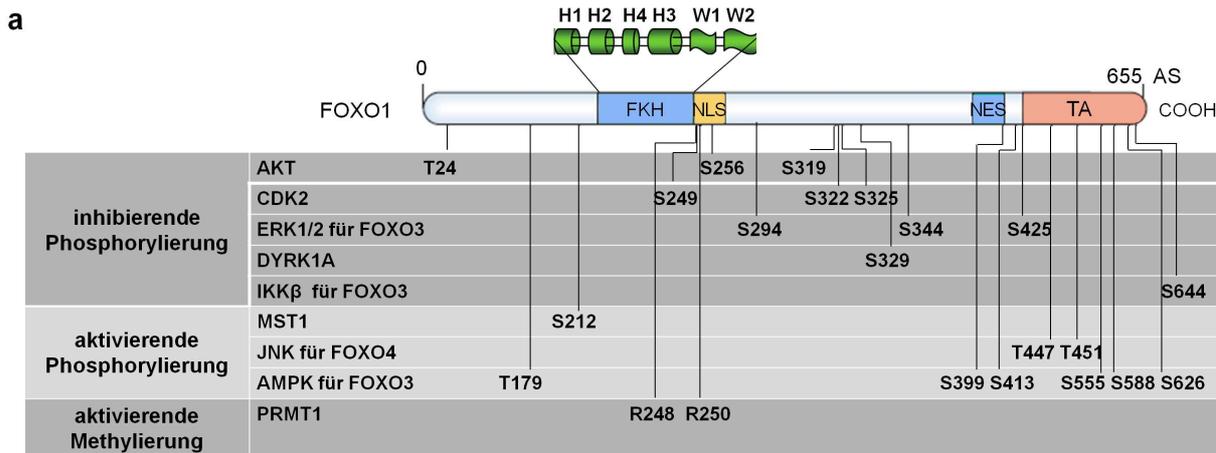


Abbildung 2.3: Struktur und Regulation von FOXO-Proteinen

a) Strukturelle Organisation von FOXO1 mit Forkhead-Domäne (FKH), welche 4 α -Helices (H1-4) und 2 winged-Loops (W1, W2) enthält, Kernlokalisationsmotiv (NLS), Kernexportmotiv (NES), Transaktivierungsdomäne (TA) und ausgewählte PTMs. Modifiziert nach Hedrick *et al.* Nat Rev Immunol. 2012¹⁴¹ und Huang *et al.* J Cell Sci, 2007¹⁴². b) Regulation von FOXO-Proteinen durch interne und externe Stimuli. Modifiziert nach Huang *et al.* J Cell Sci, 2007¹⁴².

AS, Aminosäuren; P, Phosphat; U, Ubiquitin; rote Pfeile bedeuten eine negative Regulation, grüne Pfeile bedeuten eine positive Regulation, Balken bedeuten einen hemmenden Effekt

Expression

FOXO1, 3 und 4 werden ubiquitär in Säugetieren exprimiert, wobei FOXO1 und 4 verstärkt im Fettgewebe und Skelettmuskel exprimiert werden. FOXO3 hingegen wird stark im Gehirn, dem Herz, der Niere und der Milz exprimiert. Lange wurde postuliert, dass *FoxO6*-mRNA nur im Gehirn exprimiert wird. Neuere Arbeiten beschreiben aber auch eine hepatische Expression von FOXO6 in Säugetieren ^{143 144}.

Die Deletion der einzelnen FOXO-Isoformen in Mäusen konnte überlagernde, sowie auch Isoform-spezifische Funktionen der FOXO1, 3 und 4 Proteine aufzeigen. Mäuse, die einen homozygoten Knockout für FOXO1 tragen, sterben bereits im embryonalen Stadium, u.a. aufgrund eines Defektes der Blutgefäßentwicklung ^{145 146}. Heterozygote Mäuse hingegen sind lebensfähig. In Mäusen, die eine Insulinrezeptormutation tragen, reduziert die Heteroinsuffizienz von *FoxO1* sogar den prädiabetischen Phänotyp. Ein hier zu Grunde liegender Mechanismus ist die Erhöhung der Insulinsensitivität der Leber und des Fettgewebe durch die Heteroinsuffizienz ¹⁴⁷. Ein Knockout von FOXO3 führt im Alter zu einer Infertilitätsentwicklung ¹⁴⁸. Mäuse mit einem Knockout in FOXO4 zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp ¹⁴⁵. Eine FOXO6-Knockout-Maus wurde bisher noch nicht charakterisiert. Eine induzierbare Triple (*FoxO1*^{+/-}, *3*^{-/-} und *4*^{-/-})-Knockout-Maus entwickelt u.a. lymphoproliferative Erkrankungen. Dieses weist auf die tumorsuppressiven Eigenschaften des FOXO-TFs hin ¹⁴⁹.

Funktion

FOXO-Proteine wurden, wie bereits erwähnt, in humanen Tumoren entdeckt ¹³⁷. Dies spricht für eine wichtige Rolle der FOXO-TFs in der Zellzykluskontrolle, Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle. In der Tat sind FOXO-Proteine wichtige Komponenten hoch konservierter Signalwege, die Zellwachstum und Stresssignale verbinden.

Als nachgeschaltetes Signalmolekül des PI3K/AKT-Überlebenssignalweges wird FOXO über eine Phosphorylierung an Thr24, Ser256 und Ser319 durch AKT gehemmt. FOXO6 fehlt die letztgenannte AKT-Phosphorylierungsstelle. Wahrscheinlich bleibt es auch deshalb hauptsächlich nukleär lokalisiert. Dennoch führt die Phosphorylierung durch AKT an den weiteren Stellen zu einer Hemmung der transkriptionellen Aktivität ^{150 151}. FOXO induziert die Expression einer Vielzahl pro-apoptischer Proteine, wie FasL (Fas Ligand) oder TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis-inducing ligand*), BIM, Bnip3 (*BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*), PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) oder BCL-6, den transkriptionellen Repressor von

BCL-XL^{142 152 153} (vgl. 2.4.). Die AKT-abhängige Hemmung von FOXO schützt somit die Zellen vor dem Zelltod. So führt in Neuronen die Expression einer FOXO3-Mutante, die gegenüber den AKT-abhängigen Phosphorylierungen resistent ist, zur nukleären Akkumulation und Aktivierung von FOXO3 und damit zur Apoptose¹⁵⁴.

FOXO-Proteine sind für den Zellzyklus stark relevant, da sie die Transkription der CDKIs (*Cycline-dependent kinase inhibitor*) des G1/S Übergangs, wie p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} und das Pocket-Protein p130RB2¹⁵⁵ induzieren¹⁵⁶. Die Expression der positiven Regulatoren des Zellzyklus, wie Cyclin D1 und D2, werden durch FOXO reprimiert. Außerdem induzieren FOXOs die Expression von Gadd45 α und Cyclin G2, die den Zellzyklusarrest in G2/M bewirken¹⁵⁶. Über die Induktion von Gadd45 α , und somit von DNA-Reparaturmechanismen, wird zusätzlich die Resistenz der Zelle gegenüber Stress unterstützt¹⁵⁷.

FOXO-Proteine induzieren also den Zellzyklusarrest und die zelluläre Ruhephase (Quiescence). Bei Insulinabwesenheit wird die Zelle - durch FOXO unterstützt - in die Ruhephase geleitet und kann dadurch überleben.

Der TF vermittelt weiterhin die Expression von Genen, die für den Glukose- sowie auch Lipidmetabolismus relevant sind. Zum einen erhöhen FOXOs in der Leber über die Induktion der IRS2 Expression die Insulinsensitivität, was die Glukoseverfügbarkeit der Zellen unterstützt. Wird FOXO durch die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren/ inaktivem Insulinsignalweg aktiviert, wird die Liponeogenese gehemmt. Dies geschieht u.a. durch die Unterdrückung der Expression von SREBP-1c (*sterol-response element-binding protein-1c*), einem globalen Regulator der Transkription liponeogener Gene, und der Fettsäure-Synthase^{158 61}. Über Bindung von C/EBP α (*CCAAT/ enhancer-binding protein alpha*) und PGC-1 α induziert FOXO die Expression glukoneogener Enzyme, wie PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase)¹⁴⁰ oder Glukose-6-Phosphatase^{158 159}. Auf diese Weise unterstützt der TF die Adaptation der Zelle an Hungersituationen.

Es ist bekannt, dass kalorische Restriktion zu einer verlängerten Lebensdauer in *C.elegans* führt. Eine der derzeitigen Theorien sieht den Grund in der Reduktion von ROS, das bei der Atmungskette entsteht. Bei der Entgiftung von ROS spielen das *silencing information regulator* Gen *sir2* in Hefe (Homolog zu *Sirt1* in Säugetierzellen) und FOXO eine Rolle. Es ist möglich, dass SIRT1 die Funktion von FOXO von der Apoptose hin zur Stressabwehr umlenkt¹⁵⁶. Aktives FOXO bindet an Promotoren, die für Gene der Stressresistenz kodieren. Die beiden Radikalfänger MnSOD und Katalase sind solche Zielgene und spielen eine essentielle Rolle in der oxidativen Entgiftung in

Säugetierzellen ¹⁴². In *Drosophila* hat die Aktivierung von FOXO durch die Stresskinase JNK (*cJun-N-terminal kinase*) ¹⁶⁰, in *C.elegans* die Aktivierung durch AMPK (*AMP-activated kinase*) ¹⁶¹ eine lebensverlängernde Wirkung. Desweiteren ist im Zusammenhang mit Langlebigkeit auch die Rolle von FOXO als Zellzyklusregulator und Tumorsuppressor relevant ¹⁵⁶.

Regulation: Posttranskriptionelle Modifikationen (PTM)

Die transkriptionelle Regulation der FOXO-TFs ist im Vergleich zur posttranskriptionellen Regulation noch nicht sehr gut untersucht. Lutz *et al.* konnten 2007 zeigen, dass der für die Zellzyklusregulation relevante TF E2F1 ein direkter Modulator der FOXO1 und FOXO3 Expression ist ¹⁶² ¹⁶². Über FOXO-Bindeelemente im Promotor findet zudem eine Transaktivierung von *FoxO1* und 3 statt ¹⁶³. STAT3 wurde kürzlich außerdem als Induktor der *FoxO1*- und 3-Transkription über eine direkte Promotorbindung beschrieben ¹⁶⁴. PDGF (*Platelet-derived growth factor*) und FGF (*fibroblast growth factor*) unterdrücken die Expression von FOXO1, 3 und 4 ¹⁶³. Interessanterweise wurde FOXO3 auch als direktes Target des Tumorsuppressors p53 beschrieben und spielt dadurch eine Rolle in der p53-vermittelten Apoptose ¹⁶⁵.

FOXO-Proteine werden durch verschiedene posttranskriptionelle Modifikationen (PTM), wie Phosphorylierung und Acetylierung, Ubiquitinierung, aber auch Methylierung und Glykosylierung dynamisch reguliert.

Der nukleo-zytoplasmatische Transport ist ein wesentlicher Mechanismus, der durch PTMs beeinflusst wird. Die Art der PTM und/oder die Bindung an Kofaktoren und andere Proteine können die molekulare HWZ des TFs, sowie dessen DNA-Bindungseigenschaften beeinflussen. Dies wirkt sich wiederum auf die Induzierung spezifischer Zielgene aus ¹⁶⁶.

Eine Vielzahl an Enzymen wurde bisher identifiziert, welche FOXO-TFs an unterschiedlichen Seiten phosphorylieren. Eine dominierende Rolle spielt die PTM durch AKT. AKT phosphoryliert FOXO1 an Thr24, Ser256 und Ser319. Diese Phosphorylierung führt zu einer Relokalisierung von FOXO ins Zytosol ¹⁵⁴. Die Phosphorylierung von FOXO an Thr24 ist für die Bindung an 14-3-3-Chaperon im Zellkern notwendig. Diese Bindung verursacht durch Konformitätsveränderung des FOXO-Proteins zum einen die Freilegung der leucinreichen NES ¹⁶⁷ und zum anderen eine reduzierte Flexibilität der NLS ¹⁶⁸. So wird der CRM1/Exportin1-abhängige nukleäre Export über 14-3-3-Bindung verstärkt und der nukleäre Import reduziert. Die

Phosphorylierung an Ser256 und Bindung an 14-3-3 ermöglicht FOXO die Interaktion mit der spezifischen Ubiquitin E3 Ligase SKP2. Diese markiert FOXO durch Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau ¹⁶⁹. Die Dephosphorylierung von Thr24 und Ser256 über die Phosphatase PP2A führt zu einer Dissoziation FOXOs von 14-3-3 ¹⁷⁰.

Die Degradation von FOXO erfolgt also durch Polyubiquitinierung über den Ubiquitin-Proteasom-Weg. Hier spielt neben SKP2 auch MDM2, eine E3-Ligase und downstream-Effektorprotein von p53, eine große Rolle. Phosphorylierung durch ERK verstärkt diesen MDM2-abhängigen Abbauweg ¹⁶⁶. MDM2 kann aber auch über Monoubiquitinierung nur die transkriptionelle Aktivität von FOXO beeinflussen ¹⁷¹. FOXO wird außerdem auch AKT unabhängig inhibiert. IkkappaB Kinase (IKK), der zentrale Regulator von NfkappaB, hemmt zum Beispiel FOXO AKT-unabhängig. So führt die Hemmung von IKK zu erhöhten FOXO-Proteinmengen, welche im Zellkern die Expression von TRAIL aktivieren ¹⁶⁶. CDK2 vermittelte Phosphorylierung von FOXO1 führt zudem zu einer zytosolischen Translokation des TFs. CDK2 ist in der S-Phase des Zellzyklus aktiv und wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Dieser AKT und 14-3-3 unabhängige Mechanismus über CDK2 wird durch DNA-Schädigung über Aktivierung der Checkpoint-Kinasen CHK1 und CHK2 aufgehoben ¹⁴² (Abb. 2.3b). Weitere Kinasen, die zu einer zytosolischen Lokalisation von FOXO führen, sind die CK1 (*caseine kinase 1*) oder die DYRK1 (*dual-specificity tyrosine-(Y) phosphorylation-regulated kinase1*) ¹⁵².

Einige Kinasen fördern die transkriptionelle Aktivität von FOXO1, indem sie die nukleäre Translokation unterstützen. Die Aktivierung von JNK durch Palmitat führt zu einer Phosphorylierung von FOXO1 im Kern und korreliert mit Apoptose ¹⁷². Oxidativer Stress führt zu einer Phosphorylierung durch MST-1 (*mammalian Ste20-like kinase1*). Dies hat die Dissoziation des Transkriptionsfaktors von 14-3-3 zur Folge und führt somit zu einer JNK-unabhängigen nukleären Translokation und pro-apoptotischen Aktivität von FOXO ¹⁷³. Oxidativer Stress ist im Zusammenhang mit FOXO insbesondere auch mit einem höheren Acetylungsgrad des Transkriptionsfaktors verbunden. Einige Deacetylasen und Acetylasen, welche FOXO modifizieren und somit dessen DNA-Bindeeigenschaften, Stabilität und Interaktion mit anderen Proteinen verändern, wurden identifiziert. Sirtuine, NAD-abhängige Histondeacetylasen (HDACs), die mit Langlebigkeit assoziiert werden, deacetylieren FOXO ¹⁶⁶. Deacetylierung durch den NAD⁺-Sensor SIRT1 unterstützt den FOXO-abhängigen Zellzyklusarrest, verhindert aber die FOXO-abhängige Apoptose ¹⁶⁶ und beeinflusst außerdem das Pendeln zwischen Kern

und Zytosol. Die ROS-induzierte Deacetylierung durch SIRT2 hingegen verstärkt die Expression der FOXO-Zielgene MnSOD, p27 und BIM ¹⁷⁴. Die Histon-Acetyltransferase (HAT) p300/CBP acetyliert FOXO, was zu einer Verminderung der transkriptionellen Aktivität führt ¹⁶⁶. Acetylierung von FOXO erleichtert die AKT-abhängige Phosphorylierung von FOXO ¹⁷⁵. So befindet sich FOXO, welches Mutationen enthält, die eine Acetylierung imitieren, überwiegend im Zytosol ¹⁷⁶. Bisher ist allerdings nicht eindeutig geklärt, welche Auswirkungen Acetylierungen wirklich auf die Aktivität und Stabilität von FOXO haben.

Bei oxidativem Stress wird außerdem PRMT1 (*Protein arginine N-methyltransferase1*) aktiviert, welche durch eine Arginin-Methylierung von FOXO direkt die AKT-vermittelte Ser256-Phosphorylierung blockiert. Dies führt zu nukleärer Translokation von FOXO und über eine vermehrte BIM-Expression zur Apoptose ¹⁷⁷.

Die transkriptionelle Aktivität von FOXO wird somit vielfältig reguliert, sodass sie in den Zellen, je nach Stimulus und bedingt durch endogene und exogene Einflüsse, variiert (Abb. 2.3b).

2.3.5. FOXO1 in der pankreatischen Betazelle

In der Betazelle spielt der TF FOXO1 eine herausragende Rolle. Besonders die Balance der FOXO1-Aktivität ist für die Funktion und das Überleben der Betazelle wichtig. Ein betazellspezifischer Transkriptionsfaktor, der durch FOXO1 reguliert wird, ist PDX-1 (*Pancreatic and Duodenal homeobox factor-1*). PDX-1 ist entscheidend für die Entwicklung des endokrinen Pankreas und die Erhaltung der Betazellfunktion des Erwachsenen ¹⁷⁸. PDX-1 reguliert die Expression wichtiger Betazellgene, wie Insulin, GLUT2 oder Glukokinase ¹⁷⁸. Betazellspezifischer Verlust von PDX-1 führt zum Verlust des Betazell-Phänotyps und ist mit Altersdiabetes assoziiert ¹⁷⁹. Wird FOXO1 aktiviert, führt dies zu einer verminderten Expression von PDX-1 und verringert dessen DNA-Bindungsaffinität. Die nukleäre und zytosolische Lokalisation von FOXO1 und PDX-1 ist gegensätzlich ¹⁷⁹. So führt eine Aktivierung von SIRT1 durch oxidativen Stress zu einer nukleären FOXO1-Lokalisation, was den Ausschluss von PDX-1 aus dem Zellkern zur Folge hat ¹⁵⁸. Die Wiederherstellung der Betazellfunktion durch Haploinsuffizienz von FOXO1 in der IRS2-Knockout-Maus kann durch erhöhte PDX-1 Level erklärt werden ¹⁷⁹. Aktives FOXO1 scheint auch bei FFA-induziertem Stress, sowie ER-Stress, als entscheidender Mediator am Zelluntergang in murinen Betazellen beteiligt zu sein. Dies wurde durch Transfektion von Betazellen mit dominant-negativem FOXO1, welche die

stressinduzierte Apoptose hemmte, belegt ¹⁷². Dieser FFA-Effekt könnte von PKCdelta vermittelt werden. Mäuse, die eine Kinase-inaktive PKCdelta betazellspezifisch überexprimieren, sind vor Hochfettdiät (HFD)-induzierter Apoptose geschützt. Gleichzeitig ist die durch Fettsäuren induzierte Akkumulation von FOXO1 im Zellkern gehemmt ¹⁸⁰. Nukleäres FOXO1 scheint aber nicht per se apoptotisch zu sein. So ist in INS-1E-Zellen, die PKCdelta überexprimieren, FOXO1 permanent im Kern lokalisiert. Diese Zellen weisen aber im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen keine erhöhte basale Apoptose auf (Gerst F, nicht veröffentlichte Daten). Dies könnte darauf hinweisen, dass FOXO1 ohne zusätzliches Stresssignal in Zellen schützende Effekte aufweist. So induziert FOXO1, welches durch oxidativen Stress aktiviert wurde, die Expression zweier wichtiger Insulingen-Transkriptionsfaktoren, MafA und NeuroD ¹⁸¹. Außerdem scheint von SIRT1 deacetyliertes FOXO1 die Expression von antioxidativ wirkenden Proteinen zu stimulieren ¹⁵⁸. Kitamura *et al.* diskutierten, dass der Zeitpunkt der FOXO1-Aktivierung ein entscheidender Faktor zur terminalen Ausdifferenzierung des endokrinen Zelltyps ist ^{182 183}. Talchai *et al.* belegten, dass ein betazellspezifischer Knockdown von FOXO1 in Mäusen zu einer Betazelldedifferenzierung führt. Die genannten Autoren postulieren, dass FOXO1 wesentlich für die Erhaltung der Betazellidentität ist ¹⁸⁴.

Aufgrund der differenziellen Regulation von Genen, die einerseits für die Apoptose und Zellzyklushemmung, andererseits aber für die Differenzierung und DNA-Reparatur relevant sind oder antioxidativ wirken, ist die Balance der FOXO1-Aktivität in der Betazelle entscheidend für deren Funktion und Überleben. Somit hat FOXO1 einen starken Einfluss auf die Entstehung von Betazelldysfunktion und die Entwicklung damit verbundener Krankheiten, wie Diabetes mellitus.

2.4. Apoptose und Betazelluntergang im T2DM

Ein entscheidender Faktor bei der Entstehung des durch Übergewicht hervorgerufenen Diabetes mellitus ist, wenn die Betazelle den erhöhten Bedarf an Insulin nicht mehr decken kann (vgl. 2.1.2.). Zahlreichen Untersuchungen zeigen, dass eine ungenügende Sekretion mit einer Reduktion der Betazellmasse einhergeht ^{185 186}. Das Adipositas-assoziierte Milieu, bestehend aus erhöhten FFAs, Zytokinen und Hyperglykämie, bedingt apoptotischen Zelltod ^{187 188 189} und damit die reduzierte Betazellmasse. Studien an *post*

mortem und operativ entnommenen humanen Pankreata zeigten eine um 63% reduzierte Gewebemasse in übergewichtigen Typ 2 diabetischen Patienten und eine 41%ige Reduktion in normalgewichtigen Typ 2 diabetischen Patienten im Vergleich zu normalgewichtigen gesunden Patienten ¹⁸⁵.

Grundsätzlich unterscheidet man beim Zelluntergang zwischen Nekrose und Apoptose. Die Nekrose definiert den pathologischen, mit einer Entzündung einhergehenden Prozess, während unter Apoptose der kontrollierte, physiologische selbstprogrammierte Zelluntergang zu verstehen ist. In der Initiationsphase der Apoptose unterscheidet man zwischen dem extrinsischen, rezeptorabhängigen, und dem intrinsischen Weg, der über die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien initiiert wird. Beim extrinsischen Weg führt die Bindung von Liganden, wie u.a. TNFalpha oder Zytokinen, an den TNF-Rezeptor oder TRAIL- und Fas-Rezeptor (Todesrezeptoren) zur Aktivierung des apoptotischen Signalweges. Beide Wege enden in der Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Caspasen sind Cystein-haltige Aspartatproteasen, die proteolytisch aktiviert werden und zelluläre Proteine spalten. Beim intrinsischen Weg spielt die Familie der BCL-2 (*B-cell-leukemia-2 Homology (BH)-3-only*-Proteinen eine große Rolle. Diese Familie umfasst anti-apoptotisch (BCL-2), sowie pro-apoptotisch (BAX, BIM, BAD) wirkende Mitglieder ¹⁹⁰. Abhängig vom Verhältnis und Aktivierungsgrad dieser Proteine, kommt es zum Zelltod oder Überleben der Zelle. Hohe Konzentrationen des anti-apoptotischen BCL2 und BCL-Xl führen zu einer Heterodimerisierung mit dem pro-apoptotischen BAX in der Mitochondrienmembran, welches eine Aktivierung der Apoptose verhindert. BAD ist ein pro-apoptotisches Mitglied der Familie, welches mit BCL-2 und BCL-XL interagieren kann und dadurch deren Heterodimerisierung mit BAX verhindert. Freies BAX bildet über Oligomerisierung eine Pore, die die Freisetzung des intermembranären Inhalts der Mitochondrien, wie Cytochrom C und Caspasen, ermöglicht. Abhängig vom Stimulus, werden unterschiedliche pro-apoptotische BCL Proteine aktiviert. NOXA und PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) werden zum Beispiel nach DNA-Schäden p53-abhängig hochreguliert ¹⁹¹, während BIM und BMF durch Zerstörung des Zytoskeletts frei werden^{192 193}.

Beide Signalwege führen zur Aktivierung von Initiator-Caspasen, wie Caspase8 oder 9, welche wiederum die Effektor-Caspasen wie Caspase3 aktivieren. Diese spalten spezifische zelluläre Proteine, wie Strukturproteine oder PARP (*Poly (ADP-ribose) polymerase*) und führen darüberhinaus auch zu einer Fragmentierung der DNA.

Eine Quervernetzung der Signalwege verläuft über Spaltung des BCL-Proteins BID in tBid durch extrinsisch aktivierte Caspase8. tBid führt zur Aktivierung des intrinsischen Signalweges ¹⁹⁴.

Aktivierter Insulin/PI3K-Signalweg führt über AKT zu einer Phosphorylierung und somit Inaktivierung des pro-apoptischen BAD. Im phosphorylierten Zustand bleibt Bad an 14-3-3 Proteinen gebunden. Auch die hemmende Phosphorylierung der Procaspase9 durch AKT wirkt anti-apoptotisch. Wachstumsfaktoren wirken auch über die Aktivierung von ERK anti-apoptotisch. ERK-abhängige Phosphorylierung des pro-apoptischen BIM führt zu dessen proteasomalen Abbau ¹⁹⁵.

Ein alternativer Weg, der zur Apoptose führt, ist ER-Stress. Hier stellt CHOP (*GADD153, CAAT/enhancer binding protein homologous transcription*), welches dabei induziert wird, einen wichtigen Mediator dar ¹⁹⁶.

Unter diabetischen Bedingungen wird in der Betazelle multifaktoriell Apoptose ausgelöst. Betazellen scheinen verhältnismäßig geringe Konzentrationen an antioxidativ wirkenden Enzymen zu synthetisieren ¹⁹⁷. So sind sie besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress, der u.a. durch eine hohe glykolytische Aktivität während einer bestehend Hyperglykämie, verursacht wird. ER-Stress, der vermutlich durch eine erhöhte Insulinproteinbiosynthese verursacht wird, trägt entscheidend zur Apoptose bei ¹⁹⁵. In der Tat kann die Palmitat-induzierte Apoptose durch Hemmung des ER-Stress aufgehoben werden ¹⁹⁸. Eine Exposition mit pro-inflammatorischen Zytokinen, die aufgrund einer subklinischen Inflammation, vermehrt im Blut diabetischer Patienten vorkommen, kann außerdem zur Apoptose der Betazelle beitragen. Hier ist zu erwähnen, dass nur die Kombination unterschiedlicher Zytokine, wie Interferon gamma, TNFalpha und Interleukin1 beta zum Zelltod führen ¹⁹⁹. Allgemein scheint erst die gleichzeitige Aktivierung unterschiedlicher Signalwege Apoptose in der Betazelle auszulösen.

2.5. Glukokortikoide

Glukokortikoide (GK) gehören zur Klasse der Steroidhormone und werden in der Nebennierenrinde hergestellt. Als Abkömmlinge des Progesterons werden im Menschen physiologisch ca. 95% Kortisol und 5% Kortikosteron hergestellt. Im Nagetier, wie der Maus oder Ratte, hingegen überwiegt die Produktion von Kortikosteron ^{200 201}. GKs

werden für negative Feedback-Mechanismen im überaktiven Immunsystem benötigt, wie beispielsweise bei Allergien, Asthma und Autoimmunerkrankungen. Glukokortikoide regulieren hauptsächlich die Immunfunktion, aber auch den Salz- und Wasserhaushalt und den Blutdruck. Sie spielen weiterhin in der Regulation des Stoffwechsels, besonders in Stresssituationen, zur Bereitstellung von Substraten für den oxidativen Metabolismus eine Rolle.

Kortisoldefizienz ist gekennzeichnet durch posturale Hypotension, Gewichtsverlust und Hypoglykämien. Kortisolüberschuss wird von Hypertension, zentralem Übergewicht und Glukoseintoleranz begleitet. Somit hat Kortisol eine gegensätzliche Wirkung zu Insulin und fördert eine Insulinresistenz ²⁰². Das klinische Syndrom einer Unterversorgung von Kortisol ist die Addison-Krankheit (Hypopituitarismus), das klinische Syndrom der Überversorgung hingegen ist das Cushing-Syndrom ²⁰².

Das in der klinischen Therapie häufig verwendete synthetische Dexamethason (9-Fluor-16 α -methylprednisolon) (Dexa) ist ein langwirkendes Glukokortikoid, welches ca. 30fach stärker wirkt als die körpereigenen GKs und keine mineralkortikoide Wirkung hat. In der klinischen Therapie werden GKs zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und als antiinflammatorische Therapie zum Beispiel bei Asthma, Dermatitis, Rheumatoider Arthritis oder zur Verhinderung einer Transplantatabstoßung eingesetzt.

Bei Langzeitbehandlung mit hohen Dosen von Glukokortikoiden ist die Entwicklung eines Steroiddiabetes eine häufige Nebenwirkung ²⁰³. In der Regel ist der Steroiddiabetes reversibel und verschwindet wieder mit Absetzen der Medikamente ²⁰⁴. Zur Entwicklung des Steroiddiabetes sowie der peripheren Insulinresistenz tragen die stimulierende Wirkung von GKs auf die hepatische Glukoneogenese und Lipolyse ^{205 206 207} bei. Ein Mechanismus ist hier die Hemmung der Translokation von GLUT4-Transportern an die Membran im peripheren Muskel- und Fettgewebe ²⁰², was einen erhöhten Blutglukosespiegel zur Folge hat. Ein zusätzlicher Faktor ist die Verschlechterung der Betazellfunktion unter Glukokortikoideinfluss ²⁰⁸. Chronisch führt eine kompensatorische Erhöhung der Insulinsekretion bei jedoch gleichzeitiger Hemmung der Insulinbiosynthese zum relativen Insulinmangel ^{209 47 210 211 212 213}.

Da Mifepristone (RU486), ein spezifischer nukleärer Glukokortikoid-Rezeptor-Antagonist, die Dexa-induzierte Insulinsekretionshemmung vollständig aufhebt, ist diese auf eine glukokortikoidabhängige Genexpression zurückzuführen ^{212 47 48}.

GKs induzieren die Expression der SGK1 in Insulin-sezernierenden Zellen. Als Mechanismus für die durch Glukokortikoide ausgelöste Hemmung der Insulinsekretion wird die Aktivierung von K⁺-Kanälen diskutiert, die einerseits durch SGK1^{48 47} (vgl. 2.3.3.) und andererseits durch α 2-Adrenozeptor-Aktivierung⁴³ (vgl. 2.2.1.) ausgelöst wird. Zusätzlich hemmt Dexa die Expression Betazell-spezifischer Gene, wie GLUT2 und Glukokinase²¹⁴, sowie die Menge an GLUT2-Protein an der Plasmamembran der Betazelle²¹¹, was zusätzlich zu einer reduzierten Insulinsynthese und -sekretion beiträgt. Eine apoptotische Wirkung von Glukokortikoiden auf die Betazelle wurde außerdem nachgewiesen^{209 213}.

2.5.1. Die Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors

Der ubiquitär exprimierte Glukokortikoidrezeptor (GK-R) liegt im Zytosol in inaktiver Form gebunden an Begleitproteine, wie dem Hitzeschockprotein (HSP) 90 und dem Rezeptor-assoziierten Protein p59 (FKB52/59), vor. Nach Bindung des Liganden löst sich der Rezeptor von HSP90 und transloziert in den Zellkern, wo er homodimerisiert und an *Glucocorticoid response element* (GRE), eine palindromische Konsensus-Sequenz (5'-AGAACANNNTGTTCT-3'), in den Promotorregionen der Zielgene bindet^{215 216}. So wirkt der GK-R als nukleärer Transkriptionsfaktor. Es ist auch möglich, dass weitere Koaktivatoren an den Rezeptor binden oder der GK-R mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert, sodass die Transkription der Zielgene beeinflusst werden kann. Als transkriptioneller Repressor wirkt der GK-R, wenn er weitere Proteine, z.T. auch Targetproteine bindet. Über diesen Weg wird auch die immunsuppressive Wirkung des GK-Rs DNA-Bindedomänen-unabhängig gesteuert. Dies verläuft über die Hemmung der transkriptionellen Aktivität von AP-1, NfkappaB oder STAT-5^{217 218 219}. Nach Dissoziation des Hormons wird der Rezeptor mit Hilfe von Hitzeschockproteinen wieder recyclet²²⁰.

3. Zielstellung

Steroiddiabetes ist eine häufige Nebenwirkung der Langzeitbehandlung mit hohen Dosen von Glukokortikoiden. Die Betazelle ist hierbei nicht in der Lage die erhöhte hepatische Glukoneogenese und periphere Insulinresistenz durch eine ausreichende Insulinsekretion zu kompensieren. Neben der Hemmung der Insulinsekretion wirken Glukokortikoide auch pro-apoptotisch auf Betazellen. Publierte Studien geben Hinweise, dass eine Aktivierung des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors *forkhead box O1* (FOXO1) einen wesentlichen Teil zum Glukokortikoid-induzierten Betazelltod beitragen könnte. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass das synthetische Glukokortikoid Dexamethason die Aktivität von AKT reduziert, einem Signal, dass zu einer nukleären Akkumulation von FOXO1 führt und mit Apoptose assoziiert ist. Zudem wurde nach Dexa-Exzess eine massive Induktion der SGK1 (*serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1*), einer Kinase, die eine hohe Homologie in ihrer katalytischen Domäne zu der von AKT aufweist, festgestellt.

In vorliegender Arbeit sollte nun die Rolle von FOXO1 im Glukokortikoid-induzierten Betazelltod untersucht werden. Im Speziellen sollte die Phosphorylierung und die zytosolisch-nukleäre Verteilung von FOXO1 in Abhängigkeit von AKT- und SGK-Isoformen analysiert werden.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Geräteliste

AxioObserver Z1	Zeiss, Jena, Deutschland
Laser Scan Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany
Light Cycler 1.5	Roche, Mannheim, Deutschland
LC480	Roche, Mannheim, Deutschland
GeneQuant pro, Photometer	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Nucleofector® Device (Amaxa)	Lonza, Basel, Schweiz
Mini-PROTEAN Tetra vertical electrophoresis system	Biorad

4.1.2. Organismen

Wirtsbakterien

E. coli DH5α New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)

Versuchstiere

Für die Isolierung der Langerhans'schen-Inseln wurden Mäuse des Stammes C57Bl/6 (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) eines Alters zwischen 6 und 8 Monaten verwendet. Die Tiere wurden unter einem normalen 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten und mit einer Standarddiät, sowie Wasser ad libitum ernährt. Die Tiere wurden im Sinne des geltenden Tierschutzgesetzes und der Tierschutz-Versuchstier-Verordnung gehalten. Eine Anzeige zur Genehmigung der Verwendung der Tiere liegt vor.

Zelllinien

INS-1E Zelllinie ²²¹ ²²². Diese pankreatische Betazelllinie stammt aus einem Ratten-insulinom und zeichnet sich durch eine glukosestimulierte Insulinsekretion aus. Die Zelllinie wurde von Prof Dr. Claes Wollheim und Prof. Dr. Pierre Maechler aus Genf zur Verfügung gestellt.

4.1.3. Chemikalien und Substanzen

Alle Chemikalien und Substanzen wurden falls nicht abweichend angegeben von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) in analytischem Reinheitsgrad verwendet.

Weitere Materialien wurden, wie darauf hingewiesen, von folgenden Firmen bezogen.

Ambion, Darmstadt, Deutschland; AppliChem, Darmstadt, Deutschland; Biochrom, Berlin, Deutschland; BioRad Laboratories, München, Deutschland; Calbiochem, Darmstadt, Deutschland; Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich; Dharmacon, Chicago, USA; Santa Cruz, CA, USA; GE Healthcare/Amersham, Freiburg, Deutschland; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland; Lonza, Basel, Schweiz; PeproTech, Hamburg, Deutschland; PeqLab, Erlangen, Deutschland; Qiagen, Hilden, Deutschland; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland; Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland; SearchLC, Heidelberg, Deutschland; Serva, Heidelberg, Deutschland; Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA; Tocris Bioscience, Wiesbaden, Deutschland

Bradford-Reagenz	BioRad
BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder	Invitrogen
100bp Blue DNA Ladder	Bioron
Dapi (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol- dihydrochlorid)	Invitrogen
dNTPs 10 mmol/l	Invitrogen
Hyperfilm ECL	Amersham/GE Healthcare
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schüll
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Roche Diagnostics GmbH
TOPRO3	Invitrogen

Enzyme:

Kollagenase von <i>Cl. histolyticum</i>	Serva
Hot Taq DNA Polymerase	PeqLab

Zellkultur:

Albumin, Fraktion V	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
Hepes (1 mol/l)	Lonza

L-Glutamin (200 mmol/l in 0.85% NaCl)		Lonza
Na-Pyruvat (100 mmol/l)		Lonza
PBS (Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei)	154 mmol/l NaCl 5,5 mmol/l Na ₂ HPO ₄ 1 mmol/l KH ₂ PO ₄	Lonza
RPMI1640, ohne Glutamin, 11 mmol/l Glukose		Lonza
Trypsin/EDTA	500 mg/l Trypsin 200 mg/l EDTA	Lonza

Substanzen:**Tabelle 4.1 Verwendete Substanzen und deren Einsatz**

Substanz	Funktion	Einsatz	Bezugsquelle
Dexamethason	synthetisches Glukokortikoid	100 nmol/l	Sigma-Aldrich
IGF-1	Wachstumsfaktor	50 ng/ml	Pepto-Tech.
GSK650394	SGK1-Inhibitor	10 µmol/l	Tocris
PD98059	MEK1-Inhibitor	10 µmol/l	Calbiochem
Akti-1/2	AKT-Inhibitor	3 µmol/l	Calbiochem
RU486 (Mifrepistone)	Glukokortikoid Rezeptor-Inhibitor	10 µmol/l	Sigma-Aldrich

4.1.4. Kommerzielle Kits

AdvantageRT for PCR Kit	Clontech
Alkaline Phosphatase, shrimp	Roche
Cellline Nucleofector Kit T	Lonza
DharmaFect Transfection Reagent 3	Dharmacon
In-situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche
LC480 Probes Master	Roche
Light Cycler™ FastStart Master SYBR Green	Roche

Light Cycler™ -Primer Set for Murine/Rat <i>Gapdh</i>	SearchLC
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Fischer Scientific
PCR Mycoplasma Test Kit	AppliChem
Plasmid plus Mini-Kit	Qiagen
Protease Inhibitor cOmplete, EDTAfree	Roche
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen

4.1.5. siRNA

spezifische siRNA	Bezugsquelle
siAKT1 siGenome smart pool	Dharmacon Inc
siAKT2 siGenome smart pool	Dharmacon Inc
siAKT3 siGenome smart pool	Dharmacon Inc
siFoxO1 siGenome smart pool	Dharmacon Inc
siSGK1	Qiagen
siSGK3silencer select pre-designed	Ambion
siGLO RISC-Free Control siRNA	Dharmacon Inc

4.1.6. Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Bezugsquelle
hsgk1SD/pIRES2EGFP	dominant aktive Form von SGK1	beide Konstrukte wurden von Florian
hsgk1KN/pIRES2EGFP	dominant inactive Form von SGK1	Lang und Monica Palmada zur Verfügung gestellt

4.1.7. Primersequenzen

Der Ablauf des Primerdesigns ist in Kapitel 4.2.2.6. beschrieben. Die Oligonukleotide wurden von Invitrogen synthetisiert.

Tabelle 4.2 Verwendete Primer für INS-1E Zellen, *Rattus norvegicus*

Primer Name	Primer Sequenz
<i>Akt1</i> forward	5'-ACT CAT TCC AGA CCC ACG AC-3'
<i>Akt1</i> reverse	5'-CCC GAA GTC CGT TAT CTT GA-3'
<i>Akt2</i> forward	5'-CTC CTA CTC AGC CAG CAT CC-3'
<i>Akt2</i> reverse	5'-TCA CTC TCC ATC CTC CCA AC-3'
<i>Akt3</i> forward	5'-CCG TTT GTG TTT TGT GAT GG-3'
<i>Akt3</i> reverse	5'-AAG AGC CCT GAA AGC AAT GA-3'
<i>pan-Bim</i> forward	5'- AAG GCA GTC TCA GGA GGA ACC-3'
<i>pan-Bim</i> reverse	5'- TCT TCC GCC TCT CGG TAA TC -3'
<i>FoxO1</i> forward	5'-CAT CAT TCG GAA CGA CCT CAT-3'
<i>FoxO1</i> reverse	5'-GGT GAA GGG CAT CTT TGG ACT-3'
<i>FoxO3</i> forward	5'-CCC AAC CAG CTC CTT TAA CA-3'
<i>FoxO3</i> reverse	5'-TTT GCA TAG ACT GGC TGA CG-3'
<i>FoxO4</i> forward	5'-AGC AGT CCT TGT CCT CGA AA-3'
<i>FoxO4</i> reverse	5'-ACC CTT CTC CTG CTG ACA AA-3'
<i>Pdx1</i> forward	5'- CGG ACA TCT CCC CAT ACG AA -3'
<i>Pdx1</i> reverse	5'- GCC CGA GTG TAG GCT GTA CG -3'
<i>Sgk1</i> forward	5'- AAT GGC GGA GAG CTG TTC TA -3'
<i>Sgk1</i> reverse	5'- TGT GCT CGA TGT TCT CCT TG -3'
<i>Sgk2</i> forward	5'-AGG GAG AGG GGA GAA TGT GG-3'

<i>Sgk2</i> reverse	5'-GAC ACC ACC CAC AGA GCA ATG-3'
<i>pan-Sgk3</i> forward	5'-GAA ACG GTG CCC TAT TCT GTG T-3'
<i>pan-Sgk3</i> reverse	5'-GAA GGA GGG GCG TAA GAA AAA-3'

Tabelle 4.3 Verwendete Primer für Mauseinseln, *Mus musculus*:

Primer name	Primer Sequenz
<i>Bim</i> forward	5'-GGA GAC GAG TTC AAC GAA ACT T -3'
<i>Bim</i> reverse	5'-AAC AGT TGT AAG ATA ACC ATT TGA GG -3'
<i>FoxO1</i> forward	5'-CTT CAA GGA TAA GGG CGA CA -3'
<i>FoxO1</i> reverse	5'-GAC AGA TTG TGG CGA ATT GA -3'
<i>FoxO3</i> forward	5'-GCT AAG CAG GCC TCA TCT CA-3'
<i>FoxO3</i> reverse	5'- TTC CGT CAG TTT GAG GGT CT-3'
<i>Pdx1</i> forward	5'-GAA ATC CAC CAA AGC TCA CG -3'
<i>Pdx1</i> reverse	5'-CGG GTT CCG CTG TGT AAG -3'
<i>Rps13</i> forward	5'-TGC TCC CAC CTA ATT GGA AA-3'
<i>Rps13</i> reverse	5'-CTT GTG CAC ACA ACA GCA TTT-3'

4.1.8. Antikörper

Tabelle 4.4 Liste der primären Antikörper, die für Westernblot-Analysen und immunfluoreszente Anfärbung von Proteinen verwendet wurden

primärer Antikörper	Referenz- nummer	eingesetzte Verdünnung	Bezugsquelle
pan-AKT	#9272	1:1000	Cell Signaling
AKT1	#2967	1:1000	Cell Signaling
P-AKT (Ser473)	#9271	1:1000	Cell Signaling
Cleaved-Caspase3 (Asp175)	#9669	1:50	Cell Signaling
Alexa Fluor 488 conjugate			
ERK-1/2 (p44/p42)	#9102	1:1000	Cell Signaling
P-ERK-1/2 (Thr202/Tyr204)	#9101	1:1000	Cell Signaling
FOXO1 (WB und IHC)	#2880	1:1000 (WB) 1:100 (IHC)	Cell Signaling
P- FOXO1 (Ser256,)	#9461	1:1000	Cell Signaling
P- FOXO1 (Ser319)	#sc-101682	1:700	Santa Cruz
GAPDH-HRP	#sc20357-HRP	1:2000	Santa Cruz
P-GSK3 α/β (Ser21/9)	#9331	1:1000	Cell Signaling
Histon H1	# sc10806	1:1000	Santa Cruz
P-NDRG1 (Thr346)	#3217	1:1000	Cell Signaling
PARP	#9542	1:1000	Cell Signaling
SGK1	#3272	1:1000	Cell Signaling
SGK1 für Immunostaining		1:100	Pineda
alpha/beta-Tubulin	#2148	1:1000	Cell Signaling

Tabelle 4.5 Liste der sekundären Antikörper, die für Westernblot-Analysen und immunfluoreszente Anfärbung von Proteinen verwendet wurden

sekundärer Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Bezugsquelle
Esel- anti-Kaninchen IgG, HRP konjugiert	1:2000	Amersham BS
Ziege-anti-Maus, HRP konjugiert	1:5000	
Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen IgG (FITC)	1:400	Invitrogen
Alexa Fluor 546 anti-Kaninchen IgG (TRITC)	1:400	Invitrogen

4.1.9. Lösungen, Puffer und Medien

ECL Lösung:

Lösung A (Stammlösung)	0,1 mol/l Tris-HCl pH 8,6	200 ml
bei 4 °C lagern	Luminol	50 mg

Lösung B (Stammlösung)	DMSO	10 ml
bei RT dunkel lagern	para-Hydroxycumarinsäure	11 mg

1x ECL	Lösung A	1 ml
	Lösung B	100 µl
	30% H ₂ O ₂	0,3 µl

Hanks

NaCl	137 mmol/l
KCl	5 mmol/l
CaCl ₂	1,25 mmol/l
MgSO ₄	0,81 mmol/l
Na ₂ HPO ₄	1,2 mmol/l
KH ₂ PO ₄	0,44 mmol/l
NaHCO ₃	4 mmol/l
Hepes	10 mmol/l
Glukose	2,8 mmol/l
BSA	2,25 mg/ml
pH = 7,25 mit NaOH	

KCM

KCl	0,5 mol/l
CaCl ₂	0,15 mol/l
MgCl ₂	0,25 mol/l

<u>Krebs Ringer Puffer (KRB)</u>	Mixedlösung	20% (v/v)
frisch hergestellt (s. S.44)	NaCl/NaHCO ₃ -Lösung	16% (v/v)
	Hepes	10 mmol/l
	pH = 7,4 mit NaOH	

Mixedlösung (500 ml)

In 400 ml werden gelöst:	NaCl	17,7 g
	KCl	0,885 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,7315 g
	KH ₂ PO ₄ (136,1)	0,404 g

In 100 ml extra lösen, langsam zu den 400 ml geben:

	CaCl ₂	0,367 g
NaCl/NaHCO ₃ (500 ml)	NaCl	2,6735 g
	NaHCO ₃	1,3125 g

<u>Lämmli Puffer (5x)</u> (pH nicht mit HCl einstellen)	Glycerin	50% (v/v)
	Tris base	130 mmol/l, pH = 6,75
	SDS	3,46 mmol/l
	β-Mercaptoethanol	10% (v/v)
	Bromphenolblau	

<u>LB-Medium</u>	Trypton	1% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	1% (w/v)
	pH 7,2 (HCl)	

Antibiotikakonzentrationen:

Ampicillin	100 µg/ml
oder Kanamycin	50 µg/ml

Agarplatten + 1,5 % (w/v) Agar

<u>Lysepuffer</u>	NaCl	125 mmol/l
	Hepes, pH=7.3	25 mmol/l
	SDS	0,1% (w/v)
	C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄	0,5% (w/v) (Natriumdeoxycholat)
	Triton X-100	1% (v/v)
	EDTA	10 mmol/l
	Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O	10 mmol/l (Tetranatriumpyrophosphat)
	frisch dazu	
	NaF	10 mmol/l
	Na ₃ VO ₄	1 mmol/l
	PMSF	2 mmol/l
	Proteaseinhibitoren	1 Tablette/10 ml (Roche)

Mowiol

bei -20 °C lagern	Mowiol (Polyvinylalkohol)	5 g
	100 mmol/l Tris pH=8.0	20 ml
	16 h bei RT rühren	
	Glycerin	10 ml

<u>Ponceau Rot</u>	Ponceau S	0,1% (w/v)
	Essigsäure	5% (v/v)

<u>10x SDS Laufpuffer</u> (pH nicht mit HCl einstellen)	Tris	0,25 mol/l; pH 8,3
	Glycin	1,91 mol/l
	SDS	0,034 mol/l

<u>Stripping Puffer</u>	Tris	66 mmol/l
	SDS	2% (w/v)
	vor Verwendung 0,5% (v/v) β-Mercaptoethanol zufügen	

<u>10x TAE</u>	Tris	400 mmol/l
	Natriumacetat	50 mmol/l
	EDTA	10 mmol/l
	pH 8	
<u>TBS 10x</u>	Tris	50 mmol/l; pH=7,6
	NaCl	150 mmol/l
<u>1x TBS-T:</u>	TBS	1x
	Tween-200	1,5 % (v/v)
<u>1x TE</u>	Tris-HCl	10 mmol/l (pH=7,5)
	EDTA	0,1 mmol/l
<u>10x Transferpuffer</u>	Tris	0,93 mol/l
	Glycin	1,50 mol/l
<u>TSB LB-Medium</u>	PEG 3350	10 % (v/v)
	DMSO	5 % (v/v)
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM

4.2. Methoden

4.2.1. Arbeiten mit Zellen und zellbiologische Methoden

4.2.1.1. Zellkultur im Allgemeinen

INS-1E Zellen wurden in HEPES gepuffertem RPMI1640, welches mit 10% (v/v) FCS, 10 mmol/l HEPES, 2 mmol/l L-Glutamin, 1 mmol/l Na-Pyruvat und 10 µmol/l β-Mercaptoethanol versetzt wurde, kultiviert. Das Vollmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Zellen wurden einmal pro Woche gesplittet und jeweils 1-2 x 10⁶ Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen zur weiteren Kultivierung ausgelegt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Kulturbedingungen waren 37 °C bei 5% CO₂-Gehalt. Die Sekretionsleistung der INS-1E Zellen wurde regelmäßig getestet, so dass gewährleistet war, dass alle Versuche mit Glukose-sensitiven Zellen durchgeführt wurden (vgl. 4.2.1.3.). Außerdem wurden die Zellen regelmäßig auf eine mögliche Mykoplasmenkontamination hin untersucht. Hierfür wurden Zellen auf Poly-L-Ornithin beschichteten Glasplättchen ausgesät und nach 48 h Kultivierung fixiert (vgl. 4.2.1.5 und

4.2.1.6.). Nach Aufschluss mit Triton, wurden die Zellkerne 30 min mit Dapi (0,1 µg/ml in PBS) bei Dunkelheit gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen auf einem Objektträger mit Mowiol befestigt. Dapi interkaliert mit der DNA der Zellen und der möglicher Mykoplasmen. Um die angefärbte DNA möglicher Mykoplasmen sicher erkennen zu können, wurde am Fluoreszenzmikroskop ein Objektiv mit 100facher Vergrößerung gewählt. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein PCR-Test für Mykoplasmen nach Protokoll des Herstellers (AppliChem) durchgeführt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Trypsinisierung der Zellen

Das Medium wurde abgezogen und die Zellen mit 37 °C warmem PBS gewaschen um restliches FCS zu entfernen. Trypsin/EDTA wurde 1:4 mit warmem PBS verdünnt und auf die Zellen gegeben. Diese wurden dann für circa 3 Minuten im Inkubator inkubiert. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wurden die Zellen gelöst und die Zell/Trypsin-Suspension wurde zum Stoppen der Enzymreaktion in gleiches Volumen FCS-haltiges Zellkulturmedium überführt. Daraufhin wurden die Zellen für 4 min bei 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wieder in Kulturmedium resuspendiert.

4.2.1.2. Behandlung der Zellen

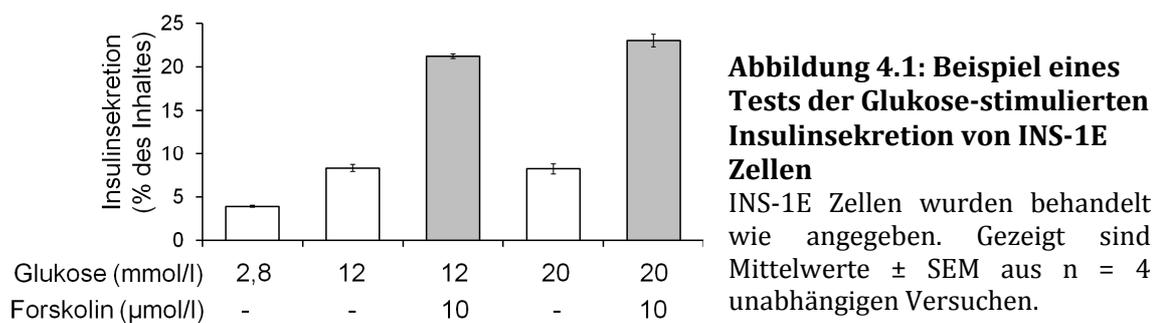
Für Experimente, bei denen Inhibitoren eingesetzt wurden, wurden die Zellen mit frisch hergestelltem KRB (Krebs-Ringer-Puffer) gewaschen und eine Stunde in diesem bei 37°C im Wasserbad inkubiert. KRB (in mmol/l: 140 NaCl, 5,6 KCl, 1,2 MgCl₂, 2,6 CaCl₂, 10 HEPES) ist eine Bikarbonat gepufferte Salzlösung (pH=7,4), welche mit 0,5% Albumin Fraktion V und 2,8 mmol/l Glukose supplementiert war. Nach der Vorinkubation wurde die Lösung gewechselt und die Zellen für die angegebene Zeit in Anwesenheit der Testsubstanzen inkubiert. Dexamethason war auch während der Vorinkubation im KRB enthalten.

Bei den Versuchen in Vollmedium wurden die Inhibitoren 30 min vor Beendigung der 24 stündigen Inkubation mit Dexamethason (100 nmol/l) direkt ins Medium pipettiert. Diese Inkubationen erfolgten im Inkubator. Für den TUNEL-Assay wurde eine zweistündige Inkubation mit dem pan-AKT-Inhibitor Akti-1/2 (3 µmol/l) durchgeführt. Alle Stimulanzien und Inhibitoren, außer IGF-1, wurden in DMSO gelöst (1000fach konzentriert). Die Kontrollzellen wurden ebenfalls mit der entsprechenden DMSO-

Menge versetzt. IGF-1 wurde in 0,1% BSA-haltigem PBS gelöst und 10 Minuten vor Ende der Inkubationszeit der Inhibitoren direkt ins Medium gegeben. Die eingesetzten Konzentrationen der Substanzen sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

4.2.1.3. Messung der Glukose-induzierten Insulinsekretion

Zur Funktionskontrolle der INS-1E Zellen wurden Insulinsekretionstests durchgeführt. In jedes Loch einer 24-Well-Platte wurden 2×10^5 Zellen ausgesät und zwei Tage in Kultur gehalten. Daraufhin wurden die Zellen mit KRB gewaschen und für 1h bei 37 °C im Wasserbad in KRB, versetzt mit 2,8 mmol/l Glukose und 0,5% Albumin, vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem KRB, mit niedriger (2, 8 mmol/l) und hoher (12 und 20 mmol/l) Glukose, sowie dem Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin (10 μ mol/l) versetzt, für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Insulinsekretion wurde auf Eis gestoppt. Der Insulingehalt im Medium, sowie der durch sauren Ethanol (über Nacht; 1,5% (v/v) HCl/75% (v/v) Ethanol) extrahierte Insulininhalt der Zellen wurde mittels Radioimmunoassay unter Verwendung eines Ratteninsulinstandards ermittelt. Für die Auswertung wurden die gemessenen Mengen an sezerniertem Insulin prozentual ins Verhältnis des Insulingehaltes der Zellen gesetzt (Abb. 4.1).



4.2.1.4. Transfektion von INS-1E Zellen

Bei der Transfektion wird fremde Nukleinsäure in die Zelle eingebracht. Es gibt unterschiedliche Methoden, mit denen Zellen transfiziert werden können. Da INS-1E Zellen erfahrungsgemäß schwer mit Plasmid-DNA zu transfizieren sind, wurden verschiedene Methoden getestet. Hier sollen die gängigsten aufgezählt werden. Bei der

Kalzium-Phosphat-Präzipitation, wird die Fremd-DNA an ausgefallene Kalziumphosphatkristalle gebunden. Diese Kristalle werden anschließend durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Für insulinsezernierende Zellen ist diese Methode allerdings ungeeignet, da INS-1E Zellen mit erhöhter Insulinsekretion auf Kalzium reagieren und somit in ihrer Funktion durch die Transfektionsmethode stark beeinflusst wären.

Bei der **Elektroporation** werden elektrische Spannungsimpulse auf die Zellen gegeben, sodass deren Membranen vorübergehend permeabilisiert werden und die DNA aufgenommen werden kann. An diese Methode lehnt sich die Technik von Lonza an, die zur Transfektion der SGK1-Plasmide angewendet wurde. Lonza kombiniert die Elektroporation mit Zusatz einer Zelllinien-optimierten Lösung, deren Inhalt nicht angegeben wird. Außerdem sind im Gerät verschiedene Programme unterschiedlicher elektrischer Parameter gespeichert, welche Zelllinien- spezifisch optimiert wurden. Die genauen elektrischen Parameter werden allerdings nicht benannt. Diese Optimierungen ermöglichen zusätzlich zu der Aufnahme der DNA über die Plasmamembran auch die Aufnahme in den Zellkern. Der Hersteller nennt diese Art der Elektroporation *Nucleofection*. Für die Transfektion mit den SGK1-Plasmiden wurden nach Trypsinisierung pro Ansatz 2×10^6 Zellen 10 min bei 90 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 μ l frisch angesetzter Nucleofectionslösung (85 μ l Nucleofector Solution T + 18,9 μ l Supplement A) resuspendiert und 2 μ g Plasmid-DNA in 5 μ l TE-Puffer gelöst, zugegeben. Die Zellsuspension wurde zügig in eine Küvette überführt und die Elektroporation im Amaxa-Gerät mit dem Programm T27 durchgeführt. Daraufhin wurden die elektroporierten Zellen mit einer Pasteurpipette in mit 1,5 ml Kulturmedium befüllte Wells einer 6-Well-Platte überführt und über Nacht unter Standardbedingungen im Inkubator kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen entsprechend mit Dexamethason behandelt. Als Transfektionskontrolle wurde ein Ansatz mit pmaxGFP® Vector (im Kit enthalten) transfiziert. Erfolgreich transfizierte Zellen konnten so unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden und die Transfektionseffizienz abgeschätzt werden. Außerdem wurde als Negativkontrolle ein Ansatz der Zellen ohne Zusatz von DNA elektroporiert.

Eine weitere stark verbreitete Methode ist die Transfektion mit Hilfe **liposombasierten** Reagenzien. Die zu transfizierende DNA oder siRNA wird in Liposomen eingeschlossen,

welche mit der Zellmembran fusionieren. So gelangt die DNA oder siRNA über Endozytose in die Zelle.

In dieser Arbeit wurde für das Einschleusen von siRNA (verwendete siRNA, siehe 4.1.5.) in INS-1E-Zellen die liposombasierte Transfektionsmethode verwendet. Durchgehend wurde das Transfektionsreagenz *DharmaFectReagent3* von Dharmacon verwendet und wie folgt eingesetzt: Grundsätzlich wurden zuerst die Zellen trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen bis zum Gebrauch auf Eis gestellt. Sollten transfizierte Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet werden, wurden außerdem im Vorfeld Glasplättchen mit Poly-L-Ornithin beschichtet (vgl. 4.2.1.5.). Die Transfektionslösungen wurden in folgenden Verhältnissen hergestellt:

Tabelle 4.6 Verwendete Transfektionslösungen A

Lösung A	je siRNA (20 µmol/l)	serumfreies Medium
einfache Transfektion	2,5 µl	125 µl
doppelte Transfektion	2 µl	125 µl
dreifache Transfektion	2 µl	133 µl

Tabelle 4.7 Verwendete Transfektionslösungen B

Lösung B	DharmaFectSol3	serumfreies Medium
einfache Transfektion	5 µl	245 µl
doppelte Transfektion	8 µl	242 µl
dreifache Transfektion	10 µl	240 µl

Nach Herstellung der Lösungen A (Tabelle 4.6) und B (Tabelle 4.7) wurden sie für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Während des Inkubierens wurden die Lösungen regelmäßig durch „Schnipsen“ des Reaktionsgefäßes aufgerührt. Die Transfektionslösung wurde in der Menge Vollmedium aufgenommen, dass dieses plus der Zellsuspension ein Volumen von 2,5 ml/Well ergaben. Die Transfektionslösung

wurde in die Wells vorgelegt und die resuspendierten Zellen im Anschluss auf die Wells gegeben. Pro Well wurden 5×10^5 Zellen eingesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen Vollmedium gewechselt. Am darauffolgenden Tag wurden die entsprechenden Testsubstanzen zu den Zellen gegeben. So wurden die Zellen 48 h oder 72 h nach Transfektion für die Protein- oder RNA-Analyse verwendet.

Eine weitere elegante Transfektionsmethode ist das Einschleusen von DNA mit Hilfe von Viren. Die Methode der **adenoviralen Transduktion** wird auch bei INS-1E-Zellen erfolgreich angewandt^{223 224}. dsDNA-Adenoviren haben gegenüber z.B. Retroviren den Vorteil, dass sie DNA mit einer höheren Effizienz²²⁵ in die Zelle einschleusen und keine unerwünschten Effekte durch einen zufälligen Einbau der DNA in das Wirtsgenom stattfinden können. Außerdem besteht die Möglichkeit sehr große DNA-Stücke bis 37 kb in sich teilende, aber auch in primäre und sich nicht teilende Zellen zu transduzieren^{226 227}. Nach der Methode von Mizuguchi und Kay^{228 229} wird im ersten Schritt das Transgen in einen adenoviralen *shuttle*-Vektor kloniert. Kompetente Bakterien werden mit diesem Plasmid, sowie einem Replikations-inkompetenten adenoviralen Vektor transformiert, sodass über homologe Rekombination das virale Konstrukt gebildet wird. Das amplifizierte virale Plasmid wird isoliert und nach Linearisierung in HEK293-Zellen transfiziert. HEK293-Zellen dienen als Verpackungszelllinie, welche die für die virale Replikation fehlenden Gene transkomplementieren, sodass der rekombinante Adenovirus gebildet werden kann und ins Medium abgegeben wird.

Der virale Titer im Medium wird durch einen Plaque-Assay in HEK293-Zellen bestimmt. Die Infektion der Zielzellen erfolgt für zwei Stunden in serumfreiem Medium. Es ist zu beachten, dass diese Methode Schritte beinhaltet, welche in einem S2 Labor durchgeführt werden müssen.

4.2.1.5. Beschichtung von Glasplättchen mit Poly-L-Ornithin

Für die Fluoreszenzfärbungen und TUNEL-Experimente wurden Zellen auf Glasplättchen ausgesät. Für eine verbesserte Adhäsion der Zellen wurden diese direkt vor Versuchsdurchführung mit Poly-L-Ornithin beschichtet.

Dazu wurde Poly-L-Ornithin mit PBS auf eine Endkonzentration von 0,001% verdünnt und auf die Glasplättchen verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden die Plättchen dreimal mit PBS gewaschen. Nach sorgfältiger Entfernung des PBS wurden die Zellen für den Versuch ausgesät.

4.2.1.6. Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 2×10^5 Zellen/Poly-L-Ornithin-beschichtetem Plättchen in einer 35 mm Schale ausgesät. Für mit siRNA behandelte Zellen wurden dem Protokoll der Transfektion entsprechend 5×10^5 Zellen pro Well eingesetzt. Nach zweitägiger Kultur wurden die Zellen behandelt, im Anschluss das Medium abgezogen und zügig mit 4%iger Formaldehyd-PBS Lösung für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit frisch hergestellter eiskalter 0,2%iger TritonX100-PBS-Lösung für zwei Minuten auf Eis inkubiert, um die Membranen zu permeabilisieren. Im Anschluss wurde erneut mit PBS gewaschen und für 45 Minuten mit 10%iger FCS-PBS-Lösung unspezifische Bindungsstellen bei Raumtemperatur abgesättigt. Es folgte direkt die Inkubation mit dem primären Antikörper in eiskalter 10%iger FCS-PBS-Lösung. Die entsprechenden Antikörperverdünnungen sind in Tabelle 4.4 aufgelistet. Um die Antikörperlösung sparsam einzusetzen, wurden ca. 40 μ l auf einen Parafilm in einer Petrischale gegeben und das Plättchen umgedreht auf diesen Tropfen gelegt. Als Verdunstungsschutz wurde zuvor eine mit Wasser angefeuchtete Filtermembran zusätzlich eingelegt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Plättchen wieder in 35 mm Schalen dreimal mit 10%iger FCS-PBS Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Es erfolgte auf Parafilm eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1/400 verdünnt in 10% FCS-PBS) (vgl. Tabelle 4.5.), welche bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Da der sekundäre Antikörper mit lichtempfindlichen Alexa Fluor gekoppelt ist, fand die Inkubation im Dunkeln statt. Hierfür wurden die Petrischalen in Alufolie eingewickelt. Für die FOXO1 und SGK1 Färbungen wurde ein mit Alexa Fluor 488 gekoppelter gegen Kaninchen-IgG gerichteter sekundärer Antikörper aus der Ziege ausgewählt. Alexa Fluor 488 (FITC; *fluorescein isothiocyanate*) hat ein Extinktions-maximum von 495 nm und emittiert mit einem Emissionsmaximum von 519 nm grünes Licht. Nach einmaligem Waschen mit 10%iger FCS-PBS-Lösung wurden die Zellkerne mit TOPRO3, einem Carbocyanin-Farbstoff, angefärbt. Hierfür wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit in einer 1 μ mol/l TOPRO3 Lösung in PBS auf Parafilm inkubiert. TOPRO3 hat ein Extinktionsmaximum von 642 nm und emittiert bei einem Maximum von 661 nm rotes Licht. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Plättchen auf Objektträgern (OT) mit einer Mowiol-Lösung befestigt. Ein Tropfen Mowiol wurde auf ein OT gegeben, das Plättchen daraufgelegt und sorgfältig frei von

Lufteinschlüssen festgedrückt. Nach einer Trocknungsphase (lichtgeschützt bei Raumtemperatur) wurden die Plättchen bis zur Mikroskopie bei 4 °C in einer lichtundurchlässigen Box gelagert.

Für die Kofärbung von Caspase-3 und FOXO1 wurde für FOXO1 ein Alexa Fluor 546 (TRITC; *tetramethylrhodamine isothiocyanate*) gekoppelter sekundärer Antikörper aus der Ziege gegen Kaninchen IgG ausgewählt. TRITC hat ein Extinktionsmaximum von 556 nm und emittiert rotes Licht mit einem Emissionsmaximum von 573 nm. Der primäre Caspase3 Antikörper war direkt an FITC gekoppelt. Die Farben wurden nachträglich dargestellt. So konnte Caspase3 in grün, FOXO1 in rot und die Kerne in pseudo-blau dargestellt werden.

4.2.1.7. TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay wurde zum Nachweis apoptotischer Zellen angewendet. Während des apoptotischen Prozesses kommt es u.a. zur Fragmentierung genomischer DNA (vgl. 2.4.). An die dabei entstehenden freien 3'-OH-Enden der DNA Stränge werden im Assay durch das Enzym *Terminal deoxynucleotidyl Transferase* (TdT) Fluoreszein markierte Nukleotide angehängt. Wird Fluoreszein mit einer Wellenlänge von 450-500 nm angeregt, emittiert es bei 480 nm, sodass unter dem Fluoreszenzmikroskop grünes Licht sichtbar wird. Zellkerne apoptotischer Zellen sind so grün zu erkennen.

Für den TUNEL-Assay wurden Zellen wie unter 4.2.1.5. und 4.2.1.6. beschrieben eingesät und nach der entsprechenden Behandlung in Vollmedium fixiert. Weiter wurde nach Protokoll des Herstellers (Roche) vorgegangen. Nach einmaligem Waschen der Plättchen in PBS wurden daraufhin die Glasplättchen für 30 min mit 0,1µg/ml Dapi-PBS bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS, bevor die Glasplättchen mittels Mowiol auf einen Objektträger fixiert wurden. Nachdem die Plättchen getrocknet waren, erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) unter Verwendung einer 20fachen Vergrößerung und Einsatz des Apotoms. Für die Aufnahmen wurde eine Schwarzweiß-Kamera verwendet, da diese im Vergleich zu einer Farbkamera lichtempfindlicher ist. Zur Quantifizierung wurden die apoptotischen, grün markierten Zellkerne ausgezählt und ins Verhältnis zu der Gesamtzahl der Zellkerne gesetzt.

4.2.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1. Transformation von Plasmiden in Bakterien und Präparation der Plasmid-DNA

Unter Transformation versteht man das Einführen von Fremd-DNA in Bakterien. Durch die Vermehrung der Bakterien unter Selektionsdruck wird auch die eingeführte Antibiotikaresistenzgen-kodierende Plasmid-DNA vervielfältigt und man kann sie durch Plasmid-Präparation isolieren. Um kompetente Bakterien nach der Methode von Chung und Miller ²³⁰ zu erhalten, wurden DH5 α *E. Coli* Bakterien bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 37°C in LB-Medium kultiviert. Daraufhin wurden die Bakterien abzentrifugiert und in eiskaltem TSB-Puffer resuspendiert. Aliquots von 100 μ l wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Für die Transformation wurde dann ein Aliquot chemisch kompetenter Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. 50 bis 100 ng Plasmid-DNA, gelöst in 20 μ l KCM Puffer wurden 80 μ l Wasser hinzugefügt. 100 μ l der kompetenten Bakterien wurden damit versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 40 Sekunden und eine direkte Inkubation auf Eis für eine Minute. 800 μ l Antibiotika-freies LB-Medium wurden auf den Ansatz pipettiert und nach Invertieren des Reaktionsgefäßes 50 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Bakteriensuspension auf Antibiotika-haltige Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie in 50 ml antibiotikahaltiges LB-Medium überführt und für circa 15 Stunden auf einem Schüttler bei 150 rpm und einer Temperatur von 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 6000 g für 15 min bei 4 °C konnte das Bakterienpellet zur Plasmidpräparation eingesetzt werden. Diese wurde nach Herstellerprotokoll (Plasmid plus Mini-Kit; Qiagen) durchgeführt. Hier wird nach alkalischem Aufschluss der Bakterien die Plasmid-DNA an eine Silikamatrixsäule gebunden. Nach mehreren Waschschritten erfolgt die Elution der gebundenen Plasmid-DNA in TE-Puffer. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde wie in Kapitel 4.2.2.4. beschrieben ermittelt. Das isolierte Plasmid wurde mittels Restriktionsfragmentanalyse und anschließender Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese qualitativ kontrolliert.

4.2.2.2. Agarose Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden über horizontale Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Abhängig von der Fragmentgröße wurde ein 0,9- 2%iges Agarosegel verwendet. Agarose wurde durch Aufkochen in 1xTAE Puffer gelöst. Nach einer kurzen Abkühlphase wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Das flüssige Gel wurde in die Gelkammer gegossen und der „Kamm“, der die Probenaschen ausspart, eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde 1xTAE-Puffer als Laufpuffer zugefügt und die Taschen mit den Proben beladen. Die Proben wurden zuvor mit 6x Loading Dye versetzt. Außerdem wurden 3 µl DNA-Marker (Bioron) aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 5-7 Volt/cm Elektrodenabstand wurden die negativ geladenen DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch UV-Anregung des interkalierenden Ethidiumbromids visualisiert.

4.2.2.3. RNA-Isolation

Die totale RNA von aus der Ratte stammenden INS-1E Zellen, sowie von murinen Inseln, wurde unter Verwendung des RNeasy Kits von Qiagen isoliert. Die RNA wird an eine Silikamatrixsäule spezifisch gebunden. Durch mehrere Wasch- und Zentrifugations-schritte werden andere in der Probe enthaltene Bestandteile, wie Protein und DNA entfernt und im Anschluss die gereinigte RNA eluiert. Die Arbeitsschritte wurden nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dem RLT-Puffer (im Kit enthalten) wurde β-Mercaptoethanol (10 µl/ml RLT) beigefügt. Eine manuelle Homogenisierung der Zell- und Mausinsel-Lysate erfolgte mittels fünffachem Aufziehen der Probe mit einer Spritze (Kanüle 30G). Um genomische DNA zu entfernen wurde auf der Säule mit DNAase I (Qiagen) inkubiert. Die aufgereinigte RNA wurde in RNase freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

4.2.2.4. Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration isolierter RNA und DNA wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm nach dem Lambert Beer'schen Gesetz bestimmt. Der Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Lösung wurde über das Absorptionsverhältnis von 260 nm zu 280 nm ermittelt. Quotienten unter 1,8 deuten auf Verunreinigung durch Proteine hin. Der erwünschte Wert des Quotienten liegt zwischen 1,8 und 2.

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde wie folgt errechnet:

Messwert x Verdünnung x spezifischer Faktor der Nukleinsäure

Faktor für DNA: 50 (1 OD = 50 µg/ml)

Faktor für RNA: 40 (1 OD = 40 µg/ml)

4.2.2.5. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

1 µg totale RNA wurde mit Hilfe des Kits *AdvantageRT for PCR* (Clontech) in cDNA transkribiert und in 100 µl Gesamtvolumen aufgenommen. Hier wurde nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern gearbeitet. Als Negativkontrolle für qRT-PCR-Anwendung zur Untersuchung möglicher Verunreinigung durch DNA wurde jeweils eine Probe RNA ohne Einsatz von reverser Transkriptase verwendet.

4.2.2.6. Primerdesign

Die Sequenzinformationen der zu amplifizierenden Gene wurden über die Gendatenbank des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) abgerufen. Mit Hilfe des Programms primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) wurden mögliche Primersequenzen gesucht. Für pan-*Bim*, pan-*SGK1* und pan-*SGK3*-Primer wurde eine in allen Isoformen enthaltene Targetsequenz verwendet. Um diese Homologen zu finden, wurden die Sequenzen der Isoformen mit Hilfe des Programmes ‚nucleotide blast‘ des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) gegeneinander verglichen. Die Primer wurden in einer Länge von circa 20 nt gestaltet. Die Größe des Amplifikats wurde von 150 bis 300 Basenpaaren gewählt. Im Programm primer3 wurde als optimale Schmelztemperatur (T_m) 63 °C eingetragen, sodass alle verwendeten Primer später bei denselben Bedingungen verwendet werden konnten. Wenn möglich wurden in unterschiedlichen Exons hybridisierende Primer verwendet, um der Amplifikation aus DNA vorzubeugen.

Die physikalischen Eigenschaften der durch primer3 ermittelten Primersequenzen wurden durch NetPrimer (www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html) untersucht. Die Schmelztemperaturen der Primer sollten kleiner 1 °C voneinander abweichen. Eine ausgeglichene Stabilität von 5' und 3' Enden wurde angestrebt. Außerdem sollten die Primer möglichst keine oder nur instabile Crossdimere ausbilden. Um eine selektive Amplifikation zu erhalten wurden die

Primersequenzen abschließend mit der gesamten online verfügbaren Gendatenbank des NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) für den entsprechenden Organismus abgeglichen.

Bevor die Primer im Light Cycler eingesetzt wurden, wurden die Bedingungen mittels Endpunkt-PCR getestet, die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und die spezifischen Bandengrößen kontrolliert.

Die Primer und entsprechenden Probes für Verwendung im LC480 Light Cycler von Roche wurden mit Hilfe des Programms ‚Universal ProbeLibrary Assay Design Center‘ (<http://www.roche-applied-science.com>) ausgewählt.

Der Reinheitsgrad synthetisierter Primer war ‚desalted‘.

4.2.2.7. Quantitative real time (RT) PCR

Die quantitative PCR bestimmt die in einer Probe enthaltene Menge einer mRNA-Spezies indirekt, da die Analyse an einer zuvor revers transkribierten cDNA erfolgt. Diese Methode ermöglicht je Zyklus die Quantifizierung amplifizierter DNA durch die Detektion des in der Probe befindlichen Farbstoffes. Die Farbstoffintensität korreliert dabei mit der synthetisierten Menge an DNA. Durch eine jeweilige Standardreihe (SearchLC) kann über die CT-Werte (Cycle-Threshold) automatisiert auf die anfänglich in einer Probe vorhandene cDNA zurückgerechnet werden.

Als non-template-Kontrolle diente je Primerpaar eine Probe mit Wasser. Als Kontrolle für Verunreinigung durch genomische DNA diente eine nicht-revers transkribierte RNA-Probe. Als Qualitätskontrolle der amplifizierten DNA wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der unspezifische Amplifikate identifiziert werden können. Zur Quantifizierung der zu ermittelten mRNA Spezies wurden die Kopienzahlen des Gens ins Verhältnis zur Kopienzahl des separat untersuchten Haushaltsgens *Gapdh* gesetzt und mit 1000 multipliziert ($\text{Interessengen}/\text{Gapdh} \cdot 1000$).

Die PCR wurde bei einem Probenvolumen von 20 μl (für selbst designte Primer: 2 μl cDNA + 2 μl SYBR Green Mastermix + 2,4 μl MgCl_2 (25 mmol/l Stammlösung) + 1 μl Primermix (10 $\mu\text{mol/l}$ je forward und reverse Primer) + 12,6 μl H_2O ; für kommerzielle *Gapdh*-Primer SearchLC: 2 μl SYBR Green Mastermix + 2 μl Primermix (10 $\mu\text{mol/l}$ Stammlösung) + 14 μl H_2O) durchgeführt.

Die PCR-Bedingungen im Roche 1.5 System waren:

Amplifikation: 35 Zyklen	Denaturierung	95 °C; 10 Minuten
	Denaturierung	95 °C; 10 Sekunden
	Hybridisierung	66 °C (Schmelztemp. -2 °C); 5 Sekunden
	Elongation	72 °C; 16 Sekunden
Schmelzkurve:		61 °C; 10 Sekunden ($T_m - 5\text{ °C}$)

Der Richtwert zur Ermittlung der Annealing-Temperatur war 2 °C unter der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur des Primers (bei niedrigem Salzgehalt). Für alle Primerpaare konnten dieselben PCR-Bedingungen angewendet werden.

qRT-PCR unter Verwendung der *Universal Probe Library*

Die Untersuchungen der mRNA in Mausinseln, sowie die Untersuchungen der FOXO1 Targetgene in *FoxO1*-defizienten INS-1E Zellen wurden unter Verwendung Fluoreszenzgekoppelter Sonden (Universal Probe Library, Roche) mit dem LC480 System von Roche durchgeführt. Die Sonden wurden so gewählt, dass sie 3' von einem Primer auf der Zielsequenz binden. Ein am 3'-Ende der Sonde befindender *Dark Quencher Dye* verhindert das Signal eines am 5'-Ende gekoppelten Fluorophor Fluoreszein. Bei der Elongation des 5'- von der Sonde entfernten Primers wird durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase der Quencher von der Sonde hydrolysiert. Der freigesetzte Farbstoff kann folglich detektiert werden. Damit ist diese Methode weniger anfällig für die Detektion unspezifischer Amplifikation. Eine Qualitätskontrolle durch Ermittlung einer Schmelzkurve ist nicht notwendig. Die Quantifizierung der mRNA-Spezies (*gene of interest*) in diesen Experimenten erfolgte durch Verwendung der $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ Methode²³¹. Die Genexpressionen wurden im Verhältnis zum Haushaltsgen *rps13* (*ribosomal protein S13*) angegeben. Entsprechende Kontrollproben (s.o.) wurden auch hier eingesetzt. Das Probenvolumen betrug 15 µl (3,8 ml H₂O + 10 µl Mastermix + 0,5 µl Primer frw (10 µmol/l Stammlösung) + 0,5 µl Primer rev (20 µmol/l Stammlösung) + 0,2 µl Sonde).

Die PCR Bedingungen im LC480 System waren:

Amplifikation: 35 Zyklen	Denaturierung	95 °C; 5 Minuten
	Denaturierung	95 °C; 10 Sekunden
	Hybridisierung	66 °C (Schmelztemp. -2 °C); 5 Sekunden
	Elongation	72 °C; 16 Sekunden

4.2.3. Biochemische Methoden

4.2.3.1. Lyse von Zellen

Zur Lyse der Zellen wurden die Zellkulturschalen auf Eis platziert und das Medium zügig abgezogen. Um restliches BSA zu entfernen, wurden die Zellen dreimal vorsichtig ohne den Zellrasen abzulösen, mit eiskaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurde Protease- und Phosphataseinhibitoren-beinhaltender eiskalter Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit auf Eis von mindestens 20 Minuten. Nach Überführung der Lysate in ein Reaktionsgefäß wurden die Zellbestandteile bei 10.000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und die Überstände in frische Röhrchen überführt. Daraufhin wurde die Proteinkonzentration ermittelt (vgl. 4.2.3.3.). Anschließend wurde mit Wasser und 5x Lämmli eine einheitliche Konzentration von 1-2 µg/µl eingestellt und die Proben für 10 min bei 90 °C erhitzt. Bei der Lyse mit Triton-X100 werden zytoplasmatische und membranständige Proteine in Lösung gebracht. Im Lysepuffer enthaltendes SDS bringt die Zellkerne in Lösung.

4.2.3.2. Trennung von nukleärer und zytosolischer Fraktion

Hierfür wurden 4 bis 5 Mio. Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgesät und nach zwei Tagen, wie unter 4.2.1.2. beschrieben, behandelt. Zur Trennung von nukleärer und zytosolischer Fraktion wurde das Kit *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (ThermoScientific) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden Protease-Inhibitoren eingesetzt (1 Tablette cOmplete, Mini, EDTAfree (Roche; vgl. 4.1.4.) in 200 µl H₂O gelöst, daraus 20 µl/ml CER1). Durch Zugabe zweier Lösungen (CER1 und CER2) unbekanntes Inhalts wurden die Zellmembranen zerstört und der zytoplasmatische Inhalt freigesetzt. Die intakten Zellkerne werden daraufhin über einen Zentrifugationsschritt gesammelt und durch Zugabe einer dritten Lösung (NER) unbekanntes Inhaltes lysiert. Um das Verhältnis der Mengen an zytosolischen und nukleären Proteinen im Westernblot beizubehalten, wurden der Proteinverteilung in den Fraktionen 30 µg Protein der zytosolischen und 15 µg Protein der nukleären Fraktion im SDS-Gel aufgetrennt. Um die erfolgreiche Trennung der Fraktionen nachzuweisen, wurden als zytosolischer Marker GAPDH und als nukleärer Marker Histon H1 im Westernblot mitbestimmt.

4.2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford Assay)

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Zelllysate und Fraktionen zur weiteren Verwendung im Westernblot wurde in dieser Arbeit mit der Methode nach Bradford durchgeführt. Die Bindung von hauptsächlich aromatischen und basischen Aminosäureresten, insbesondere Arginin, an Coomassie® Brilliant Blue G-250 - Farbstoff in einer sauren Lösung führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Diese kann photometrisch bestimmt werden. Die Konzentration der in der Lösung enthaltenen Proteine kann somit mit Hilfe einer BSA-Standardreihe bekannter Konzentrationen errechnet werden.

Die Durchführung des Assays erfolgte nach Anweisung des Herstellers Biorad. 2 µl Lysat wurden in 1 ml 1:5 verdünnter Bradfordlösung angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 5 Minuten und maximal 30 Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm im UV-Spektrometer gemessen. Als Basiswert wurde Pufferlösung gemessen. Als Standard wurde eine BSA-Konzentrationsreihe (zwischen 0,125 µg/µl-10 µg/µl) verwendet.

4.2.3.4. SDS-Gele

In dieser Arbeit wurden alle Proben unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht durch Mini-SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt. β-Mercaptoethanol im Lämmli-puffer reduziert vorhandene Disulfidbrücken der Proteine. Durch SDS hervorgerufene Denaturierung wird die Bildung von Quartärstrukturen unterbunden. So können die SDS-Protein-Komplexe elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Zur Orientierung des Molekulargewichts wurden auf jedem Gel 10 µl Proteinmarker (Invitrogen) als Standard aufgetragen. Je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine, wurden Gele mit einem Acrylamidgehalt von 8, 10 oder 12% hergestellt (Tabellen 4.8 und 4.9). Die Elektrophorese wurde bei 120 Volt durchgeführt.

Tabelle 4.8: Zusammensetzung der SDS-Trenngele

SDS-Trenngel, 5 ml Endvolumen	8%	10%	12%
H ₂ O (ml)	2,3	1,9	1,6
Acrylamid (30%) (ml)	1,3	1,7	2
Tris-HCl (1,5 mol/l; pH=8,8) (ml)	1,3	1,3	1,3
SDS (10%) (µl)	50	50	50
APS (10%) (µl)	50	50	50
TMED (µl)	3	2	2

Tabelle 4.9: Zusammensetzung der SDS-Sammelgele

SDS-Sammelgel	5 ml Endvolumen
H ₂ O (ml)	1,4
Acrylamid (30%) (µl)	330
Tris-HCl (1 mol/l; pH=6,8) (µl)	250
SDS (10%) (µl)	20
APS (10%) (µl)	20
TMED (µl)	2

4.2.3.5. Westerntransfer und immunologischer Proteinnachweis

Die aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine adsorbierende Nitrozellulosemembran gebロットet. Diese Membran bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. In dieser Arbeit wurde das Tank-Blot-Verfahren angewendet. Der Transfer erfolgte nass für 1 h bei 100 Volt.

Ponceaurot Färbung

Nach Transfer der Proteine wurden diese mit Ponceaurot angefärbt, um den Transfer zu kontrollieren und die Membranen bei Bedarf zu schneiden, um Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts gleichzeitig mit mehreren Antikörpern inkubieren zu können. Ponceaurot weist dabei Proteine ab circa 50 ng/Bande nach. Für die Färbung wurde die Membran in der Ponceaulösung so lange inkubiert, bis die Banden sichtbar wurden. Das Ponceaurot wurde daraufhin mit TBS-T wieder ausgewaschen.

Blockieren

Unspezifische Bindungsstellen der Blotmembran wurden durch einstündiges blockieren mit 5% Milch in TBS-Tween (TBS-T) bei RT abgesättigt. Daraufhin wurden die Membranen für mindestens 1 h bei Raumtemperatur, in der Regel aber über Nacht bei 4 °C, in der Lösung mit primärem Antikörper inkubiert. Anschließend wurde dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen, gefolgt von der Inkubation mit dem sekundären Antikörper in einer 5%igen Milch-TBS-T Lösung für eine Stunde bei RT. Nach dreimaligem Waschen der Membranen für jeweils 10 min in TBS-T wurden die Proteine durch Verwendung der *enhanced chemiluminescence systeme* (ECL)-Methode detektiert. Die am sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminols, wobei Chemilumineszenz entsteht. Diese wurde dann mittels Photofilm (Amersham) detektiert.

Die verwendeten Verdünnungen der Antikörperlösungen sind unter 4.1.8. in den Tabellen 4.4 und 4.5 aufgelistet.

Für die Auswertung der Westernblot Experimente wurden die entwickelten Filme eingescannt und die spezifischen Banden densitometrisch ausgewertet. Hier wurde das Programm ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) verwendet. Als Ladekontrolle wurde, abhängig von der Größe der detektierten Proteine auf der Membran Tubulin oder GAPDH gewählt. Die Phosphospezifität eines Phosphoantikörpers wurde im Vorfeld durch einen Phosphataseverdau kontrolliert (Roche). Hier wurde Phosphatase im Überschuss (mindestens 1U/ μ g Protein) eingesetzt, da der Lysepuffer Phosphataseinhibitoren enthielt.

4.2.4. Arbeiten mit Mäusen

4.2.4.1. Präparation von Langerhans'schen Inseln

Vor Beginn der Präparation wurde Hanks Puffer hergestellt und auf Eis gelagert. Zudem wurde 10 mg Kollagenase in 10 ml BSA freiem Hanks Puffer gelöst. Für eine optimale Enzymaktivität wurde der Lösung 5,4 mmol/l CaCl_2 hinzugefügt. Die Lösung wurde in eine Spritze aufgezogen und auf Eis gelagert, damit eine frühzeitige Aktivierung des Enzyms, sowie ein Enzymdefekt durch hohe Temperatur unterbunden war.

Die zu präparierende Maus wurde durch Genickbruch getötet. Um allergene Reaktionen durch Haarkontamination im Raum zu verringern, wurde das Fell mit 70% Ethanol

besprüht. Der rücklings auf einer Styroporunterlage fixierten Maus wurde das Fell in der Bauchregion entfernt, indem es mit einer Pinzette angehoben, ein kleiner Schnitt gesetzt und dann vorsichtig mit den Händen auseinander gezogen wurde. Das freigelegte Peritoneum wurde mit einer Schere aufgeschnitten. Um den Zugang zum Ductus pancreaticus über die Papilla duodeni vateri, die durch den Musculus sphincter Oddi verschlossen wird, zu erleichtern, wurde die Leber cranial verschoben und die oberste Darmschlinge caudal gezogen. Der Musculus sphincter Oddi ist durch seine weiße Struktur meist deutlich zu erkennen. Auf diesem Darmabschnitt wurde die Papilla duodeni vateri bestimmt und beidseitig mit jeweils einer Klemme gesichert. Dieser Schritt ist notwendig, damit bei der Injektion keine Kollagenaselösung in den Darm fließt. Zudem wurde der Ductus choledochus so dicht wie möglich Richtung Galle und Leber durch einen Bindfaden mit zwei Knoten verschlossen, um einen unkontrollierten Rückfluss der Kollagenase in die Leber zu verhindern. Mit einer feinen Schere wurde auf der Papille ein Schnitt gesetzt. Durch diesen wurde eine dünne Kanüle (0,4 mm x 19,0 mm) eingeführt, um die Kollagenaselösung langsam in das Pankreas zu injizieren. Für eine effektive Verdauung des Organes ist es wichtig, dass in das gesamte Pankreas, einschließlich des Pankreasschwanzes Kollagenase eindringt. Nach Entfernung der Klemmen wurde das Pankreas mit Hilfe einer feinen Schere vom Enddarm ausgehend freipräpariert und in ein steriles 50 ml-Plastikzentrifugenröhrchen überführt. Der Verdau fand im 37 °C warmen Wasserbad für 10 min statt. Durch Zugabe eiskalter Albumin-haltiger Hanks-Lösung wurde die Enzymaktivität gestoppt. Nach dreimaligem kurzen Aufschütteln der Suspension wurde diese bei geringer Zentrifugalstärke (20-30 g) abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 10 ml verworfen und das Pankreas durch Aufziehen mit einer Spritze (Kanüle 1,8G) wieder resuspendiert. Hierbei wurde die Spritze nicht ganz heruntergedrückt, um die Inseln nicht zu zerquetschen. Dieser Waschschrift wurde 2 bis 3 Mal wiederholt. Daraufhin wurde die Suspension über ein Sieb in eine geschwärzte Petrischale überführt. Im Folgenden wurden die Inseln mit einer 200 µl-Pipette per Hand unter einem Binokular in eine Petrischale mit frischer eiskalter Hanks Lösung überführt („gepickt“) und somit vom umgebenden exokrinen Gewebe befreit. Dieser Vorgang wurde bis zu drei Mal auf Eis wiederholt.

Kultivierung der Inseln

Für die Kultivierung der Inseln zur nachfolgenden RNA Isolation wurden pro Versuchsbedingung mindestens 70 Inseln in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Sedimentation der Inseln wurde ein Teil des Überstandes abgenommen, um möglichst geringe Mengen unsteriler Lösung beizubehalten. Die nun folgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Zum Waschen, wurden die Inseln auf 10 ml Kulturmedium in einem 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und das 1,5 ml Reaktionsgefäß nochmals mit Medium ausgespült. Nach 10 minütiger Sedimentationszeit, wurde das Medium bis auf 500 µl abgezogen. Die Inseln wurden im restlichen Medium erneut auf 10 ml Kulturmedium in einem 15 ml Reaktionsgefäß gegeben. Letzterer Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Die nun quasi-sterilen Inseln wurden über Nacht in einer unbeschichteten 35 mm-Petrischale in 2,5 ml Kulturmedium inkubiert. Am Folgetag wurde 100 nmol/l Dexamethason (Stammlösung 100 µmol/l) direkt ins Schälchen pipettiert und die Zellen für 24 h inkubiert. 30 Minuten vor Ende dieser Inkubationszeit wurden 3 µmol/l Akti-1/2 (Stammlösung 3 mmol/l) ins Medium gegeben. Für die Zellyse wurden die Inseln in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einer kurzen Sedimentationszeit wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Inseln mit 350 µl RLT (β-Mercaptoethanol enthaltend) für die RNA Isolation versetzt. Durch mehrfaches Aufziehen mit einer Spritze (Kanüle 30G) wurden die Inseln homogenisiert. Die RNA Isolation erfolgte wie in Kapitel 4.2.2.3. beschrieben.

Gewinnung von Einzelzellen

Zur Gewinnung von Einzelzellen für die Immunfluoreszenzfärbung wurden mindestens 15 Inseln pro Bedingung, also mindestens 90 Inseln/Sechs-Wellplatte trypsinisiert. Hierfür wurden die vom exokrinen Gewebe befreiten Inseln in 10 ml PBS (Ca^{2+} / Mg^{2+} frei) sedimentiert, um sie von Albuminresten zu befreien, die das Trypsin hemmen würden. Da sich die Inseln in Abwesenheit von Ca^{2+} vereinzeln, sollte dieser Vorgang zügig erfolgen. Daraufhin wurden sie in ein 15 ml Röhrchen überführt und mit ca. 2 ml einer 1:4 verdünnten warmen Trypsin-PBS-Lösung versetzt. Daraufhin wurden die Inseln in einem 37 °C warmen Wasserbad 4 bis 8 Minuten inkubiert. Jede Minute wurde durch auf- und ab pipettieren mit einer 1000er Pipette kontrolliert, ob die Inseln bereits vereinzelt waren. War das der Fall wurde die Suspension auf 10 ml steriles Kulturmedium gegeben und 4 Minuten bei 300 g pelletiert. Das Medium wurde bis auf

ca. 500 μ l abgezogen und die pelletierten Zellen wieder resuspendiert. Daraufhin wurden die resuspendierten Zellen erneut auf 10 ml steriles Medium gegeben. Dieser Waschvorgang wurde drei Mal wiederholt.

Die Zellen wurden auf poly-L-Ornithin (vgl. 4.2.1.5.) beschichtete Glasplättchen gegeben. Hierfür wurde das Zellpellet in einer angepassten Menge Medium resuspendiert, sodass pro Bedingung ein Tropfen à ca. 20-25 μ l Zellsuspension mittig auf das Glasplättchen pipettiert werden konnte. Als Verdunstungsschutz wurde zusätzlich etwas Medium um das Glasplättchen pipettiert. Damit die Zellen adhäreren konnten, wurden sie bis zu zwei Stunden im Inkubator kultiviert. Nach Adhäsion der Zellen wurde das Kulturschälchen mit 2 ml Kulturmedium vorsichtig aufgefüllt und daraufhin die Zellen über Nacht inkubiert. Im Folgenden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Behandlung mit Dexamethason (100 nmol/l) im Medium wurde für 24 h durchgeführt. 30 min vor Inkuabtionsende wurde das Medium mit 3 μ mol/l Akti-1/2 (Stammlösung 3 mmol/l) versetzt. Die Fixierung der Zellen und Immunfluoreszenzfärbung erfolgte wie in Kapitel 4.2.1.6. beschrieben.

4.2.5. Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm S.E.M. angegeben. Als 'n' ist die Nummer der unabhängigen Experimente angegeben, die in die Auswertung einbezogen wurden. Unabhängig bedeutet in dieser Arbeit das Verwenden von Zellen unabhängiger Passagen, bzw. isolierte Inseln verschiedener Mäuse. Alle Daten wurden unter Verwendung des Student's t-test, ANOVA und Keuls-Student-test als *post-test* auf ihre Signifikanz untersucht. Ergebnisse, die ein p-Wert $<0,05$ ergaben, wurden als statistisch signifikant bewertet.

5. Ergebnisse

5.1. Molekulare Effekte des Glukokortikoid-Analoga Dexamethason in INS-1E Zellen

5.1.1. Dexamethason reduziert die Aktivität von AKT ohne die Phosphorylierung von FOXO1 zu erniedrigen

Es wurde gezeigt, dass eine Langzeitwirkung von Glukokortikoiden zu einer verringerten Aktivität von AKT führt und eine Hemmung von FOXO1 vor Glukokortikoid-induzierter Apoptose schützt ²³². Erstaunlicherweise konnten wir in INS-1E Zellen trotz einer erniedrigten AKT-Phosphorylierung an Ser473 nach Dexamethason-Behandlung (100 nmol/l, 24 h) (Abb. 5.1a) eine signifikant verstärkte Phosphorylierung des AKT Substrates FOXO1 an Ser256 (Abb. 5.1b) und Ser319 (Abb. 5.1c) feststellen. Gleichzeitig wurde auch eine signifikante Erhöhung des Gesamtproteins von FOXO1 (Abb. 5.1d) detektiert. Das Verhältnis der Phosphorylierung von FOXO1 zur Proteinkonzentration ergab keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung, weder an Ser256 (Abb. 5.1e) noch an Ser319 (Abb. 5.1f). Übereinstimmend wurde FOXO1 nach immunfluoreszenter Anfärbung überwiegend im Zytosol detektiert, unter Kontrollbedingungen, als auch nach einer Behandlung mit Dexa für 4, 24 und sogar nach 48 h (Abb. 5.1g).

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass FOXO1, trotz einer signifikanten Reduktion der AKT-Aktivität unter Glukokortikoid-Exzess phosphoryliert und zytosolisch bleibt und somit nicht aktiviert wird. Es stellt sich nun die Frage, über welche Mechanismen die Proteinmenge von FOXO1 erhöht wird und FOXO1 phosphoryliert und zytosolisch lokalisiert bleibt.

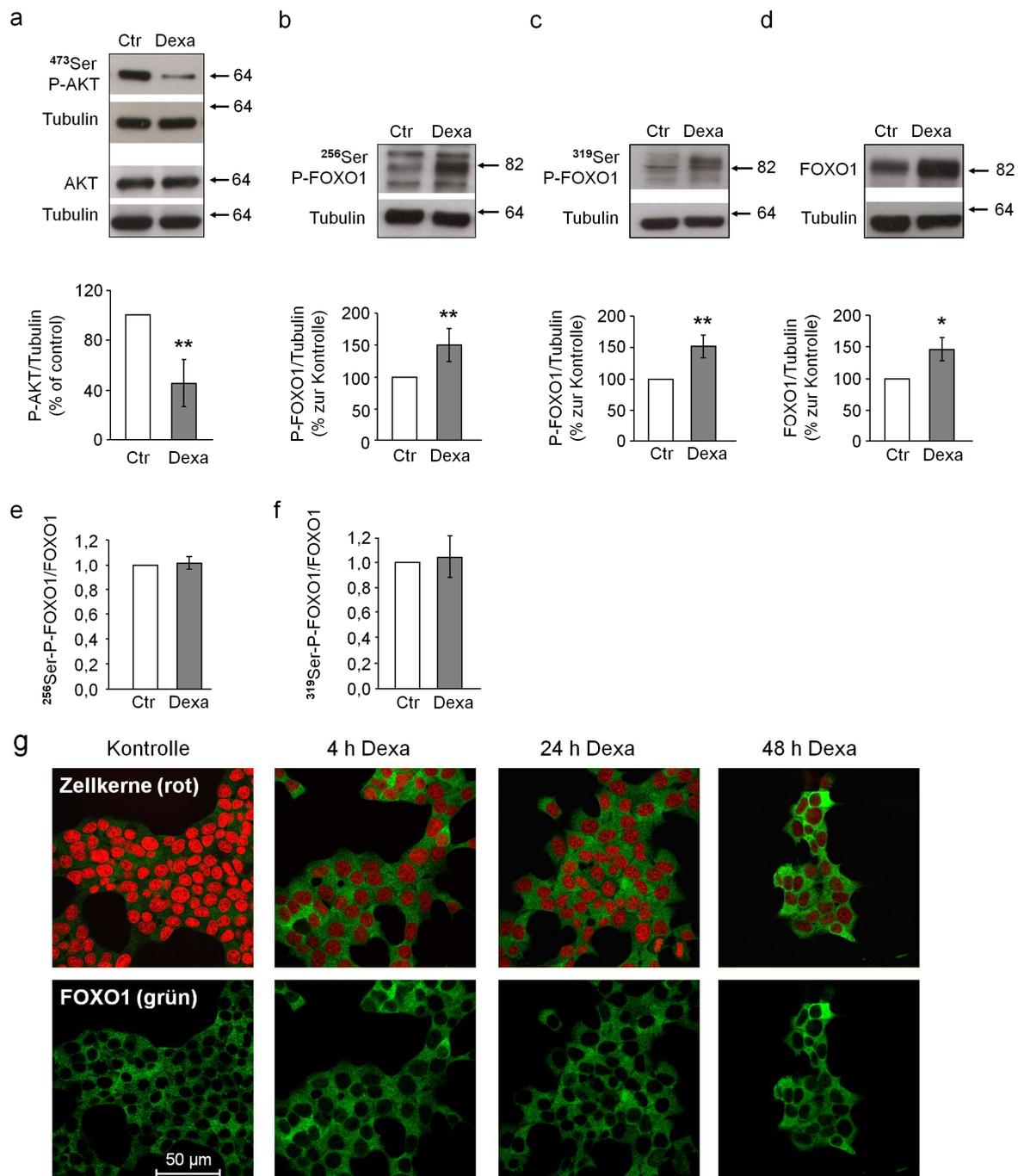


Abbildung 5.1: Dexa reduziert die Phosphorylierung von AKT. Erhöhte Gesamtprotein-mengen von FOXO1 bleiben phosphoryliert und in der Zelle zytosolisch lokalisiert

Die Zellen wurden für 24 h mit Dexamethason (100 nmol/l) behandelt. Abb. (a-c) zeigen repräsentative Westernblots und Mittelwerte \pm SEM von n= 3-5 unabhängigen Experimenten von a) Ser473 P-AKT, b) Ser256 P-FOXO1, c) Ser319 P-FOXO1 und d) FOXO1. Tubulin wurde als Referenzprotein detektiert. Abb. (e-f) zeigen das Verhältnis von e) Ser256 P-FOXO1 und f) Ser319 P-FOXO zu FOXO1 von n=6 unabhängigen Experimenten. Abb. g) zeigt repräsentative Aufnahmen konfokaler Mikroskopie nach immunfluoreszenter Anfärbung von FOXO1 (in grün). Die DNA der Zellkerne ist mit TOPRO angefärbt (in rot). *(p<0,05), **(p<0,01) bezeichnet eine Signifikanz zu unbehandelten Kontrollzellen (Ctr); Massenangaben der Proteine in kDa

5.1.2. Dexamethason stimuliert die Transkription von FoxO-Isoformen Glukokortikoidrezeptor-abhängig

Als nächstes wurde untersucht, ob Dexa parallel zu der erhöhten Proteinmenge auch die mRNA-Menge von *FoxO1* erhöht. Die mRNA Mengen der *FoxO*-Isoformen 1, 3 und 4 wurden nach 4, 24 und 48 h Dexa-Behandlung mittels quantitativer RT-PCR untersucht. *Gapdh* wurde als Referenzgen verwendet.

Die Auswertung von drei unabhängigen Versuchen zeigt, dass *FoxO1* und *FoxO3* die am stärksten exprimierten Isoformen (13 Kopien *FoxO1/Gapdh**1000; 10 Kopien *FoxO3/Gapdh**1000) im Vergleich zu *FoxO4* (0,3 Kopien *FoxO4 /Gapdh**1000), welches 30 mal geringer exprimiert ist, in INS-1E Zellen sind (Abb. 5.2a). Die Menge der *FoxO1* mRNA stieg bereits nach 4 Stunden Dexa-Behandlung, auf das 1,8fache an und war nach 48 Stunden auf das 2,3fache angestiegen (Abb. 5.2b). Die *FoxO3* (Abb. 5.2c) und *FoxO4* (Abb. 5.2d) mRNA war erst nach 24 Stunden signifikant erhöht, und stieg bis auf das 1,7fache nach 48 Stunden.

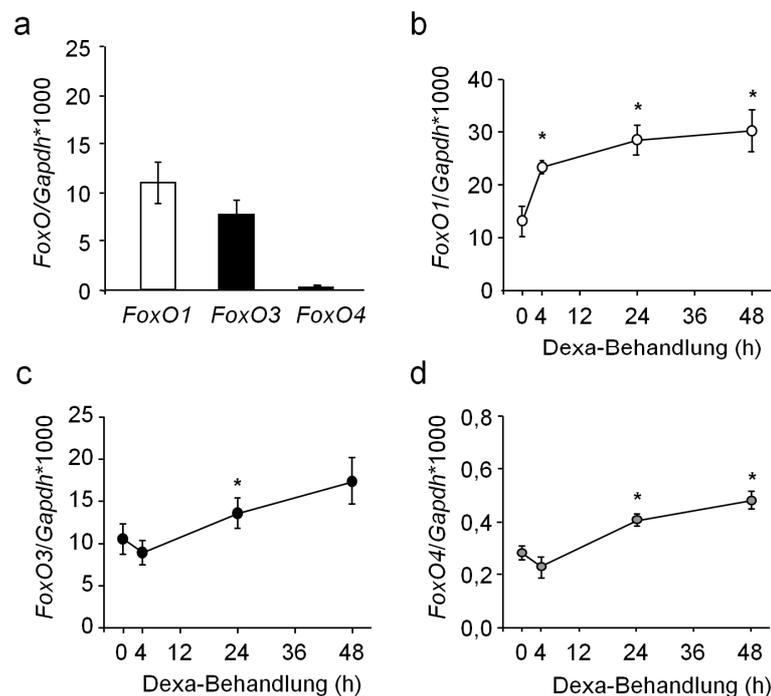


Abbildung 5.2: Effekte von Dexa auf die Transkription der FoxO-Isoformen

(a) Aus Kontrollzellen oder (b-d) Zellen, die mit Dexamethason (100 nmol/l) wie angezeigt behandelt wurden, wurde die RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. qRT-PCR wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die relativen mRNA-Mengen sind als Mittelwerte ± SEM von n = 3-6 unabhängigen Experimenten grafisch dargestellt. *(p<0,05), ***(p<0,01) bezeichnet eine Signifikanz gegenüber den unbehandelten Zellen.

Diese erhöhte Transkription könnte über die Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors (GK-R) vermittelt werden. Um dies zu untersuchen, wurden Zellen für 24 h mit Dexa, sowie parallel zu Dexa in Anwesenheit des Glukokortikoidrezeptor-Inhibitors Mifepristone (RU486; 10 $\mu\text{mol/l}$) behandelt. Anschließend wurde die mRNA von *FoxO1*, 3 und 4 mittels qRT-PCR quantifiziert. Tatsächlich wurde die unter Dexa-Behandlung gemessene Induktion der *FoxO1* (Abb. 5.3a), 3 (Abb. 5.3b) und 4 (Abb. 5.3c) mRNA vollständig durch RU468 gehemmt.

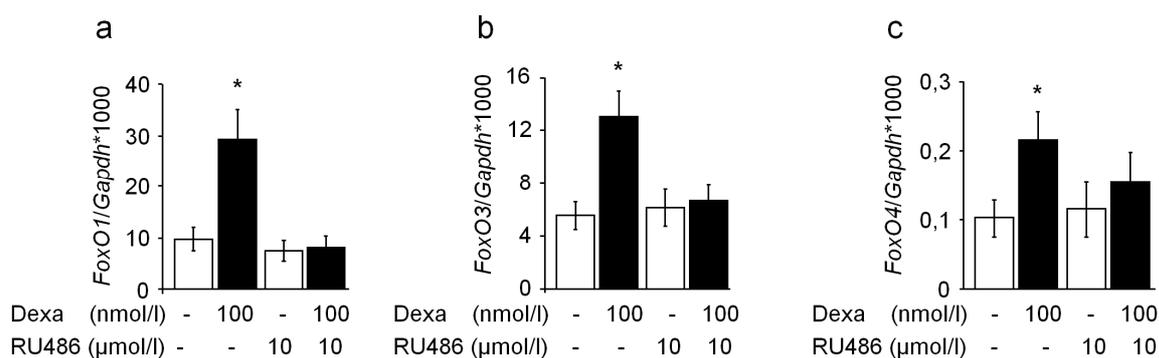


Abbildung 5.3: Der Glukokortikoidrezeptor-Inhibitor Mifepristone hemmt die Dexa-induzierte Transkription der *FoxO*-Isoformen

Zellen wurden mit Dexa (100 nmol/l für 24 h) und Mifepristone (RU486, 10 $\mu\text{mol/l}$ für 24 h) wie angegeben behandelt. qRT-PCR wurde wie in den Methoden beschrieben durchgeführt. Die mRNA Mengen für a) *FoxO1*, b) *FoxO3* und c) *FoxO4* sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 4$ unabhängigen Experimenten grafisch dargestellt. *Gapdh* diene als Referenzgen. *($p < 0,05$) bezeichnet eine Signifikanz zu den unbehandelten Zellen.

Somit liegt der Dexa-induzierten Erhöhung des FOXO-Proteins eine Aktivierung der Transkription in Abhängigkeit des Glukokortikoidrezeptors zu Grunde.

5.1.3. Die Transkription von *Sgk1*, nicht aber der Akt-Isoformen, wird durch Dexamethason Glukokortikoidrezeptor-abhängig stimuliert

Dexa könnte die starke Phosphorylierung von FOXO1 auch durch eine erhöhte Transkription der möglichen FOXO1-phosphorylierenden Kinasen AKT und SGK hervorrufen. Aus diesem Grund wurden im Folgenden die mRNA-Mengen der Akt-Isoformen *Akt1*, 2 und 3, sowie der *Sgk*-Isoformen 1, 2 und 3 nach Dexa-Behandlung für 4, 24 und 48 h mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR analysiert.

Von den drei AKT-Isoformen ist *Akt1* die am höchsten exprimierte Isoform (entsprechend *Akt1*, 2, 3: 17; 2; 4 *Akt/Gapdh**1000) (Abb. 5.4a). *Sgk1* ist die am Stärksten exprimierte *Sgk*-Isoform (entsprechend *Sgk1*, 2; 3: 10; 0,1; 1,7 *Sgk/Gapdh**1000) und die mRNA-Menge ist ähnlich hoch, wie die von *Akt1*. Am niedrigsten waren die *Sgk2* mRNA-Spiegel (Abb. 5.4b). Die mRNA Menge der *Akt*-Isoformen wurde durch Dexa nicht signifikant beeinflusst (Abb. 5.4c-e). *Sgk1* war die einzige Isoform der *Sgk*, die durch Dexamethason bereits nach 4 Stunden massiv (200fach) induziert wurde (Abb. 5.4f). Die Menge der *Sgk3* mRNA war nach 4 Stunden um 50% reduziert, nach 24 und 48 Stunden Behandlung mit Dexa allerdings wieder auf dem basalen Niveau (Abb. 5.4h). Die geringe Menge an *Sgk2* mRNA wurde durch Dexa nicht beeinflusst (Abb. 5.4g).

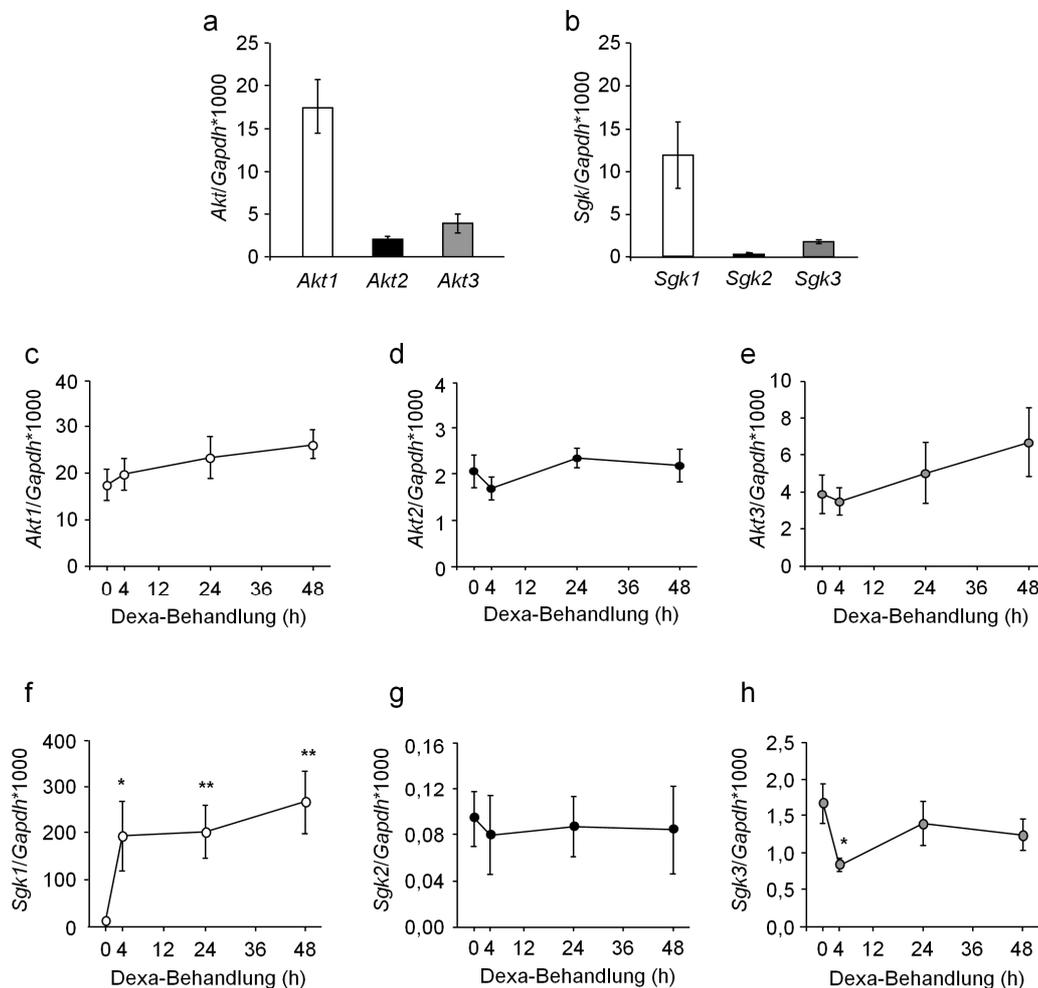


Abbildung 5.4: Effekte von Dexa auf die Transkription der *Akt*- und *Sgk*-Isoformen

Die mRNA Mengen, dargestellt als Mittelwerte \pm SEM von $n = 3-6$ unabhängigen Experimenten, wurden mittels qRT-PCR aus (a-b) Kontrollzellen und (c-h) Zellen nach Dexa-Behandlung (100 nmol/l, Zeiten wie angegeben) bestimmt. Abb a) zeigt die Ergebnisse für die *Akt*-Isoformen, Abb b) für die *Sgk*-Isoformen, Abb. (c - h) zeigt die zeitabhängigen Effekte der Dexa-Behandlung von c) *Akt1*, d) *Akt2*, e) *Akt3*, f) *Sgk1*, g) *Sgk2* und h) *Sgk3*. *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) bezeichnet eine Signifikanz zu unbehandelten Zellen.

Mit Hilfe des Glukokortikoidrezeptor-Inhibitors Mifepristone (RU486) wurde als nächstes untersucht, ob die Transkription der *Sgk1* durch den Glukokortikoidrezeptor vermittelt wird. Die mRNA Menge von *Sgk1* unter Dexa-Behandlung wurde in An- und Abwesenheit des GK-R-Hemmstoffes Mifepristone ermittelt. Tatsächlich wurde die hochsignifikante Induktion von *Sgk1* durch Dexa in Anwesenheit des GK-R-Inhibitors vollständig unterdrückt (Abb. 5.5).

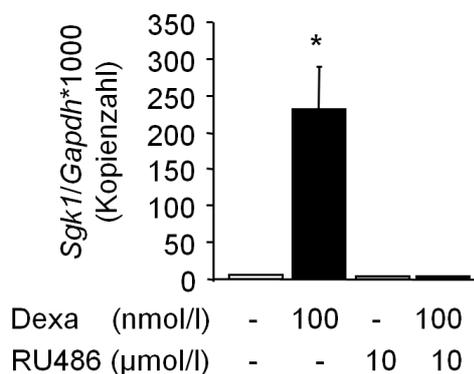


Abbildung 5.5: Der Glukokortikoidrezeptor-Inhibitor Mifepristone hemmt die Dexa-stimulierte Transkription von *Sgk1*

Zellen wurden mit Dexa (100 nmol/l für 24 h) und Mifepristone (RU486, 10 µmol/l für 24 h) wie angegeben behandelt. Die durch qRT-PCR-Analyse ermittelten mRNA Mengen von *Sgk1* sind als Mittelwerte \pm SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. *(p<0,05) bezeichnet eine Signifikanz zur unbehandelten Kontrolle.

Diese Daten zeigen zum einen, dass die mRNA Level der *Akt*-Isoformen durch Dexa nicht verändert werden. Zum anderen zeigen sie aber auch, dass die *Sgk1* mRNA abhängig von der Induktion des Glukokortikoidrezeptors massiv ansteigt, wohingegen die Isoformen 3 und 4 nicht beeinflusst werden. Ob sich diese erhöhte mRNA Menge der *Sgk1* auch in einer erhöhten Proteinmenge widerspiegelt, wurde im nächsten Schritt untersucht. Mittels zweier Methoden, dem Westernblot (Abb. 5.6a) und der Immunfluoreszenzanfärbung (Abb. 5.6b) konnte tatsächlich eine signifikante Induktion des SGK1-Proteins nach 24 h Dexa-Behandlung nachgewiesen werden. Die Bilder konfokaler Mikroskopie zeigen eine sehr starke zytosolische, sowie nukleäre Färbung der SGK1 (Abb. 5.6b). Diese Daten bestätigen, dass SGK1 in INS-1E Zellen unter Glukokortikoid-Stress vermehrt synthetisiert wird und in der Zelle akkumuliert.

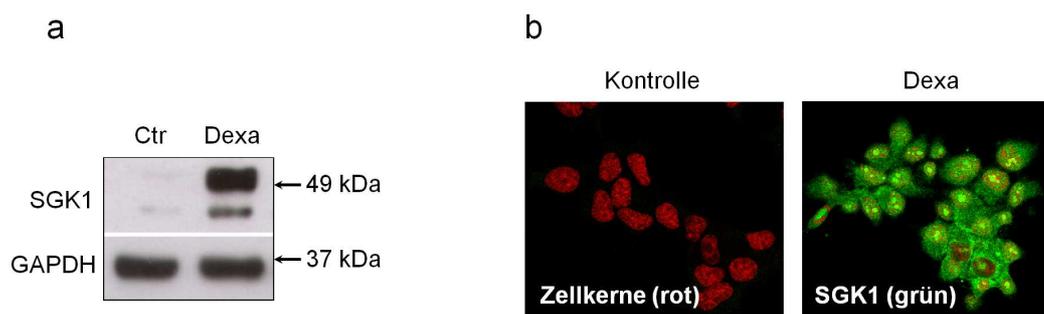


Abbildung 5.6: Dexa induziert die Synthese von SGK1

INS-1E Zellen wurden für 24 h mit Dexa (100 nmol/l) in Standardkultur behandelt. Abb. a) zeigt einen repräsentativen Westernblot von SGK1 und GAPDH als Referenzgen. Abb. b) zeigt repräsentative Aufnahmen konfokaler Mikroskopie: SGK1 (in grün) wurde immunfluoreszent, die DNA der Zellkerne (in rot) wurde mit TOPRO angefärbt.

5.2. Die Regulation von FOXO1 in Glukokortikoid-exponierten INS-1E Zellen

5.2.1. FOXO1 wird nicht von SGK1 phosphoryliert

In Anbetracht der reduzierten Aktivität von AKT, dargestellt durch eine reduzierte Phosphorylierung von AKT an Ser473, auf der einen Seite und einer massiven Induktion der SGK1 auf der anderen Seite, stellt sich die Frage, ob SGK1 für die bestehende Phosphorylierung erhöhter FOXO1-Proteinmengen unter Glukokortikoid-Exzess verantwortlich ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde in folgenden Experimenten die FOXO1-Phosphorylierung und subzelluläre Lokalisation in INS-1E Zellen untersucht, in denen die Expression oder Aktivität der SGK1 spezifisch verändert war.

5.2.1.1. Transfektion von INS-1E Zellen mit spezifischer siRNA gegen *Sgk1*

Um die Dexa-induzierte Synthese von SGK1 zu unterdrücken, wurden Zellen mit spezifischer siRNA gegen *Sgk1* transfiziert und daraufhin mit Dexa für 24 Stunden behandelt. Im Westernblot (Abb. 5.7) ist die erfolgreiche starke Verringerung der Dexa-vermittelten Expression von SGK1 durch siRNA im Vergleich zu den Kontrollzellen und den Zellen, die mit unspezifischer siRNA transfiziert wurden, sehr gut zu erkennen. Die Dexa-vermittelte Erhöhung des FOXO1-Proteins, sowie dessen Phosphorylierungs-

zustand an Serin256 und Serin319 wurden allerdings durch die Behandlung mit *siSgk1* nicht beeinflusst.

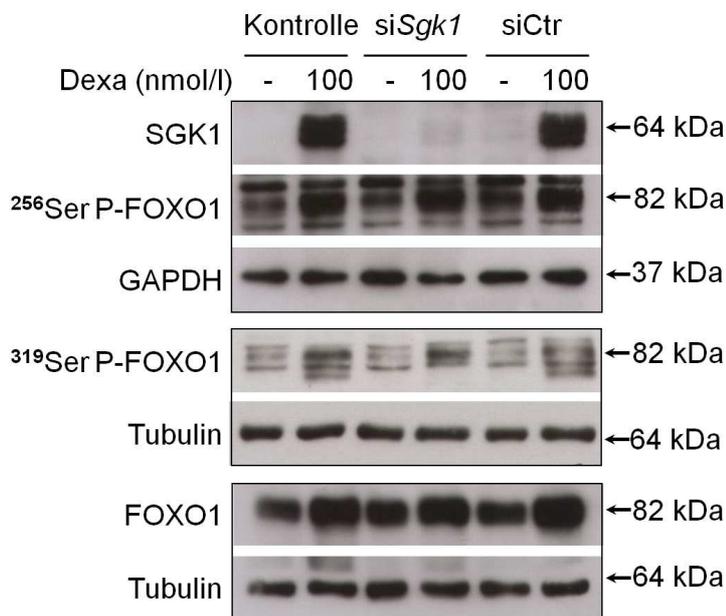


Abbildung 5.7: Transfektion mit *siSgk1* beeinflusst nicht die Phosphorylierung von FOXO1

Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben mit *siSgk1* oder siCtr transfiziert. Diese und untransfizierte Zellen (Kontrolle) wurden mit Dexa (100 nmol/l für 24 h) behandelt und anschließend lysiert. Die Proteine und deren Phosphorylierung wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und der Westernblot-Analyse detektiert.

SGK1 scheint somit nicht an der bestehenden Phosphorylierung von FOXO1 unter Glukokortikoid-Behandlung beteiligt zu sein.

5.2.1.2. Transfektion von INS-1E Zellen mit konstitutiv aktiver oder Kinase-inaktiver SGK1

Im nächsten Schritt wurden INS-1E Zellen mit konstitutiv aktiver (SGK1SD) oder dominant negativer (SGK1KN) SGK1 transfiziert. Die konstitutiv aktive Form der SGK1 (S422DSGK1) enthält einen Aminosäureaustausch von Ser422 gegen Aspartat. Die inaktive Mutante wird durch einen Austausch von Lys127 mit Asparagin, was zu einer Inaktivierung der katalytischen Untereinheit führt, hergestellt (K127NSGK1)^{233 128}. Die Plasmide wurden von Monica Palmada und Florian Lang (Physiologisches Institut der Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Die erfolgreiche Transfektion der Zellen mit den Plasmiden ist im Westernblot in der Abbildung 5.8 zu sehen. In den unbehandelten Zellen ist keine Bande für SGK1 zu erkennen, wohingegen Dexa zu einer deutlichen Induktion von SGK1 führte. Die Expression der konstitutiv aktiven SGK1 führte zu keiner erhöhten Phosphorylierung

von FOXO1, weder an Ser256 noch an Ser319. Die dominant negative Form der SGK1 beeinflusste ebenfalls nicht die basale Phosphorylierung von FOXO1.

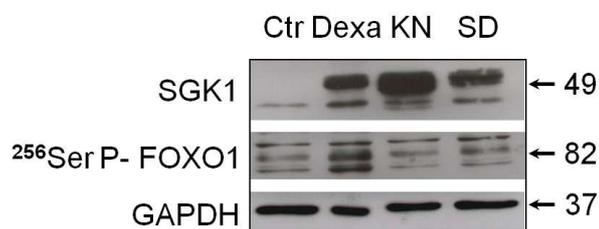


Abbildung 5.8: Veränderte Aktivität von SGK1 beeinflusst nicht die Phosphorylierung von FOXO1

INS-1E-Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben mit einer Kinase-inaktiven (KN) oder konstitutiv aktiven (SD) SGK1 transfiziert und mit Dexa (100 nmol/l für 24 h) behandelt. Gezeigt sind Westernblot-Analysen für SGK1, Ser256 P-FOXO1, FOXO1 und GAPDH als Referenzprotein.

Diese Ergebnisse bestätigen somit die Versuche mit siRNA gegen *Sgk1*, dass FOXO1 kein Substrat der SGK1 in INS-1E Zellen zu sein scheint.

5.2.1.3. Effekte des Zellkulturmediums auf die zelluläre Lokalisation von FOXO1 in INS-1E Zellen

Die bisherigen Versuche wurden in Vollmedium, welches 10% FCS und 11 mmol/l Glukose enthielt, durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sezernieren INS-1E Zellen kontinuierlich Insulin ins Medium, welches dort akkumuliert und zelluläre Signalwege beeinflussen kann. Die folgenden Experimente sollten nun unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass möglichst keine Stimulation der Zellen durch zusätzliche Komponenten wie FCS oder hoher Glukosekonzentration stattfindet. Ob allein der Wechsel von Vollmedium zu Krebs-Ringer-Puffer (KRB) (vgl. 4.2.1.2.) die zelluläre Lokalisation von FOXO1 beeinflusst, wurde zunächst untersucht. Hierfür wurden INS-1E Zellen in Vollmedium mit Dexa (4, 24, 48 h) behandelt. Ein Teil der Zellen wurde in serumfreien Kulturmedium mit Dexa behandelt und daraufhin für eine weitere Stunde in Dexa enthaltendem KRB mit einem niedrigen Glukosegehalt von 2,8 mmol/l und einem niedrigem Albumingehalt von 0,1% inkubiert. Der andere Teil der Zellen wurde im Vergleich fortlaufend in Vollmedium kultiviert. Die Bilder nach immunfluoreszenter Anfärbung von FOXO1 (Abb. 5.9) zeigen, dass FOXO1 nach Inkubation in Vollmedium

sowie nach einem Wechsel zu KRB, überwiegend im Zytosol lokalisiert bleibt. Dexamethason war unter stimulierenden (Vollmedium), sowie auch nicht-stimulierenden (KRB) Bedingungen nicht in der Lage, FOXO1 in den Zellkern zu bringen.

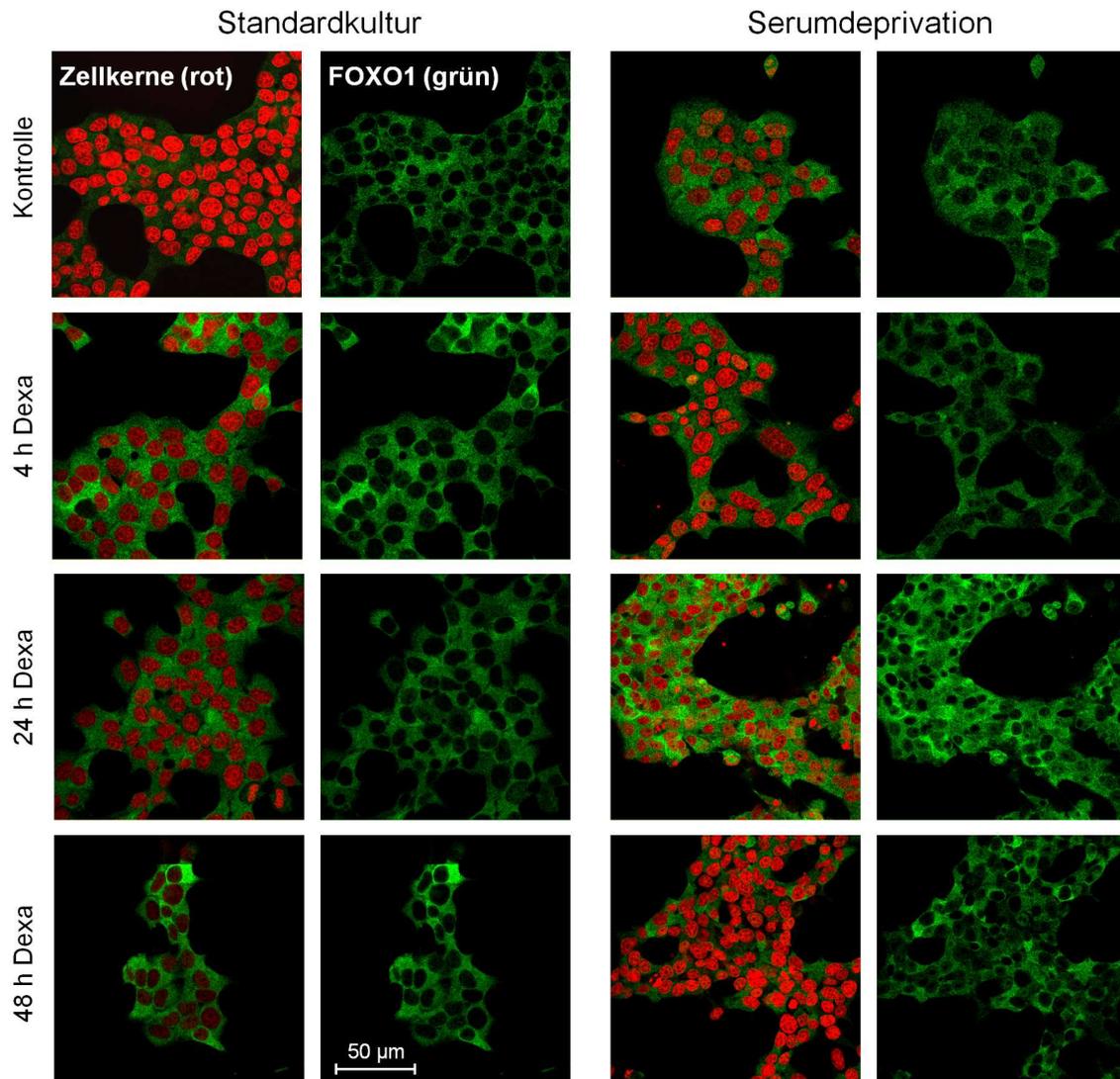


Abbildung 5.9: Serumfreie Zellkultur hat keinen Effekt auf die zytosolische Verteilung von FOXO1

Zellen wurden wie angezeigt mit Dexa (100 nmol/l) behandelt. Für die Serumdeprivation wurde die Behandlung in serumfreiem Kulturmedium mit anschließender Inkubation in KRB (2,8 mmol/l Glukose, 0,1% Albumin) durchgeführt. Gezeigt sind Bilder konfokaler Mikroskopie nach immunfluoreszenter Anfärbung von FOXO1 (in grün) und Anfärbung der DNA in den Zellkernen mit TOPRO (rot).

Aus diesen Experimenten wurde geschlussfolgert, dass weitere Versuche in KRB-Lösung mit niedriger Glukose (2,8%) und niedrigem Albumingehalt (0,1%) durchgeführt werden können.

5.2.1.4. Behandlung der Zellen mit dem spezifischen SGK1- Inhibitor GSK650394

Unter diesen (vgl. 5.2.1.3.) kontrollierten Bedingungen wurde die Aktivität der SGK1 pharmakologisch gehemmt. Ein spezifischer Inhibitor gegen SGK1, GSK650394 (SGKi), ¹⁰⁷ (vgl. 2.3.3.) wurde eingesetzt und dessen Effekt auf die Phosphorylierung und zelluläre Translokation von FOXO1 analysiert. Die IC₅₀ Werte des Hemmstoffes liegen bei 62 und 103 nmol/l für SGK1, bzw. SGK2 ¹⁰⁷. Deswegen wurde der Inhibitor in zwei Konzentrationen, 1 µmol/l und 10 µmol/l, eingesetzt, um dessen Wirkung auf die Phosphorylierung von FOXO1 unter Dexamethason-Behandlung zu untersuchen. Im Westernblot ist zu erkennen, dass der Inhibitor in beiden Konzentrationen keinen Effekt auf die Phosphorylierung hat (Abb. 5.10a). Da 1 µmol/l die Phosphorylierung von FOXO1 nicht hemmte, wurde SGKi in den folgenden Experimenten mit einer Konzentration von 10 µmol/l eingesetzt. Zudem wurde die Effektivität des Inhibitors auf die Phosphorylierung des bekannten spezifischen SGK1-Substrates NDRG1 an Thr346 (vgl. 2.3.3.) getestet. In Abbildung 5.10b ist ein entsprechender Westernblot der Versuchsreihe abgebildet. Die Phosphorylierung von NDRG an Thr346 wird wie erwartet durch Dexamethason induziert. Der SGK1-Hemmstoff GSK650394 hemmt diese Dexa-abhängige Induktion der Phosphorylierung in einer Konzentration von 10 µmol/l.

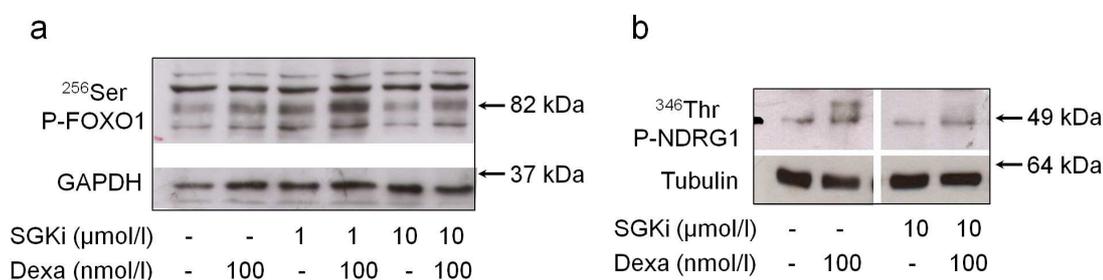


Abbildung 5.10: Konzentrationsabhängigkeit des SGK1-Inhibitors GSK650394

Kontrollzellen oder Dexa-behandelte (100 nmol/l für 24 h) Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben für 30 Minuten mit 0, 1 oder 10 µmol/l SGK1-Inhibitor GSK650394 (SGKi) in KRB inkubiert. Westernblot-Analysen für a) Ser256 P-FOXO1 mit Tubulin und b) Thr346 P-NDRG1 mit GAPDH sind gezeigt.

Diese Ergebnisse weisen auf eine spezifische Wirkung des Inhibitors gegen SGK1 hin.

Im Folgenden wurde die Wirkung des SGK1-Hemmstoffes auf die Phosphorylierung von Serin319 von FOXO1 in den Zellen nach Dexa-Behandlung untersucht. Im abgebildeten Westernblot (Abb. 5.11a) ist zu erkennen, dass SGK1 keine Wirkung auf die Phosphorylierungen von Ser319, und wie bereits in Abbildung 5.10a gesehen, von Ser256 hat. Die statistische Auswertung der Westernblots von n = 3 unabhängigen Versuchen für Ser256 P-FOXO1 in Abbildung 5.11a veranschaulicht diese Beobachtung. Die Erhöhung der Proteinmenge von FOXO1 durch Dexamethason wird durch den Inhibitor auch nicht verändert. Um eine SGK1-Aktivierung zu gewährleisten, wurde die Versuchsreihe mit zusätzlicher zehnminütiger Stimulation mit IGF-1 (50 ng/ml) wiederholt. Abgesehen von einer erwarteten stärkeren Phosphorylierung von FOXO1 unter Stimulation mit IGF-1, unterschieden sich die Ergebnisse hinsichtlich der Effekte des Inhibitors nicht zu denen ohne IGF-1 Stimulation (Abb. 5.11b).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen veränderte der SGK1-Inhibitor auch die zelluläre Verteilung von FOXO1 nicht. Abbildung 5.11c zeigt deutlich, dass FOXO1 in Kontrollzellen und Dexa-behandelten Zellen unabhängig von der Anwesenheit des Inhibitors vornehmlich zytosolisch vorliegt und die Kerne dagegen ausgespart bleiben.

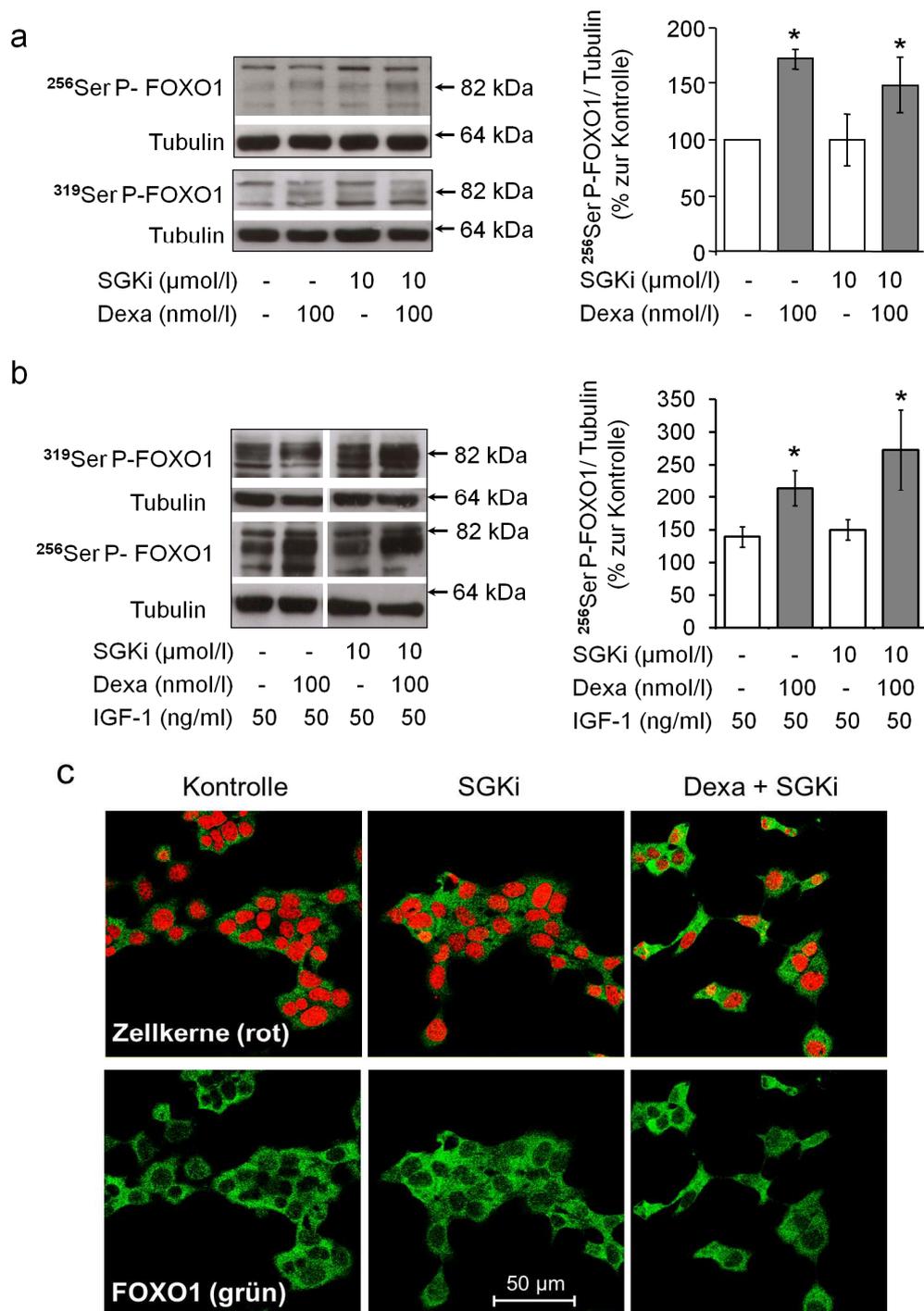


Abbildung 5.11: Der SGK1-Inhibitor hat keinen Effekt auf die Phosphorylierung und zelluläre Verteilung von FOXO1

Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben behandelt. (a-b) Gezeigt sind repräsentative Westernblots für Ser256 P-FOXO1, Ser319 P-FOXO1, FOXO1 und Tubulin, sowie die Mittelwerte \pm SEM von $n = 5$ unabhängigen Experimenten nach Inkubation der Zellen mit a) SGK1-Inhibitor GSK650394 (SGKi) oder b) SGKi und Stimulation mit IGF-1 (50 ng/ml für 10 min). c) Repräsentative Bilder konfokaler Mikroskopie zeigen FOXO1 (in grün) nach immunfluoreszenter Anfärbung und Zellkerne (in rot) durch TOPRO visualisiert. *($p < 0,05$) bezeichnet eine Signifikanz zur Kontrolle (unbehandelte Zellen).

Diese Ergebnisse unterstützen die bisherigen Ergebnisse, dass FOXO1 kein Substrat der SGK1 in INS-1E Zellen ist. Die starke Phosphorylierung von FOXO1 unter Dexamethason-Exposition ist demnach nicht durch die massive Proteinanreicherung von SGK1 zu erklären.

5.2.2. Rolle der upstream Kinasen AKT und ERK in der Regulation von FOXO1 unter Gabe von Dexamethason

5.2.2.1. Behandlung der Zellen mit dem MEK1-Inhibitor PD98059

Interessanterweise konnte eine Induktion der Phosphorylierung von ERK1/2 nach der Behandlung mit Dexamethason beobachtet werden (Abb. 5.12). Es wurde bereits gezeigt, dass FOXO1 auch ein Substrat der ERK1/2-Kinasen ist (vgl. 2.3.4.). In Anlehnung daran wurde untersucht, ob der MEK1-Inhibitor PD98059 zu einer verringerten Phosphorylierung von FOXO1 führt. Der repräsentative Westernblot in Abbildung 5.12 zeigt, dass PD98059 die Dexa- und IGF-1- induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 vollständig hemmt. Dies verdeutlicht, dass der Hemmstoff ERK1/2 effektiv hemmt. Allerdings war die Phosphorylierung von FOXO1 an Ser256 nicht reduziert. Auch die Erhöhung des FOXO1-Gesamtproteins wurde durch den MEK1-Inhibitor nicht beeinflusst.

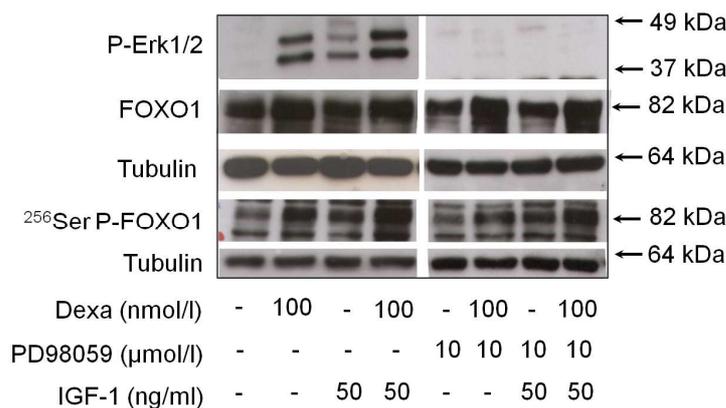


Abbildung 5.12: Der MEK1- Inhibitor PD98059 hemmt die Phosphorylierung von ERK1/2 aber nicht die Phosphorylierung von FOXO1

Kontrollzellen und Dexamethason-behandelte (100 nmol/l für 24 h) Zellen wurden in An- oder Abwesenheit des Inhibitors PD98059 (10 μmol/l für 24 h) wie angezeigt inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde mit IGF-1 (50ng/ml für 10 min) stimuliert. Gezeigt sind Westernblot Analysen für P-ERK1/2, Ser256 P-FOXO1, FOXO1 und Tubulin.

Diese Versuchreihe zeigt, dass ERK1/2 unter Glukokortikoid-Behandlung in INS-1E Zellen zwar aktiviert wird, aber wahrscheinlich keine Rolle für die Phosphorylierung von FOXO1 spielt.

5.2.2.2. Behandlung der Zellen mit dem AKT-Inhibitor Akti-1/2

Die Kinasen SGK1 und ERK1/2 scheinen somit keinen entscheidenden Einfluss auf die Phosphorylierung von FOXO1 und dessen zelluläre Verteilung unter Glukokortikoid-Exzess zu haben. Dies wirft die Frage auf, ob und welche AKT-Isoformen, trotz einer nachgewiesenen verringerten Phosphorylierung von pan-AKT FOXO1 phosphoryliert halten.

Um die AKT-Aktivität zu modulieren wurden zunächst Experimente unter Verwendung des pan-AKT-Inhibitors Akti-1/2 durchgeführt. Der Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen (1 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$) des Hemmstoffes wurden getestet, um eine angemessene Konzentration für die folgenden Versuche zu definieren. Abbildung 5.13a zeigt, dass bereits der Einsatz von 1 $\mu\text{mol/l}$ zu einer Akkumulation von FOXO1 im Zellkern führte. Allerdings führte diese Konzentration noch nicht zu einer stabilen Hemmung der basalen Ser256 Phosphorylierung von FOXO1 (Abb. 5.13b). Erst die Konzentrationen von 3 $\mu\text{mol/l}$ und 10 $\mu\text{mol/l}$ führten zu einer signifikanten Hemmung dieser Phosphorylierung. In den folgenden Experimenten wurde Akti-1/2 in der geringeren Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt, um unspezifische Wirkungen durch zu hohe Konzentrationen zu vermeiden. Für Akti-1/2 sind folgende IC_{50} -Werte bekannt: 58 nmol/l, 210 nmol/l, und 2,12 $\mu\text{mol/l}$ entsprechend für AKT1, AKT2 und AKT3. Diese Zahlen wurden durch *in vitro* Kinase Assays definiert²³⁴. Bei einem Einsatz von 3 $\mu\text{mol/l}$ Akti-1/2, wie er in allen weiteren Experimenten stattfinden sollte, wird dementsprechend auch der größte Anteil der AKT3-Isoform gehemmt. Akti-1/2 wurde somit als pan-AKT-Inhibitor eingesetzt.

Als zusätzliche Kontrolle wurde untersucht, ob der Inhibitor die Phosphorylierung des AKT Substrates GSK-3 α/β an Ser9, bzw. Ser21 reduziert. Der Westernblot in Abbildung 5.13c zeigt, dass Dexa-Behandlung, trotz einer reduzierten AKT-Aktivität, auch eine erhöhte GSK-3 α/β Phosphorylierung zur Folge hat. Der AKT-Hemmstoff konnte aber deutlich diese Dexa-vermittelte GSK-3 α/β Phosphorylierung reduzieren. Im Vergleich

dazu hatte der SGK1-Hemmstoff keinen Effekt auf P-GSK-3 α (obere Bande), reduzierte aber die Phosphorylierung von GSK3 β (untere Bande). Diese Daten lassen auf eine Spezifität von Akti-1/2 für AKT schließen.

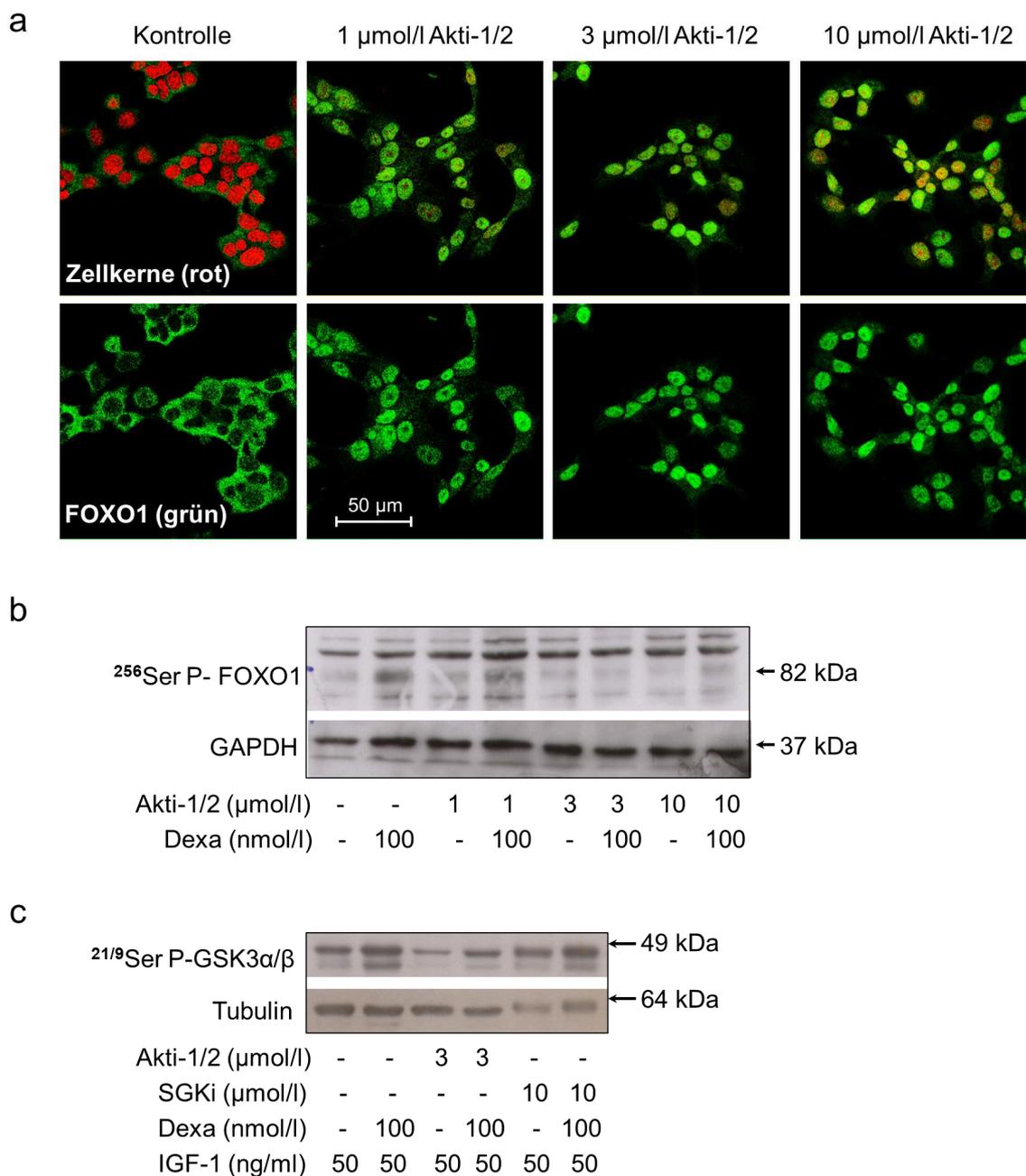


Abbildung 5.13: Die Konzentrationsabhängigkeit des pan-AKT-Inhibitors Akti-1/2 auf P-FOXO1 und P-GSK3 α/β

Zellen wurden wie angegeben und im Methodenteil beschrieben behandelt. a) FOXO1 (in grün) wurde immunfluoreszent und die DNA der Zellkerne (in rot) mit TOPRO angefärbt. Repräsentative Bilder konfokaler Mikroskopie sind gezeigt. (b-c) Repräsentative Westernblot-Analysen für b) Ser256 P-FOXO1 und GAPDH, sowie für c) Ser9/Ser21 P-GSK-3 α/β sind gezeigt. SGKi = SGK1-Inhibitor GSK650394

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Hemmung von AKT durch Akti-1/2 die Effekte von Dexa auf die Phosphorylierung und zelluläre Lokalisation von FOXO1 beeinflusst. Abbildung 5.14 veranschaulicht die Wirkungen des Inhibitors auf Ser256 P-FOXO1, Ser319 P-FOXO1 und die Gesamtmengen an FOXO1-Protein. Die genannten Phosphorylierungen wurden durch Behandlung mit Akti (3 $\mu\text{mol/l}$; 30 min) signifikant inhibiert. Dies konnte im Kontrollmedium, als auch unter gleichzeitiger Dexa-Behandlung nachgewiesen werden. Die statistische Auswertung der Westernblots drei unabhängiger Versuche in Abbildung 5.14a veranschaulicht die signifikante Hemmung der Phosphorylierung von FOXO1 an Ser256 durch Akti-1/2.

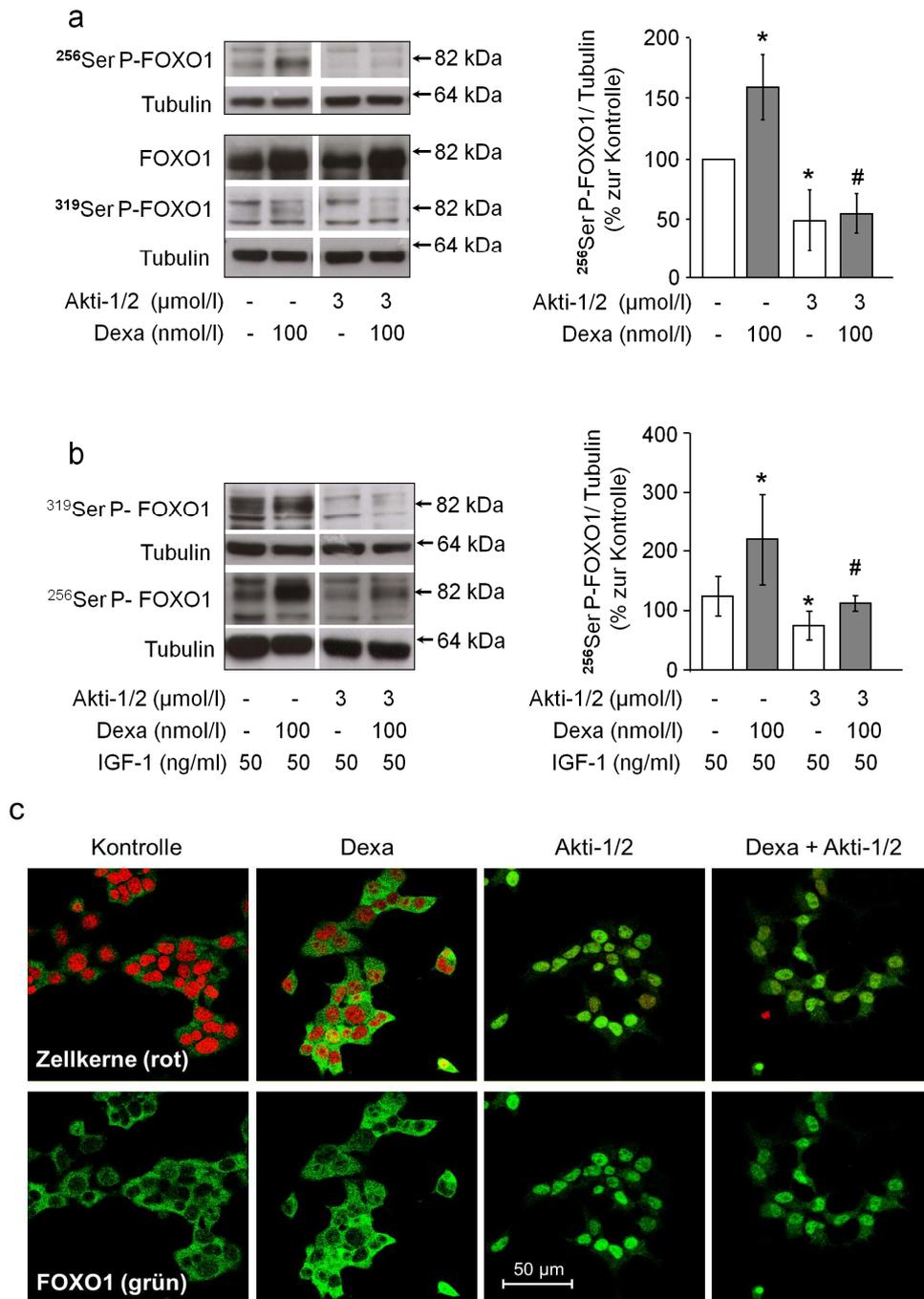


Abbildung 5.14: Akti-1/2 hemmt die Phosphorylierung von FOXO1 und führt zu dessen Akkumulation im Zellkern

INS-1E-Zellen wurden wie angegeben und im Methodenteil beschrieben mit Dexamethason (100 nmol/l für 24 h), Akti-1/2 (3 µmol/l für 30 min) und IGF-1 (50 ng/ml für 10 min) behandelt. (a-b) Repräsentative Westernblots für Ser256 P-FOXO1, Ser319 P-FOXO1, FOXO1 und Tubulin, sowie die Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ unabhängigen Experimenten nach Inkubation der Zellen mit a) pan-AKT-Inhibitor Akti-1/2 oder b) Akti-1/2 und Stimulation mit IGF-1. c) Repräsentative Bilder konfokaler Mikroskopie zeigen die zelluläre FOXO1 (in grün)-Verteilung nach immunfluoreszenter Anfärbung und die DNA der Zellkerne (in rot) durch TOPRO angefärbt. *($p < 0,05$) bezeichnet eine Signifikanz gegenüber den unbehandelten Zellen; #($p < 0,05$) bedeutet eine Signifikanz gegenüber Dexa-behandelten Zellen.

Um eine sichere AKT-Stimulation zu erreichen wurden diese Experimente unter Stimulation mit IGF-1 (50 ng/ml, 10 min) wiederholt. Der Inhibitor führte auch unter diesen Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung von FOXO1 an Ser256 und Ser319 (Abb. 5.14b). In Übereinstimmung dazu, bewirkte eine Hemmung von pan-AKT durch Akti auch eine Akkumulation des TFs im Zellkern. Dies konnte unter Kontrollbedingungen, sowie unter Behandlung mit Dexa festgestellt werden (Abb. 5.14c).

Diese Daten zeigen, dass eine vollständige Hemmung von AKT durch den Inhibitor, zum verstärkten Vorliegen von FOXO1 in dephosphorylierter Form führt und damit auch eine nukleäre Akkumulation des Transkriptionsfaktors zur Folge hat. Glukokortikoide hingegen bewirken dies nicht. AKT scheint somit der wesentliche Mediator der Regulation von FOXO1 zu sein.

5.2.2.3. Analyse der zellulären Verteilung von FOXO1 durch Fraktionierung von Zytosol und Kernen

Mit einer weiteren Methode sollte im Folgenden untermauert werden, dass Dexa zu keiner nukleären Akkumulation von FOXO1 führt, die Hemmung von AKT durch Akti-1/2 dieses aber hingegen bewirkt. Hierfür wurden nach entsprechender Behandlung das Zytosol und die Kerne von INS-1E-Zellen fraktioniert. Daraufhin wurden die darin enthaltenen Mengen von FOXO1 im Westernblot analysiert. GAPDH wurde zusätzlich als zytosolischer und Histon H1 als nukleärer Marker detektiert. Abbildung 5.15a zeigt Westernblots aus fünf unabhängigen Versuchen. Die erfolgreiche Trennung von Zytosol (linker Westernblot) und Kernen (rechter Westernblot) ist durch die Abwesenheit des nukleären Markers Histon H1 in der zytosolischen und der Abwesenheit des zytosolischen Markers GAPDH in der nukleären Fraktion zu erkennen. Weiter ist im Westernblot ein deutlicher Anstieg des FOXO1-Proteins im Zytosol, sowie auch im Kern nach Dexamethason-Behandlung zu erkennen, welcher signifikant war (Abb. 5.15b). Alleinige Behandlung mit Akti führte zu einem signifikanten Anstieg des FOXO1 Proteins im Kern, was im Zytosol aber unerwarteterweise nicht verändert. Die erhöhten Mengen von FOXO1-Protein nach Akti-Behandlung stehen im Einklang mit den vorherigen Beobachtungen. Bei diesen war nach Akti-Behandlung die Anfärbung von FOXO1 im Kern höher als im Zytosol (vgl. Abb. 5.14c).

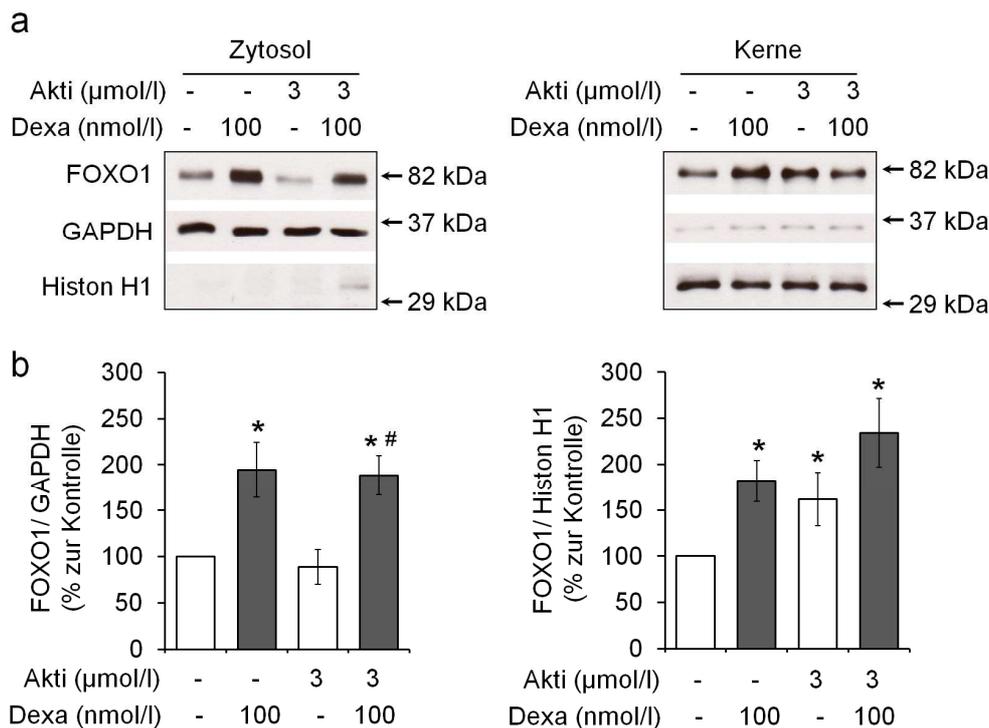


Abbildung 5.15: Dexa führt zu erhöhten FOXO1-Proteinmengen sowohl im Zytosol als auch im Zellkern

Zellen wurden wie angegeben für 24 h mit Dexa (100 nmol/l) und 30 min mit Akti-1/2 (Akti) behandelt und die zytosolische von der nukleären Fraktion getrennt. Dargestellt sind a) repräsentative Westernblots von FOXO1, Histon H1 als nukleärer und GAPDH als zytosolischer Marker, sowie b) die Mittelwerte \pm SEM von $n = 5$ unabhängigen Experimenten. *($p < 0,05$) bezeichnet eine Signifikanz gegenüber den unbehandelten Zellen; #($p < 0,05$) bedeutet eine Signifikanz gegenüber Akti-1/2-behandelten Zellen.

Die parallele Behandlung mit Dexa und Akti hatte eine Erhöhung des FOXO1-Proteins im Zytosol zur Folge. Diese Erhöhung war bei alleiniger Dexa-Behandlung ähnlich stark ausgeprägt. Die parallele Behandlung führte verglichen zu den Kontrollbedingungen zudem auch zu erhöhten FOXO1-Proteinmengen im Kern. Die nukleären Proteinmengen unterschieden sich nicht nach alleiniger Akti-, alleiniger Dexa- oder paralleler Behandlung mit Dexa und Akti-1/2 (Abb. 5.15b). Diese Methode weist somit auch eine Erhöhung des FOXO1-Gesamtproteins durch das synthetische Glukokortikoid nach. Die Akkumulation des TFs im Kern durch Akti-1/2-vermittelte pan-AKT-Inhibierung wird außerdem bestätigt. Unerwarteterweise war aber FOXO1 nach Dexa- sowie auch nach paralleler Dexa- und Akti-Behandlung im Zytosol und Zellkern erhöht. Im Gegensatz zur Darstellung der zellulären Verteilung von FOXO1 durch konfokale Mikroskopie, erlaubt

es der Westernblot nicht, die relativen Mengen von FOXO1 zwischen Zytosol und Zellkern zu vergleichen.

5.2.3. Phosphorylierung und zelluläre Lokalisation von FOXO1 ist abhängig von AKT1, AKT2 und AKT3

Bisher konnte die Translokation und Phosphorylierung von FOXO1 nur durch den pan-AKT-Inhibitor überzeugend verändert werden. Es bleibt aber die Frage offen, ob eine bestimmte Isoform von AKT im Speziellen für die Phosphorylierung und somit auch zytosolische Lokalisation von FOXO1, insbesondere unter Glukokortikoid-Exzess verantwortlich ist.

5.2.3.1. Herunterregulation einzelner Akt-Isoformen

Zur Untersuchung dieser Frage wurden mittels Transfektion Isoform-spezifischer siRNAs die einzelnen *Akt*-Isoformen herunterreguliert. Die Reduktion der entsprechenden mRNA wurde mittels qRT-PCR festgestellt und in Tabelle 5.1 zusammengefasst dargestellt: die einzelnen mRNA-Mengen waren bis auf $15,9 \pm 1,1\%$ für *Akt1*, $21,1 \pm 2,2\%$ für *Akt2* und bis auf $18,4 \pm 1,5\%$ für *Akt3* reduziert.

	<i>Akt/Gapdh</i>*1000 (% zur Kontrolle)		
	<i>Akt1</i>	<i>Akt2</i>	<i>Akt3</i>
si<i>Akt1</i>	20,5±5,0	89,1±5,2	n.d.
si<i>Akt2</i>	118,9±6,1	27,6±12,2	n.d.
si<i>Akt3</i>	65,0±2,5	116,4±11,6	23,5±5,1
si<i>Akt1/2</i>	13,2±3,1	13,5±1,6	n.d.
si<i>Akt2/3</i>	77,1±1,1	22,1±4,0	20,2±5,7
si<i>Akt1/3</i>	14,0±1,5	105,9±12,3	11,6±0,4
si<i>Akt1/2/3</i>	9,1±1,0	10,8±0,3	6,9±0,9

	si<i>Akt1</i>	si<i>Akt2</i>	si<i>Akt3</i>
mean (n=6)	16,0	21,1	18,4
SEM	1,08	2,20	1,47

Tabelle 5.1: Verbleibende mRNA Mengen nach spezifischem Knockdown der *Akt*-Isoformen mittels siRNA

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mittels qRT-PCR. Die mRNA Menge unter Kontrollbedingungen wurde auf 100% gesetzt. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von n = 3-6 unabhängigen Experimenten

Die erfolgreiche Verringerung der *Akt1*-Isoform wurde zudem auf Proteinebene im Westernblot nachgewiesen und ist deutlich in Abbildung 5.16a zu erkennen. Die Reduktion einer einzelnen Isoform *Akt1*, *Akt2* oder *Akt3* hatte allerdings keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von FOXO1, weder unter basalen Bedingungen, noch nach Dexa-Exzess (Abb. 5.16a). Auffallend ist, dass bei Reduktion von *Akt3* wiederholt die basale Phosphorylierung von FOXO1 erhöht vorlag. Diesem Phänomen wurde aber im Weiteren nicht nachgegangen. Desweiteren ist interessanterweise trotz der starken Reduzierung des AKT1-Proteins eine Phosphorylierung von panAKT an Ser473 zu detektieren (Abb. 5.16b). Die zelluläre Verteilung von FOXO1 wurde durch die verringerte Expression einer *Akt*-Isoform auch nicht verändert (Abb. 5.16c).

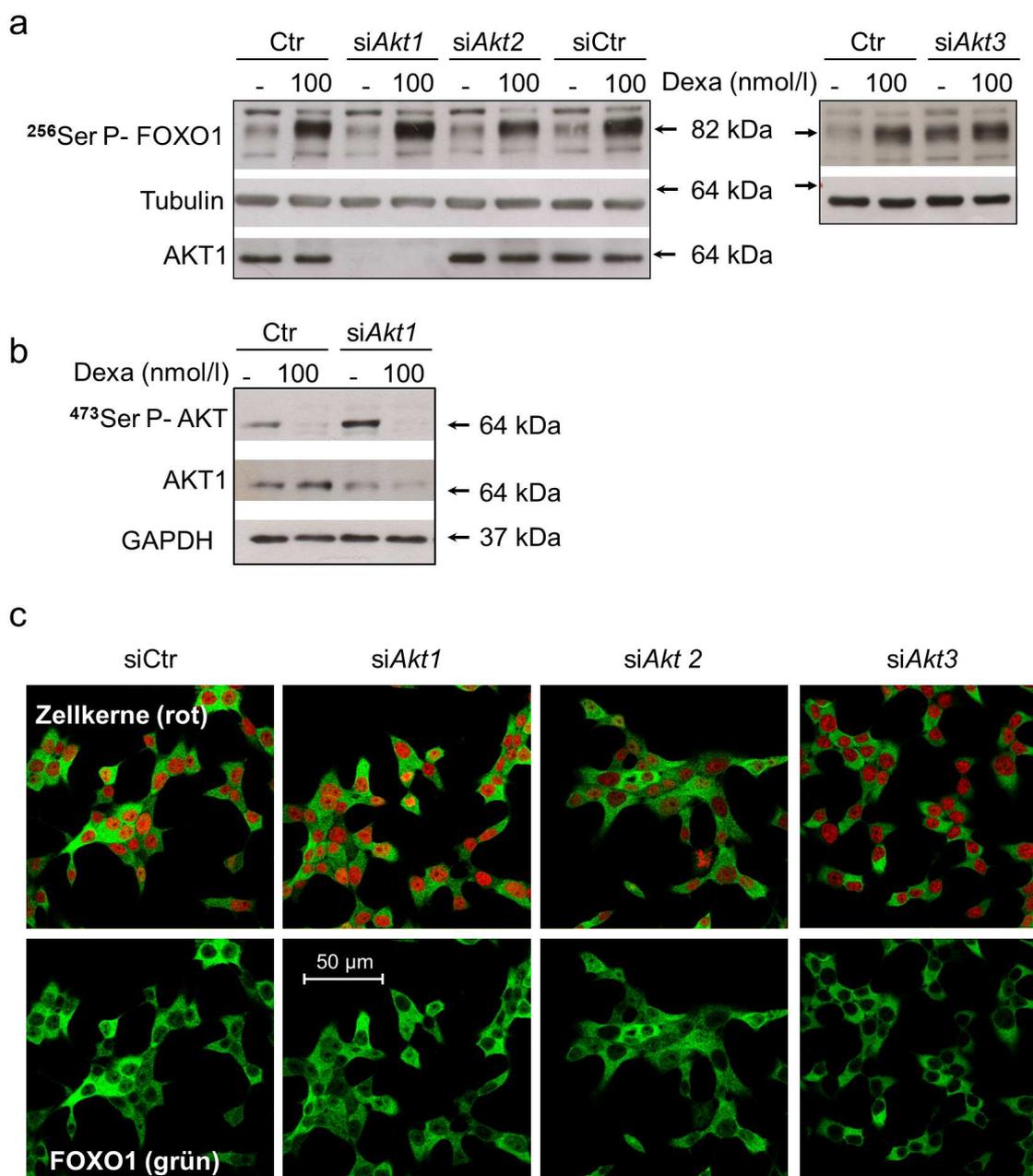


Abbildung 5.16: Die verringerte Expression einer Akt-Isoform reduziert nicht die Phosphorylierung von FOXO1

INS-1E Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben mit Isoform-spezifischer Akt-siRNA transfiziert und behandelt. a, b) Repräsentative Westernblots von drei unabhängigen Experimenten für a) Ser256 P-FOXO1, AKT1 und Tubulin und b) Ser473 P-AKT, AKT1 und GAPDH. c) Repräsentative Bilder konfokaler Mikroskopie zeigen immunfluoreszent angefärbtes FOXO1 (in grün) und durch TOPRO angefärbte DNA der Zellkerne (in rot).

5.2.3.2. Parallele Hemmung der Expression zweier Isoformen von AKT

Es ist möglich, dass eine verbleibende Isoform eine andere ausgleichend kompensieren kann. Aus diesem Grund wurden in der nächsten Versuchsreihe zwei Isoformen parallel mittels siRNA herunterreguliert. Wie auch schon die Reduktion der mRNA einer *Akt*-Isoform, veränderte die Reduktion zweier Isoformen die Transkription der verbleibenden Isoform nicht (vgl. Tabelle 5.1). Die parallele Reduktion von *Akt1* und *Akt2*, *Akt1* und *Akt3* oder *Akt2* und *Akt3* resultierte in keiner signifikanten Reduktion der FOXO1-Phosphorylierung (Abb. 5.17a). Interessanterweise lag FOXO1 auch hier in den *Akt3*-defizienten INS-1E Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen stärker phosphoryliert vor. Immunfluoreszente Färbung zeigte FOXO1 überwiegend im Zytosol lokalisiert, auch in Zellen, in denen zwei Isoformen von *Akt* bis auf 15% reduziert waren (Abb. 5.17b).

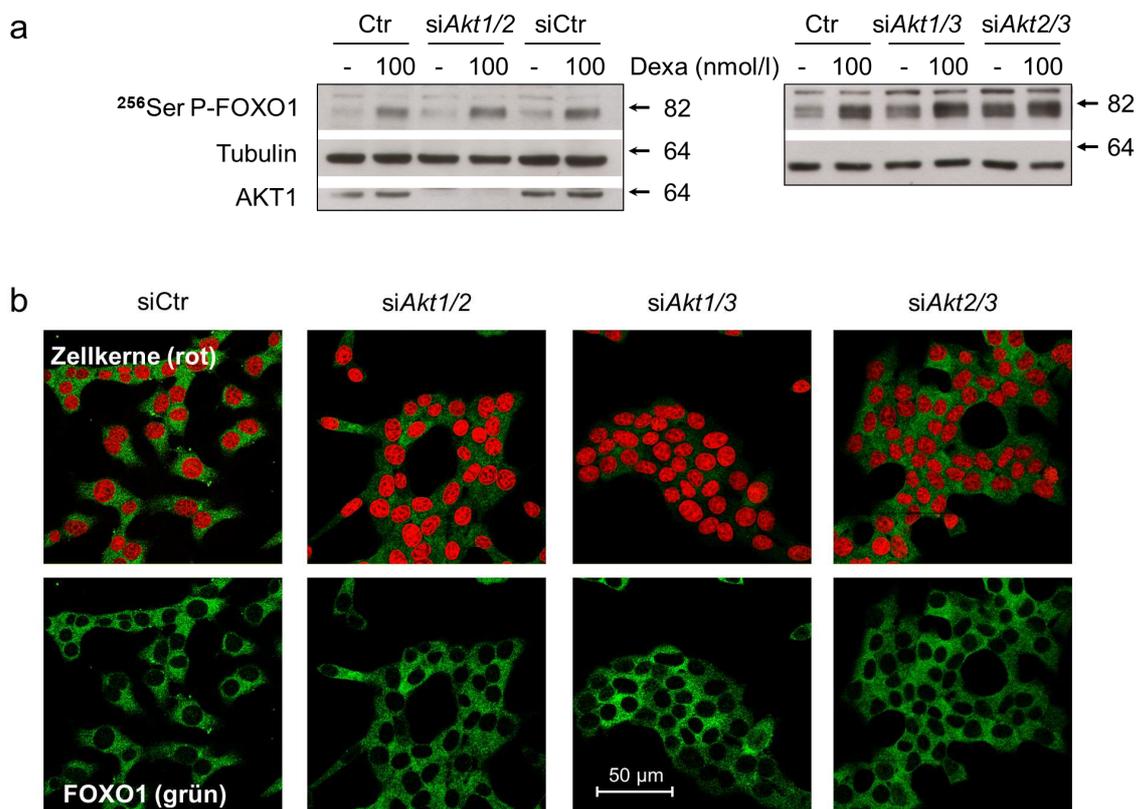


Abbildung 5.17: Die verringerte Expression zweier *Akt*-Isoformen verändert nicht die Phosphorylierung und zelluläre Verteilung von FOXO1

INS-1E Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben transfiziert und mit Dexa (100 nmol/l für 24 h) behandelt. a) Repräsentative Westernblots von drei unabhängigen Experimenten zeigen Ser256 P-FOXO1, AKT1 und Tubulin. b) Repräsentative Bilder konfokaler Mikroskopie zeigen die immunfluoreszente Markierung von FOXO1 (in grün), und die Anfärbung der DNA mit TOPRO in den Zellkernen (in rot). Massenangaben der Proteine in kDa

5.2.3.3. Parallele Herunterregulation der drei Akt-Isoformen 1, 2 und 3

Schließlich führte erst die Reduktion aller drei *Akt*-Isoformen zu einer signifikanten Verringerung der FOXO1-Phosphorylierung (Abb. 5.18a). In drei unabhängigen Versuchen konnte eine Reduktion der *Akt*-mRNA von 80-90% erreicht werden (Tabelle 5.1). Im Westernblot ist außerdem mit einem pan-AKT-Antikörper die starke Verringerung des AKT-Proteins dargestellt (Abb. 5.18a). Trotz der stark reduzierten Proteinmenge ist dennoch eine Phosphorylierung des verbleibenden AKT-Proteins an Ser473 detektierbar, wenn auch schwächer als in den Kontrollzellen (Abb. 5.18b). Die Dexa-vermittelte Erhöhung des FOXO1 Proteins wurde durch die Transfektion mit siRNA gegen alle drei *Akt*-Isoformen nicht beeinflusst (Abb. 5.18b). Die Phosphorylierung von FOXO1 an Ser256 hingegen ist unter Kontrollbedingungen, als auch unter Dexa-Behandlung signifikant gehemmt. Die statistische Auswertung in der Abbildung 5.18c veranschaulicht diese Beobachtung. Dargestellt wird das Verhältnis der Phosphorylierung zum Gesamtprotein. Die verringerte AKT-Expression und damit verbundene verringerte AKT-Aktivität hatte wie erwartet auch eine Akkumulation von FOXO1 im Zellkern zur Folge (Abb. 5.18d).

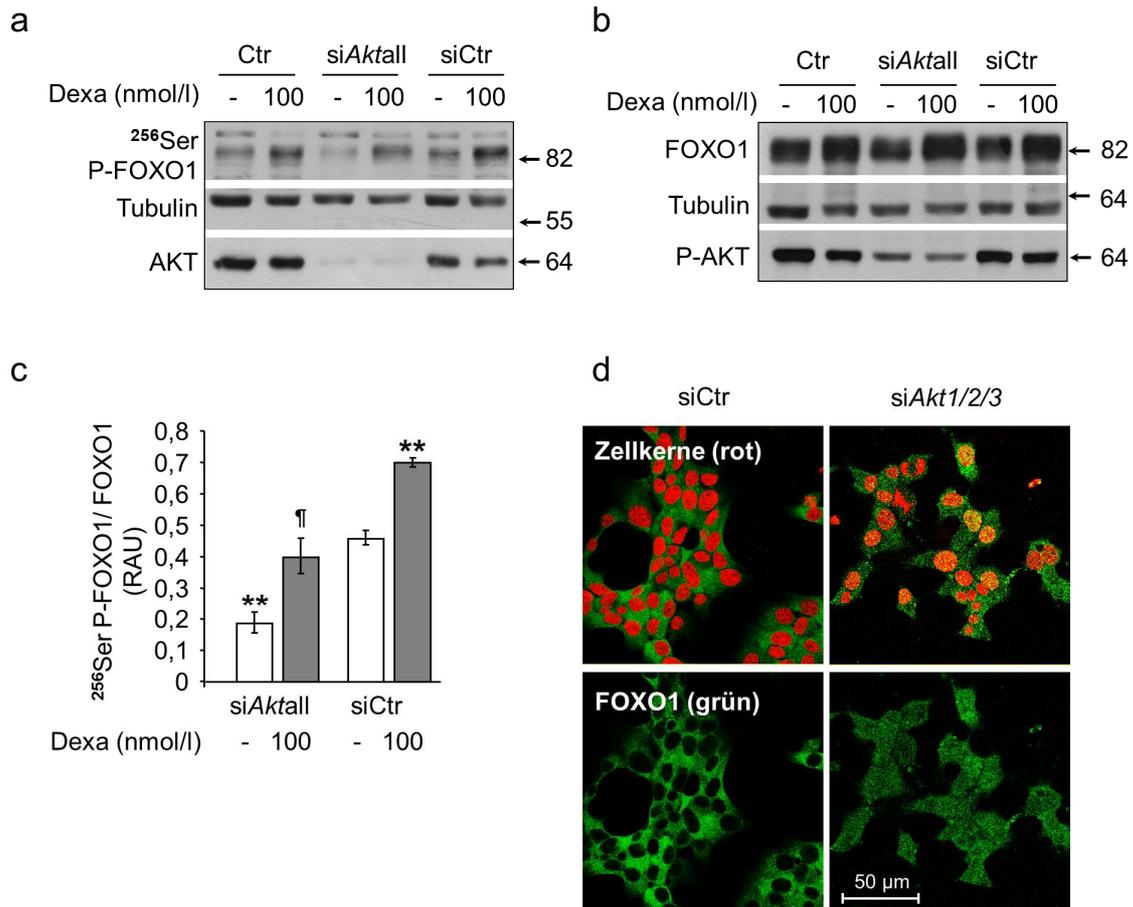


Abbildung 5.18: Die Phosphorylierung und nukleäre Akkumulation von FOXO1 hängt von allen drei AKT-Isoformen 1,2 und 3 ab

INS-1E-Zellen wurden wie angezeigt mit siRNA transfiziert und d) unter Standardbedingungen oder a-c) mit Dexa (100 nmol/l für 24 h) behandelt. Repräsentative Westernblots zeigen a) Ser256 P-FOXO1, AKT1 und Tubulin und b) FOXO1, Ser473 P-AKT und Tubulin. c) Die Verhältnisse der Phosphorylierung von FOXO1 an Ser256 zum Gesamtprotein sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten dargestellt. d) FOXO1 (in grün) wurde immunfluoreszent, die DNA der Zellkerne (in rot) wurde mit TOPRO angefärbt. Repräsentative Aufnahmen konfokaler Mikroskopie sind abgebildet. **($p < 0,01$) bezeichnet eine Signifikanz zu siCtr unter Kontrollbedingungen; ¶($p < 0,05$) bezeichnet eine Signifikanz zu siCtr nach Dexa-Behandlung. siAktall: Zellen, die mit siRNA gegen *Akt1*, *Akt2* und *Akt3* transfiziert worden sind. Massenangaben der Proteine in kDa; RAU: *relative arbitrary unit*

Diese Daten zeigen, dass alle drei AKT-Isoformen 1, 2 und 3 FOXO1 phosphorylieren und somit auch dessen zelluläre Verteilung regulieren. Somit wird die transkriptionelle Aktivität von FOXO1 auch unter Glukokortikoid-Exzess durch alle drei AKT-Isoformen reguliert.

5.2.4. Rolle von SGK3 und AKT2 auf die Regulation von FOXO1 bei Dexamethason-Exposition

Eine von Li-Jun Yao *et al.* im Jahr 2011 publizierte Studie ²³⁵ zeigt, dass Mäuse, in denen zusätzlich zu AKT2 SGK3 ausgeknockt ist (DKO), eine signifikant schlechtere Glukosetoleranz, verschlechterte Glukose-stimulierte Insulinsekretion, verminderte Betazellproliferation und damit einhergehend eine allgemein verschlechterte Glukosehomöostase aufweisen. Die Autoren vermuten, dass SGK3 eine wichtige Rolle in der Betazellfunktion spielen könnte.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde deshalb untersucht, ob SGK3 und AKT2 gemeinsam womöglich einen Einfluss auf die Regulation des Transkriptionsfaktors FOXO1 haben. Eine veränderte FOXO1-Regulation könnte zumindest einen Teil der beobachteten Effekte der DKO Maus erklären. In INS-1E Zellen wurden *Sgk3* und *Akt2* parallel durch Transfektion mit spezifischer siRNA herunterreguliert und nachfolgend mit Dexamethason behandelt. In drei unabhängigen Versuchen konnte eine Reduktion der *Akt2* (Abb. 5.19a) und *Sgk3* (Abb. 5.19b) mRNA um 80 – 90% erreicht werden.

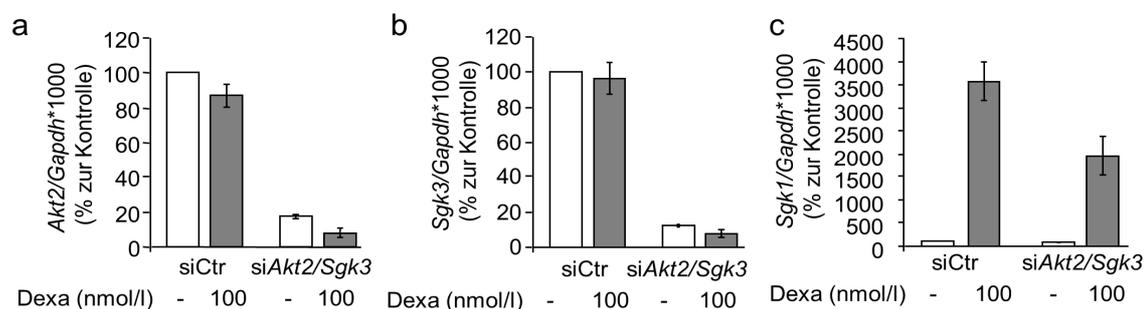


Abbildung 5.19: mRNA-Spiegel der mit siAkt2/Sgk3 transfizierten Zellen

Zellen wurden mit siRNA transfiziert und wie angegeben mit Dexa für 24 h behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten für die durch qRT-PCR bestimmte mRNA-Menge von a) *Akt2*, b) *Sgk3* und c) *Sgk1* als Prozente zu den mRNA-Mengen der unbehandelten siCtr-Zellen.

Die Transfektion mit si*Sgk3* führte allerdings auch zu einer reduzierten nicht signifikanten Induktion der Dexa-vermittelten Transkription von *Sgk1* (Abb. 5.19c).

Im Westernblot zeigte sich verglichen zu den unbehandelten Kontrollzellen ein unverändertes Bild, wenn *Sgk3* und *Akt2* parallel herunterreguliert waren: Die erhöhten FOXO1-Proteinmengen blieben unter Dexa-Behandlung phosphoryliert (Abb. 5.20a)

unabhängig von der reduzierten Expression (um 80%) der Kinasen (Abb. 5.20a). Parallel dazu wurde FOXO1 nach immunfluoreszenter Färbung überwiegend im Zytosol detektiert, unabhängig von der verringerten Expression der Kinasen SGK3 und AKT2 (Abb. 5.20b). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine Verringerung der Expression von SGK3 und AKT2 unter den hier gewählten Bedingungen die Phosphorylierung von FOXO1 und dessen zelluläre Translokation unter Anwesenheit des synthetischen Glukokortikoides Dexamethason nicht verändert.

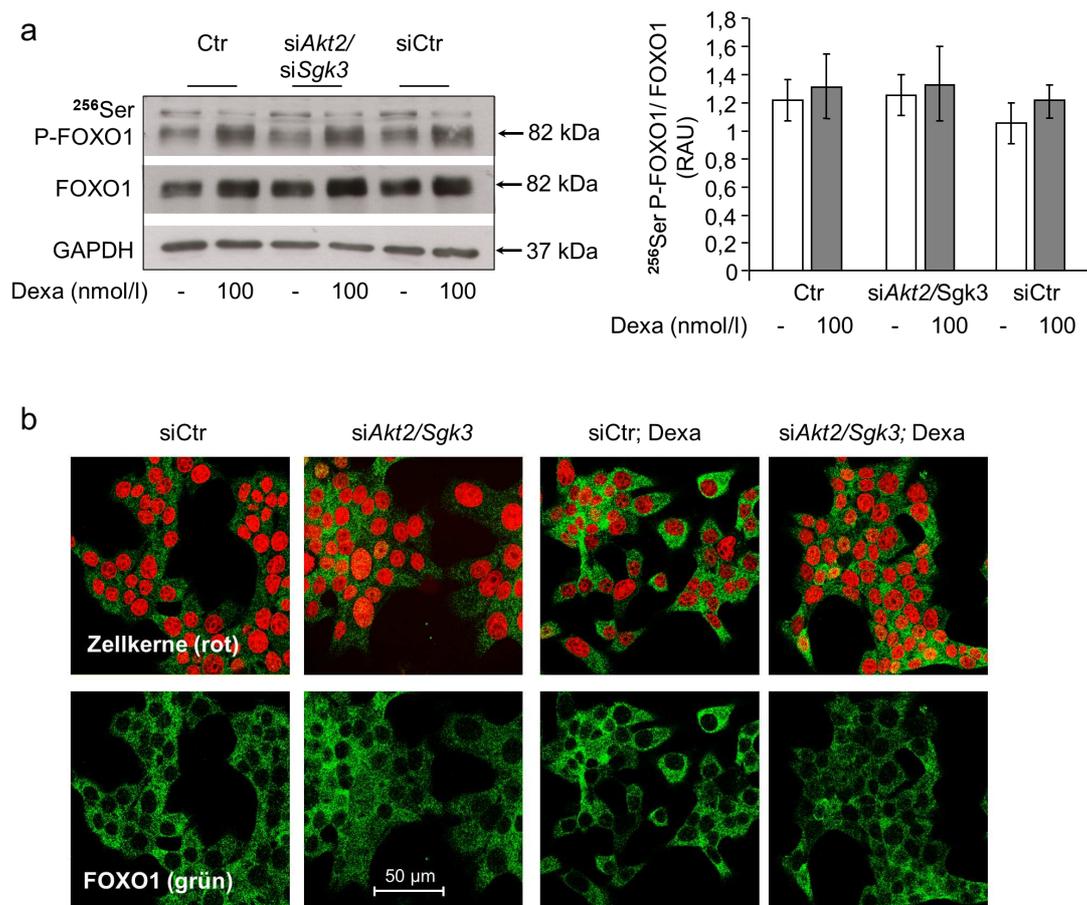


Abbildung 5.20: Die erniedrigte Transkription von *Akt2* und *Sgk3* verändert nicht die Dexa-vermittelten Effekte auf die Phosphorylierung und zelluläre Verteilung von FOXO1

Zellen wurden mit siRNA gegen *Akt2* und *Sgk3*, sowie einer Kontroll-siRNA (siCTR) transfiziert und mit Dexa (100 nmol/l, 24 h) wie im Methodenteil angegeben behandelt. a) Abgebildet sind Westernblots für Ser256 P-FOXO1, FOXO1 und GAPDH. Die Mittelwerte \pm SEM des Verhältnisses P-FOXO1 gegen FOXO1 von $n = 3$ unabhängigen Versuchen sind gezeigt. b) Aufnahmen konfokaler Mikroskopie nach immunfluoreszenter Anfärbung von FOXO1 (in grün) und TOPRO-Färbung der DNA der Zellkerne (in rot) sind gezeigt. RAU: *relative arbitrary unit*

5.3. Funktion von FOXO1 in der Dexamethason-induzierten Apoptose in INS-1E Zellen

FOXO1 wird eine entscheidende proapoptotische Rolle im Glukokortikoid-induzierten Zelltod zugeordnet, worauf in den Kapiteln 2.3.4. und 2.3.5. bereits näher eingegangen wurde. Die bisherigen Untersuchungen haben aber gezeigt, dass FOXO1 unter Glukokortikoid-Exzess in Betazellen zytosolisch lokalisiert bleibt und somit wahrscheinlich auch als Transkriptionsfaktor inaktiv ist. Die Frage bleibt offen, ob FOXO1 eine pro-apoptotische Rolle in pankreatischen Betazellen unter Glukokortikoid-Exzess ausübt.

5.3.1. Dexamethason-induzierte Apoptose in INS-1E Zellen mit verringertem FOXO1-Gehalt

Für die Beantwortung dieser Fragestellung wurde die Apoptoserate in INS-1E Zellen, in denen zuvor mittels siRNA *FoxO1* herunterreguliert wurde, untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einer nicht gerichteten siRNA (siCtr) transfiziert wurden. Als Positivkontrolle wurde ein Teil der Zellen mit dem pan-AKT-Inhibitor Akti-1/2 für zwei Stunden behandelt. Bedingungen, unter denen FOXO1 im Zellkern lokalisiert ist und damit transkriptionell aktiv sein kann (vgl. Abb. 5.14c). Die Effizienz des *FoxO1*-Knockdowns wurde über quantitative qRT-PCR ermittelt und ergab eine Erniedrigung der *FoxO1* mRNA um 75 bis 85%. Die mRNA Mengen von *FoxO3* und *4* waren in diesen Zellen nicht verändert (Abb. 5.21).

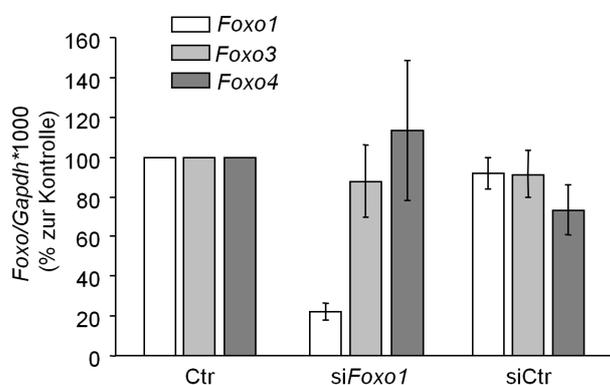


Abbildung 5.21: mRNA-Spiegel der FoxO-Isoformen in Zellen, die mit siFoxO1 transfiziert wurden

Zellen wurden mit siFoxO1 und einer Kontroll-siRNA (siCtr) wie im Methodenteil angegeben transfiziert. Die durch qRT-PCR ermittelten relativen mRNA-Mengen von *FoxO1*, *2* und *3* werden prozentual zu denen der unbehandelten Kontrollzellen (Ctr) als Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten gezeigt.

Die erfolgreiche Reduktion der FOXO1-Expression ist im Westernblot zu erkennen (Abb. 5.22a). Interessanterweise lag PARP (*Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1*) in Kontroll-, sowie auch in den FOXO1-defizienten Zellen nach Dexa-Behandlung gespalten vor (Abb. 5.22a). PARP wird während des apoptotischen Prozesses durch aktive Caspase3 proteolytisch gespalten und dient somit als Marker für den programmierten Zelltod (vgl. 2.4.). Dexa induzierte außerdem sowohl in den Kontrollzellen (von 4,2 auf 7,4%), als auch in den *FoxO1*-defizienten Zellen (von 4,7 auf 8,6%) signifikant den Anteil TUNEL-positiver Zellen (Abb. 5.22b). Zweistündige Behandlung mit Akti-1/2 hatte keinen signifikanten Effekt (4,8% in *siFoxO1*; 5,7% in *siCtr*) auf den Anteil apoptotischer Zellen. Die zusätzliche Exposition Dexa-behandelter Zellen mit dem AKT-Inhibitor führte allerdings zu einer signifikanten Erhöhung der TUNEL-positiven Zellen (von 5,7% auf 11.3% in *siCtr*). In den *FoxO1*-defizienten Zellen hatte der Inhibitor hingegen keinen verstärkenden Effekt auf die Dexa-vermittelte Apoptoserate (*siFoxO*: 5,7% (Dexa); 7,5% (Dexa, Akti)).

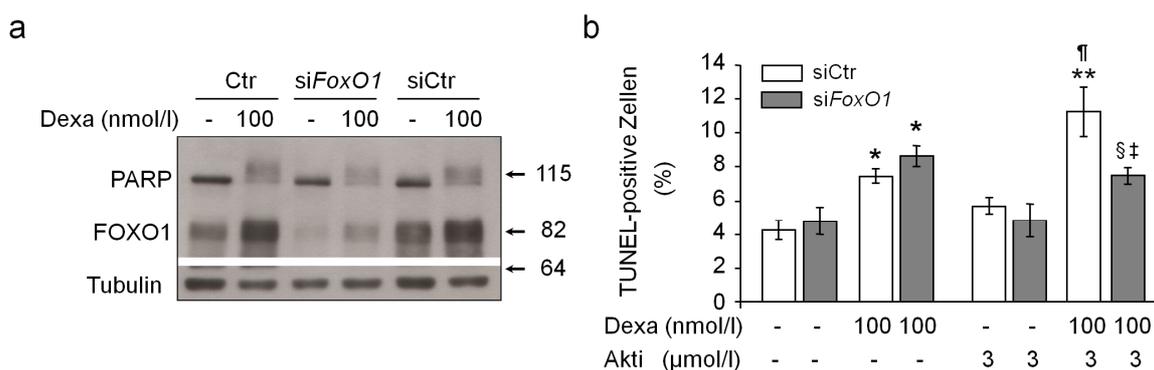


Abbildung 5.22: Effekte einer reduzierten FOXO1-Synthese auf die Dexa-vermittelte Apoptose

Zellen, die mit *siFoxO1* (graue Balken) oder einer Kontroll-siRNA (*siCtr*, weiße Balken) transfiziert wurden und unbehandelte Zellen (Ctr) wurden wie angezeigt mit Dexa (100 nmol/l für 24 h) oder Akti-1/2 (Akti; 3 μmol/l für 2 h) in Vollmedium behandelt. a) Westernblots für PARP, FOXO1 und Tubulin sind gezeigt. b) Die Mittelwerte ± SEM von n = 5 unabhängigen Versuchen der TUNEL-positiven Zellen sind abgebildet. *(p<0,05), ** (p<0,01) bezeichnet eine Signifikanz zu unbehandelten *siCtr*-Zellen; ¶ (p<0,05) bezeichnet eine Signifikanz zu Dexa behandelten *siCtr*-Zellen; § (p<0,05) bezeichnet eine Signifikanz zu Akti-1/2-behandelten *siFoxO1*-Zellen; ‡ (p<0,05) bezeichnet eine Signifikanz zu Dexa- und Akti-behandelten *siCtr*-Zellen. Massenangaben der Proteine in kDa

Durch die unspezifische Lyse aller apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen für Westernblot-Analysen, bzw. die Behandlung aller Zellen mit TUNEL-Enzym, kann nicht

eindeutig festgestellt werden, ob die gemessenen Ereignisse auch tatsächlich in den Zellen stattfinden, in denen FOXO1 überwiegend zytosolisch lokalisiert ist. Deshalb wurden zusätzlich Doppelfärbungen von FOXO1 und gespaltener Caspase3 in Dexa-behandelten und -unbehandelten INS-1E Zellen durchgeführt. Unterstützend sollte hiermit gezeigt werden, dass in den Zellen, in denen FOXO1 zytosolisch lokalisiert ist, auch tatsächlich die Dexa-induzierten apoptotischen Abläufe stattfinden. Abbildung 5.23 zeigt, dass FOXO1 (in rot dargestellt) unter Kontrollbedingungen als auch nach Dexa-Behandlung hauptsächlich zytosolisch lokalisiert vorlag. Gespaltene Caspase3 (in grün dargestellt) war unter Dexa-Behandlung in diesen Zellen tatsächlich induziert und vorwiegend im Zellkern akkumuliert.

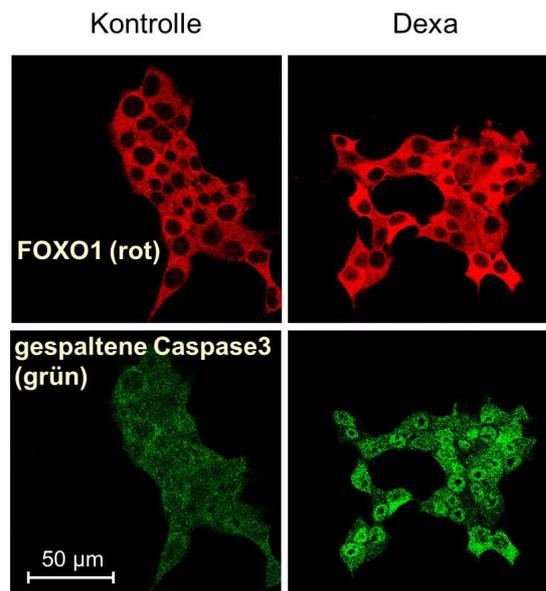


Abbildung 5.23: Dexa-vermittelte Spaltung von Caspase3 findet unabhängig von der Aktivität von FOXO1 statt

Zellen wurden mit Dexa (100 nmol/l für 24 h) behandelt und gespaltene Caspase3 (in grün) und FOXO1 (in rot) immunfluoreszent angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen konfokaler Mikroskopie.

Zusammengefasst zeigt diese Experimentenreihe, dass Dexamethason in INS-1E Zellen Apoptose induziert, wobei FOXO1 bei der Initiation aber keine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Der Inhibitor gegen pan-AKT, der eine Akkumulation von FOXO1 im Zellkern bewirkt, verursachte nur in den Kontrollzellen, nicht in den *FoxO1*-defizienten Zellen, eine Verstärkung des Dexa-induzierten Zelltodes. Dies beweist, dass die Akti-1/2-vermittelte Apoptose tatsächlich FOXO1-abhängig ist. Die Apoptoserate unter diesen Bedingungen (Dexa+Akti) wurde in den *FoxO1*-defizienten Zellen nicht

vollständig aufgehoben. Es wurde lediglich das Level der Apoptoserate, wie es in den Dexa-behandelten Kontrollzellen vorlag, erreicht. Dies spricht für eine additive und nicht initiale Wirkung von aktivem FOXO1 auf die Glukokortikoid-induzierte Apoptose in INS-1E Zellen.

5.3.2. Expression von FOXO1-Targetgenen in INS-1E Zellen mit verringertem FOXO1-Gehalt unter Behandlung mit Dexamethason

Nachdem FOXO1 als Initiator der Glukokortikoid-vermittelten Apoptose ausgeschlossen werden kann, bleibt die Frage offen, auf welche Weise FOXO1 additiv zum Zelltod beiträgt. Um dies zu untersuchen, wurde die Transkription bekannter pro-apoptotischer Zielgene des TFs (vgl. 2.3.4.) analysiert. Parallel zum TUNEL-Assay (vgl. Abb. 5.22b) wurde deshalb ein Teil der behandelten Kontroll-, sowie *FoxO1*-defizienten Zellen für die qRT-PCR-Analyse verwendet. Die Genexpression des mitochondrialen Proteins BIM war unter Dexa-Behandlung tatsächlich in beiden Zelllinien signifikant erhöht (4,5fach in Kontrollzellen und 3,3fach in *siFoxO1* transfizierten Zellen) (Abb. 5.24a). Akti alleine bewirkte nur in den Kontrollzellen eine signifikante Erhöhung der Expression (2,3fach). Die zusätzliche Behandlung der Dexa-behandelten Kontrollzellen mit Akti erhöhte weiterhin die Genexpression von *Bim* signifikant (6fach) im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Dexa (4,5fach). Dieser Effekt war in den *siFoxO1* transfizierten Zellen vollständig aufgehoben.

Als weitere pro-apoptotische Zielgene von FOXO1 wurden *Bad* und *FasL* untersucht. Die mRNA von *Bad* war unter Dexa-Exzess nicht signifikant erhöht. Die Reduktion von FOXO1 in den Zellen veränderte die Transkription von *Bad* unter keinen Bedingungen (Abb. 5.24b). *FasL* war nur sehr gering exprimiert und wurde durch Dexa nicht signifikant induziert (Abb. 5.24c). Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Dexa und pan-AKT-Inhibitor bewirkte eine tendenzielle Erhöhung der *FasL* mRNA. Dieser Effekt wurde durch die Herunterregulation von *FoxO1* aufgehoben.

Zusätzlich wurde die Expression des Betazell-spezifischen Gens *Pdx1* untersucht. Die Expression von *Pdx-1* wird durch aktives FOXO1 supprimiert (vgl. 2.3.5.). Die Behandlung der Zellen mit Dexa führte zu einer signifikanten Reduktion der *Pdx-1* Expression, in Kontroll- (um 50%) sowie auch *FoxO1*-defizienten Zellen (um 60%). Dieser Effekt wurde durch gleichzeitige Behandlung mit Akti nicht beeinflusst. Die

alleinige Behandlung mit dem Inhibitor veränderte die *Pdx-1* Genexpression auch nicht (Abb. 524d).

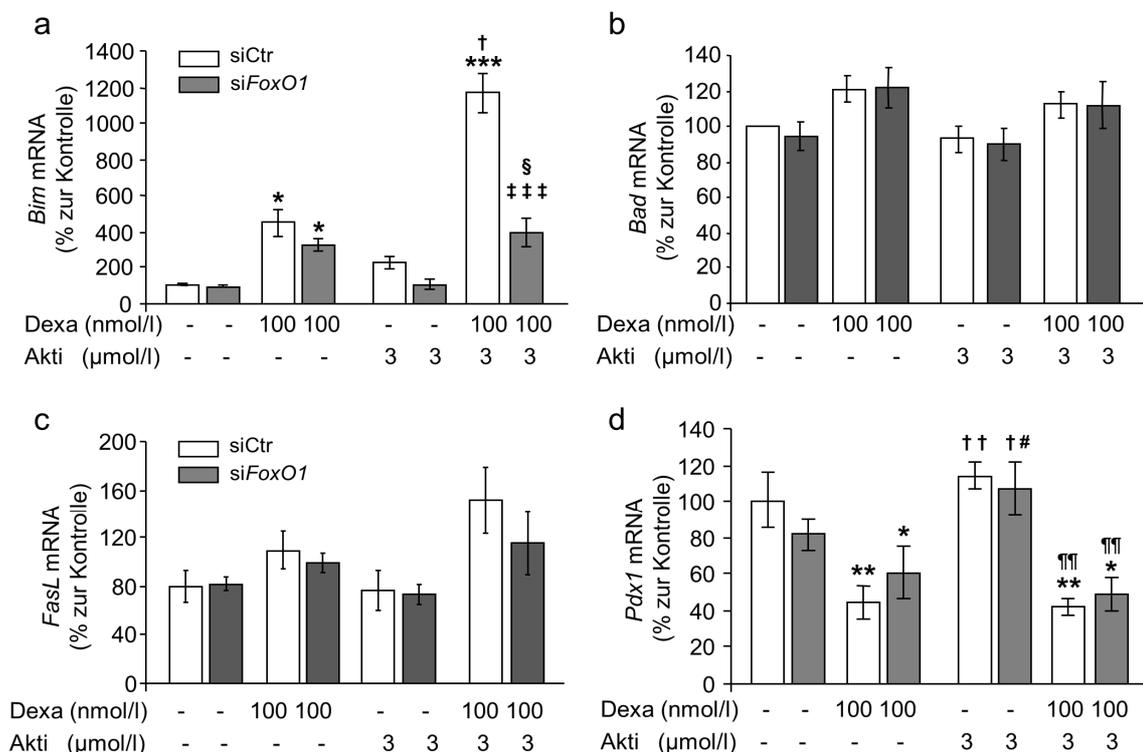


Abbildung 5.24: mRNA Spiegel von FOXO1-Targetgenen nach Dexa-Behandlung in *FoxO1*-defizienten INS-1E Zellen

Mit siCtrl (weiße Balken) und *siFoxO1* (graue Balken) transfizierte INS-1E Zellen wurden wie angegeben mit Dexa (100 nmol/l für 24 h) und Akti-1/2 (Akti; 3 μmol/l für 8 h) behandelt. Mittels qRT-PCR wurden die Mengen der mRNA von a) *Bim*, b) *Bad* c) *FasL* und d) *Pdx1* ermittelt. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM von n = 4 unabhängigen Versuchen angegeben. Die mRNA-Menge in unbehandelten Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. *(p<0,05), **(p<0,01), *** (p<0,001) bezeichnet eine Signifikanz zu unbehandelten siCtrl-Zellen; †(p<0,05); ††(p<0,01) bezeichnet eine Signifikanz zu Dexa-behandelten siCtrl-Zellen; #(p<0,05) bezeichnet eine Signifikanz gegenüber Dexa-behandelten *siFoxO1*-Zellen; §(p<0,05) bezeichnet eine Signifikanz gegenüber Akti-behandelten *siFoxO1*-Zellen; ‡‡‡ (p<0,001) bezeichnet eine Signifikanz zu Dexa- und Akti-behandelten siCtrl-Zellen; ‡‡ (p<0,01) bezeichnet eine Signifikanz zu den entsprechenden Akti-behandelten Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Glukokortikoide FOXO1-unabhängig die Transkription von *Bim* induzieren, da die Induktion in den *FoxO1*-defizienten Zellen bestehen bleibt. Hemmung von AKT durch Akti-1/2 verstärkte den Dexa-Effekt. Diese Potenzierung wurde durch *siFoxO1* allerdings gehemmt. Diese Beobachtung spricht dafür, dass *Bim* tatsächlich ein Zielgen von FOXO1 darstellt. Eine zusätzliche Aktivierung von FOXO1 durch Akti-1/2 führt zu einer verstärkten Transkription von *Bim*, was additiv zu Dexa die mitochondriale Apoptose verstärken kann.

5.4. Beobachtungen in murinen Inselzellen unter Behandlung mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason

Ob die im Zellmodell beschriebenen Effekte des synthetischen Glukokortikoids auch auf murine Betazellen *in vitro* übertragbar sind, wurde im Folgenden untersucht.

5.4.1. Transkription von FoxO-Isoformen und deren Targetgenen

Die folgenden Experimente wurden an Inseln durchgeführt, welche aus adulten C57/BL6 WT-Mäusen isoliert wurden. Dexamethason (100 nmol/l, 24 h) führte auch in diesen murinen Langerhans'schen Inseln zu einer signifikanten Erhöhung der *FoxO1* mRNA (2,8fach) (Abb. 5.25a) und *FoxO3* mRNA (2fach) (Abb. 5.25b). In Mausinseln ist *FoxO1* die unter Standardbedingungen höchst exprimierte Isoform (*FoxO1*: $40 \cdot 2^{\Delta\Delta Ct}$; *FoxO3*: $0,25 \cdot 2^{\Delta\Delta Ct}$). Des Weiteren wurde die Expression der FOXO1-Zielgene *Bim* (Abb. 5.25c) und *Pdx1* (Abb. 5.25d) untersucht. Tatsächlich war die *Bim* Expression nach Dexa-Behandlung 2,3fach signifikant erhöht. *Pdx-1* war zu 40% reduziert. Glukokortikoide haben somit in Mausinseln vergleichbare Effekte auf die Expression von *FoxO* TFs und entsprechende Zielgene, wie im INS-1E Zellsystem.

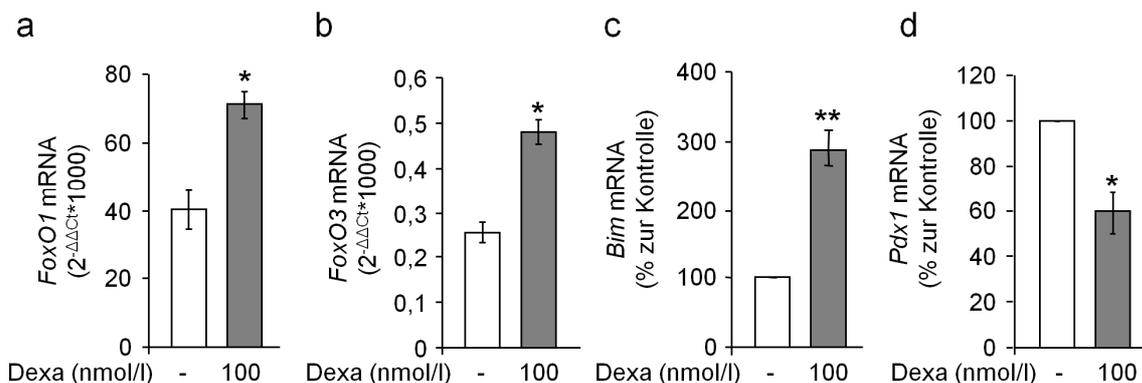


Abbildung 5.25: In murinen Betazellen hat Dexa vergleichbare Effekte auf die Transkription von *FoxO1* und *3* und deren Targetgene *Bim* und *Pdx1*, wie in INS-1E-Zellen

Mausinseln wurden isoliert und kultiviert wie im Methodenteil beschrieben. Die durch qRT-PCR ermittelten relativen mRNA-Mengen von a) *FoxO1*, b) *FoxO3*, c) *Bim* und d) *Pdx-1* werden als Mittelwerte \pm SEM von $n = 4$ unabhängigen Versuchen angegeben. *Rps13* wurde als Referenzgen verwendet. Der mRNA Spiegel un behandelter Zellen wurde für die Analyse der *Bim* und *Pdx-1* mRNA auf 100% gesetzt. *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) bezeichnet eine Signifikanz zu un behandelten Zellen.

5.4.2. FOXO1 bleibt in murinen Inselzellen in Anwesenheit von Dexamethason zytosolisch lokalisiert

Die zelluläre Verteilung von FOXO1 wurde als nächstes in murinen Inselzellen untersucht. Hierfür wurden die isolierten Inseln durch Trypsin vereinzelt und mit Dexa und den Inhibitoren gegen AKT und SGK1 entsprechend behandelt und anschließend FOXO1 immunfluoreszent angefärbt. FOXO1 war unter Kontrollbedingungen sowie unter Dexa-Behandlung überwiegend zytosolisch lokalisiert (Abb. 5.26). Nur der pan-AKT-Inhibitor führte zu einer Akkumulation von FOXO1 im Zellkern unter Kontrollbedingungen, sowie auch nach Dexa-Exzess. Der SGK1-Inhibitor hatte keine Wirkung auf die zelluläre Verteilung von FOXO1.

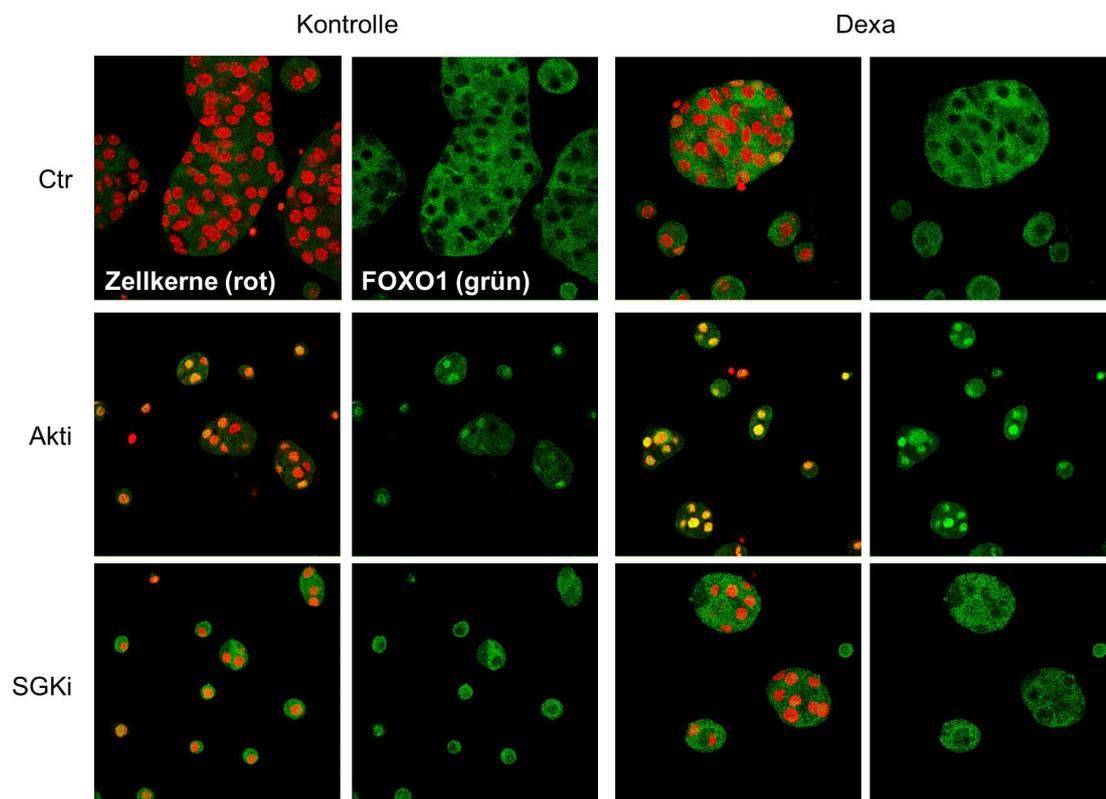


Abbildung 5.26: Dexa führt zu einer Akkumulation von FOXO1 in murinen Betazellen
 Mausinseln wurden isoliert und kultiviert wie im Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden wie angezeigt mit Dexa (100 nmol/l, 24 h) und Akti-1/2 (Akti, 3 µmol/l, 30 min) oder SGK1-Inhibitor (SGKi; 10 µmol/l, 30 min) in Vollmedium behandelt. FOXO1 (in grün) wurde immunfluoreszent markiert. Die DNA der Zellkerne wurde mit TOPRO (in rot) angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Bilder, aufgenommen mit konfokaler Mikroskopie. Ctr: unbehandelt

Die zelluläre Verteilung von FOXO1 ist somit in Mausinseln *in vitro* vergleichbar zu der in INS-1E Zellen: FOXO1 ist unter Standardbedingungen überwiegend im Zytosol lokalisiert. Eine Hemmung von AKT führt zu dessen Akkumulation im Zellkern. Glukokortikoide und SGK1 scheinen keinen Einfluss auf die zelluläre Verteilung des TFs in murinen Betazellen zu haben.

6. Diskussion

Glukokortikoid-induzierter Diabetes mellitus stellt eine häufige Nebenwirkung bei der Langzeitbehandlung mit hohen Dosen an Glukokortikoiden dar²⁰³. Es ist bekannt, dass eine Ursache des Steroid-Diabetes u.a. die veränderte Betazellfunktion²⁰⁸ und auch Betazellapoptose darstellt^{209 213}. Dem Transkriptionsfaktor FOXO1 wird hier eine wichtige Rolle zugesprochen²³². Der genaue Mechanismus dieser Funktion von FOXO1 ist aber noch nicht vollständig verstanden und wurde aus diesem Grund in dieser Arbeit *in vitro* untersucht.

6.1. Möglichkeiten des verwendeten Modellsystems

Die physiologischen endogenen Kortisol-Plasmakonzentrationen des Menschen variieren bedingt durch einen zirkadianen Rhythmus. Morgens liegen die Konzentrationen im Plasma mit 700 nmol/l am höchsten²³⁶.

Es ist außerdem zu beachten, dass Dexamethason 30fach potenter wirkt, als endogenes Kortisol. Da 100 nmol/l Dexamethason in früheren Arbeiten stabil die Insulinsekretion in INS-1E Zellen und Mäusen hemmte, wurde in diesen Studien nach Versuchen zu Konzentrationsabhängigkeiten mit einem Einsatz zwischen 10 nmol/l und 1 µmol/l diese Konzentration ausgewählt^{48 47}. In Anlehnung daran wurde auch in dieser Arbeit mit 100 nmol/l Dexamethason gearbeitet.

Als Zellmodell wurde die Zelllinie INS-1E verwendet. Diese Zelllinie stellt unter den verfügbaren Betazelllinien ein geeignetes Zellmodell dar. Der Klon INS-1E zeichnet sich durch einen stabilen (bis Passage 100) betazelltypischen Phänotyp aus und wurde 2004 von Merglen *et al.* aus der INS-1 Zelllinie²²¹ isoliert und charakterisiert²²². INS-1E Zellen weisen eine Glukose-induzierte Insulinsekretion auf und verfügen auch über einen *amplifying pathway* (vgl. 2.2.1.). Die häufig verwendete aus der Ratte stammende RINm5F Zelllinie beispielsweise exprimiert den GLUT1-Glukosetransporter, aber keinen GLUT2-Transporter und produziert im Vergleich zu normalen primären Betazellen nur wenig Insulin. RINm5 Zellen sezernieren Insulin bereits nach unphysiologisch niedrigen Glukosestimuli^{237 238}. Die Muster der betazelltypischen elektrischen Aktivität der INS-1E Zelllinie sind zwar nicht konsistent, aber für Studien, insbesondere im Vergleich zu

anderen Zelllinien, wie z.B. HIT-T15 (*hamster insulinoma tumor cells*) Zellen, auch gut geeignet^{222 239}.

Zelllinien im Allgemeinen sind immortalisiert und dadurch in ihrer Regulation veränderte Zellen. Um den *in vivo*-Bedingungen etwas näher zukommen, wurden in dieser Arbeit zusätzlich Versuche an aus der Maus primär gewonnenen Betazellen durchgeführt (vgl. 5.4.). Diese Versuche wurden zwar *in vitro* durchgeführt, liefern aber dennoch eine weiterführende verbesserte Aussage, als das alleinige INS-1E Zellmodell.

Da vermutet wurde, dass von den INS-1E Zellen sezerniertes Insulin die Kernakkumulation von FOXO1 verhindern könnte, wurden die Zellen für die Versuchsdurchführung unter 2,8 mmol/l Glukose gehalten und die Lösung (KRB) für die Substratbehandlungen 30 Minuten vor Analyse nochmals ausgetauscht. Unerwarteterweise führte Serumentzug nicht zu einer Akkumulation von FOXO1 im Zellkern (Abb. 5.9). Auf den Westernblots, auf welchen zytosolisch und nukleäres FOXO1 getrennt detektiert wurde, waren unter Kontrollbedingungen in beiden Fraktionen ähnliche Mengen FOXO1 sichtbar (Abb. 5.15). Es ist zu vermuten, dass die Zellen unter diesen Bedingungen noch ausreichende Mengen Insulin sezernieren, sodass der Insulinsignalweg stimuliert wird. Diese statischen Inkubationen äußern sich außerdem in einer Internalisierung des Insulinrezeptors²⁴⁰. Unter Standardbedingungen konnte in INS-1E Zellen kein Insulinrezeptor an der Plasmamembran immunhistologisch nachgewiesen werden, jedoch waren hohe Mengen an IGF-1-Rezeptor detektierbar. Erst nach wiederholtem Austausch des Mediums, d.h. Entfernung von sezerniertem Insulin, war der Insulinrezeptor an der Plasmamembran detektierbar²⁴⁰. Idealerweise wäre es, die Versuche unter Mediumperfusion durchzuführen, sodass sezerniertes Insulin nicht akkumulieren kann. Dieser Insulin-Effekt zeigt auch, dass die Zellkultur nur limitierte Aussagen zulässt.

Durch die Untersuchung von Signalwegen mit standardisierten Zellsystemen und Bedingungen gelang es aber Signalwege und Glukokortikoid-abhängige von Glukokortikoid-unabhängigen Effekten zu trennen. Solche Studien sind wichtig um spezifische neue therapeutische Angriffspunkte aufzudecken.

6.2. Die Initiation der Glukokortikoid-induzierten Apoptose ist unabhängig von FOXO1

Es ist bekannt, dass FOXO1 eine wichtige Rolle in der Apoptoseregulation der Betazelle spielt ¹³⁵. Auch wurde gezeigt, dass FOXO1 bei der Glukokortikoid-induzierten Fehlfunktion der Betazelle einen wichtigen Mediator darstellt ²³².

In dieser Arbeit wurden erhöhte Mengen an *FoxO1*-mRNA und FOXO1-Protein nach Glukokortikoid-Exposition detektiert (Abb. 5.2b und 5.2d). Dexa führte außerdem zu einer signifikanten Induktion der *FoxO3*- und *FoxO4*-mRNA. Diese war allerdings erst nach 24 h und nicht bereits nach 4 h, wie es bei *FoxO1* der Fall war, signifikant erhöht (Abb. 5.2c und d). Die mRNA-Analysen in dieser Arbeit zeigten in Übereinstimmung mit vorhergehenden Publikationen ¹³⁵ somit auch, dass alle drei Isoformen *FoxO1*, *3* und *4* in der Betazelle exprimiert werden (Abb. 5.2a und 5.25). Die gemessenen erhöhten Mengen an *FoxO1*-mRNA und FOXO1-Protein stehen in Übereinstimmung mit einer Studie an RINm5F Zellen, in der eine Erhöhung der mRNA von *FoxO1*, sowie des Gesamtfoxoproteins nach Dexa-Behandlung nachgewiesen wurde ²³². Eine weitere Studie an INS-1 Zellen zeigt eine Erhöhung des FOXO1-Gesamtproteins nach Dexa-Exzess, wobei Prolaktin zu einer Erniedrigung führte ²⁴¹.

Die transkriptionelle Regulation von FOXO1 ist bisher jedoch wenig untersucht (vgl. 2.3.4.) und es ist nicht bekannt, ob der Promotor ein *Glucocorticoid response element* (GRE) enthält. Ein *PPAR response element* im *FoxO1*-Promotor ist bekannt ²⁴². Die Bindung von PPAR β/δ und damit auch Aktivierung der *FoxO1*-Transkription wurde in Myozyten als Mechanismus der Glukokortikoid-induzierten FOXO1-Expression gefunden ²⁴³. Im humanen *FoxO3*-Promotor konnten allerdings drei GREs identifiziert werden ²⁴⁴. In dieser Arbeit war *FoxO3*-mRNA interessanterweise erst nach 24 h signifikant erhöht, während die *FoxO1*-mRNA bereits nach 4 h erhöht war (Abb. 5.2b und c). Diese Beobachtung weist möglicherweise auf eine anders geregelte Induktion der *FoxO1*-Transkription im Vergleich zur Induktion der *FoxO3*-Transkription durch Glukokortikoide hin.

Die in dieser Arbeit detektierten erhöhten Mengen an FOXO1-Protein nach Dexa-Exzess lagen in der Zelle phosphoryliert und hauptsächlich zytosolisch lokalisiert vor (Abb. 5.1g). Erhöhte Proteinspiegel von FOXO1 in Kombination mit einem verringerten Phosphorylierungsspiegel und damit verbundener Aktivierung von FOXO1 wurde in unterschiedlichen Zellen, wie Hepatozyten ²⁴⁵, Tenozyten ²⁴⁶ oder Kardiomyozyten beschrieben ²⁴⁷. Interessanterweise konnte Insulin der Dexa-vermittelten Hemmung

von FOXO1 in Tenozyten entgegenwirken. In INS-1E Zellen konnte die Behandlung mit IGF-1 bei gleichzeitiger Hemmung der PI3-Kinase durch LY294002 vor dem Dexa-vermittelten Zelltod schützen²¹³. In dieser Arbeit konnte hingegen erstmalig gezeigt werden, dass FOXO1 bei der Initiation der Glukokortikoid-induzierten Apoptose keine Rolle spielt. So waren Zellen, in denen FOXO1 mittels siRNA um bis zu 85% herunterreguliert war nicht vor der Dexa-vermittelten Apoptose geschützt und zeigten eine gleich hohe Apoptoserate und Spaltung von PARP wie untransfizierte INS-1E Zellen (Abb. 5.22a). Eine zusätzliche Aktivierung von FOXO1 durch den pan-AKT-Inhibitor Akti-1/2 führte aber zu einer signifikant höheren Apoptose als Dexamethason alleine. Dieser additive Effekt war in Zellen, in denen FOXO1 mittels siRNA herunterreguliert war, aufgehoben, nicht aber die Dexa-induzierte Apoptose. Die Aktivierung von FOXO1 und Glukokortikoide wirken somit synergistisch auf den Betazelltod, womöglich über eine verstärkte Expression des pro-apoptotischen Proteins BIM (Abb. 5.24a). Eine synergistische Wirkung von FOXO1 und Glukokortikoiden wurde auch in Muskelzellen beobachtet. Hier führte die Bindung von Dexa an GRE und FOXO1 an FBE (*Fox-binding element*) im Promotor des Gens, das für die E3 Ubiquitinligase muRF1 (*muscle specific RING finger 1*) kodiert, zu einem dramatischen Anstieg der Transkription²⁴⁸.

Bim stellt ein wichtiges pro-apoptotisches Zielgen von FOXO1 dar²⁴⁹. Ein signifikanter Anstieg der Transkription dieses *BH3 only proteins* wurde auch in dieser Arbeit in INS-1E Zellen und Mausinseln unter Dexa-Exzess detektiert (Abb. 5.24a und 5.25c). Dexa führte in INS-1E Zellen FOXO1-unabhängig zu einer signifikanten Induktion der *Bim*-Transkription. Die zusätzliche Hemmung von AKT führte bemerkenswerterweise zu einer FOXO1-abhängigen signifikanten Erhöhung der Transkription im Vergleich zu alleiniger Dexa-Behandlung (Abb. 5.24a). Diese verstärkte Induktion der *Bim*-Expression ist wahrscheinlich entscheidend für den pro-apoptotischen Effekt von FOXO1. In Übereinstimmung damit ist in Lymphozyten der Glukokortikoid-induzierte Zelltod durch den Knockdown von BIM gehemmt²⁵⁰. Es ist zudem bekannt, dass Glukokortikoide die Expression von BAD und BAX stimulieren²⁵¹. So stellt die Dephosphorylierung von BAD, gefolgt von dessen Translokation zu den Mitochondrien einen essentiellen Ablauf der mitochondrialen Apoptose dar²⁵². In dieser Arbeit war die gemessene Induktion der *Bad*-Transkription allerdings nicht signifikant erhöht (Abb. 5.24b). Dies kann aber auch an einer zu kurzen Inkubationszeit (24 h Dexa) gelegen haben. Die Tendenz einer Induktion der Transkription durch Dexa war aber gegeben. Interessanterweise führt die alleinige Aktivierung von BAD durch dessen

Dephosphorylierung nicht in die Apoptose. Eine zusätzliche Induktion von BIM verstärkte in einer humanen follikulären Lymphomzelllinie synergistisch die Dexamethason-induzierte Apoptose²⁵³. Diese Beobachtung unterstützt die Aussage dieser Arbeit, dass in Dexa-behandelten Zellen eine zusätzliche Induktion der FOXO1-Aktivität mit anschließend erhöhter *Bim*-Transkription eine verheerende Folge für die Zelle hat und diese in die Apoptose führt. Dies wird besonders unter dem Aspekt, dass eine Dexa-bedingt verringerte Aktivität von AKT vorliegt (Abb. 5.1a), und folglich BAD in INS-1E Zellen unter Dexamethason-Exzess in der Zelle dephosphoryliert vorliegt²⁰⁹ bekräftigt.

Diese synergistische Wirkung von Glukokortikoid-stimulierter Expressionserhöhung und der Aktivierung von FOXO1 könnte relevant für die Entstehung und Reversibilität des Steroiddiabetes sein. Steroiddiabetes sagt eine spätere Suszeptibilität für die Entwicklung eines Diabetes mellitus nicht voraus. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf einen zusätzlichen Faktor schließen, der hemmend auf den AKT-Signalweg wirken muss, um FOXO1 zu aktivieren. Dies könnte das Risiko einer nicht reversiblen Form des Steroiddiabetes oder das Risiko später an T2DM zu erkranken beeinflussen. Dieser zusätzliche Risikofaktor könnte beispielsweise erhöhte Plasma-NEFA (*non esterified fatty acids*/ungesättigte Fettsäuren)-Konzentrationen darstellen. NEFAs stimulieren die nukleäre Translokation von FOXO1^{180 172}. Dass ein erhöhter BMI (*Body-Mass-Index*) einen Risikofaktor zur Entwicklung eines Steroiddiabetes darstellt ist bekannt²⁵⁴. In der Tat zeigen transgene Mäuse, die eine Kinaseinaktive-AKT1 in Betazellen exprimieren, eine erhöhte Suszeptibilität für die Entwicklung einer Glukoseintoleranz und eines Diabetes mellitus nach Hochfettdiät²⁵⁵. In den Betazellen dieser Mäuse wurde zwar eine reduzierte Phosphorylierung der GSK3, p70S6K und FOXO1 nachgewiesen, sowie ein verschlechterter Ca²⁺-Signalweg; die basale Apoptoserate war aber nicht erhöht²⁵⁵.

Detektion des zytosolischen und nukleären FOXO1

Die Anwendung unterschiedlicher Methoden zur zellulären Verteilung von FOXO1 und die parallele Analyse des Phosphorylierungsstatus von FOXO1 ermöglichten erst, die Dissoziation zwischen der Aktivität von FOXO1 und dem Zelltod zu erkennen.

Die Immunfluoreszenzanalysen mit konfokaler Mikroskopie zeigen deutlich eine höhere Konzentration von FOXO1 im Zytosol als im Zellkern, unabhängig von der Behandlung mit Dexa und SGK1 (Abb. 5.11c) oder eines Knockdowns einer oder zweier AKT-Isoformen (Abb. 5.16c und 5.17b). Nur die Behandlung mit dem pan-AKT-Inhibitor Akti-

1/2 (Abb. 5.14.c) oder der Knockdown aller drei AKT-Isoformen (Abb. 5.18d) zeigte in Aufnahmen konfokaler Mikroskopie nach immunfluoreszenter Färbung eine deutlich höhere Konzentration des TFs im Zellkern.

In der separaten Analyse der Zellproteine auf Westernblots erkennt man nach Dexa-Behandlung auch einen Anstieg des zytosolischen FOXO1, obwohl auch mehr FOXO1 im Zellkern nachweisbar war (Abb. 5.15). In den Immunfluoreszenzbildern nach konfokaler Mikroskopie ist kein oder nur sehr schwach nukleäres FOXO1 zu erkennen. Dass dies kein Effekt des Antikörpers ist, wird durch die Positivkontrolle, unter Akti-1/2-Behandlung, wenn nukleär akkumuliertes FOXO1 detektiert wird, deutlich (Abb. 5.14c). Das Verhältnis des zytosolisch vorliegenden zum nukleär vorliegenden FOXO1 ist wahrscheinlich so hoch, dass die Fluoreszenz des nukleären FOXO1 zu schwach ist, um diese parallel zur zytosolischen optisch zu detektieren. Mit Fluoreszenzmikroskopie lassen sich hohe Konzentrationen anfärben, in der Westernblot-Analyse hingegen werden Gesamtmengen untersucht. Aus diesem Grund ist mit der Fluoreszenzmikroskopie keine quantitative Aussage, sondern nur eine qualitative Aussage zu fällen. Zur Quantifizierung ist somit eine weitere Methode, wie die in dieser Arbeit verwendete Westernblotanalyse, notwendig. Die Verwendung unterschiedlicher Methoden ermöglicht die Gesamtaussage, dass die zelluläre Verteilung von FOXO1 nur durch den pan-AKT-Inhibitor, sowie durch die parallele Herunterregulation aller drei AKT-Isoformen verändert werden kann.

6.3. Alle drei AKT-Isoformen sind für die Regulation von FOXO1 verantwortlich

Es ist bekannt, dass AKT in der Regulation der FOXO-Aktivität, insbesondere auch der subzellulären Translokation des Transkriptionsfaktors einen Hauptmediator darstellt²⁵⁶. Eine differenzierte Analyse der AKT-Isoformen und deren Regulation von FOXO1 wurde bisher aber nicht publiziert. Diese Arbeit zeigt somit erstmalig, dass alle drei Isoformen für die Regulation des TFs in der Betazelle relevant sind.

In INS-1E Zellen werden alle drei AKT-Isoformen exprimiert, wobei AKT1 die höchst exprimierte Isoform darstellt (Abb. 5.4a). Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Studien, in denen die Expression der AKT-Isoformen in der Betazelle nachgewiesen wurde^{257 51}. Eine Hemmung aller drei AKT-Isoformen durch den pan-AKT-Inhibitor

Akti-1/2 führte zu einer Hemmung der Phosphorylierung von FOXO1 an Serin 256 und Serin 319, sowie zu dessen nukleären Akkumulation (Abb.5.14). Interessanterweise hatte aber die Herunterregulation einer einzigen oder zwei AKT-Isoformen von bis zu 90 Prozent keinen Effekt auf die Phosphorylierung und zelluläre Verteilung von FOXO1 (Abb.5.16 und 5.17). In einer Versuchsreihe mit AKT2-Knockout-Mäusen wurde übereinstimmend dazu auch in isolierten Betazellen unter Kontrollbedingungen und Dexa-Behandlung FOXO1 nach Fluoreszenzanfärbung überwiegend im Zytosol detektiert (Daten nicht gezeigt). Erst die reduzierte Expression aller drei Isoformen in INS-1E Zellen, was durch parallele Transfektion mit siRNA gegen *Akt1*, 2 und 3 erreicht wurde, führte zu einer nukleären Akkumulation und einem dephosphorylierten Status von FOXO1. Somit scheinen sich die Isoformen in ihrer Wirkung auf FOXO1 gegenseitig ausgleichen zu können. Dies ist auch deshalb interessant, da die Reduktion einer Isoform mindestens auf mRNA-Ebene nicht zu einer Erhöhung der anderen Isoform führte (Tabelle 5.1). Dieses Phänomen wurde ebenso in Isoform-spezifischen Knockout-Mäusen beschrieben. Die Analyse unterschiedlicher Gewebe ergab keine kompensatorische Hochregulation der anderen beiden Isoformen⁶². Obwohl AKT2 oder AKT3 im Vergleich zu AKT1 in Betazellen sehr niedrig exprimiert wird (Abb. 5.4a), kann eine dieser Isoformen, wenn die anderen beiden Isoformen herunterreguliert sind, ausgleichend wirken und FOXO1 bleibt phosphoryliert. Es ist zudem zu vermuten, dass die restliche Aktivität der herunterregulierten Kinasen für eine bleibende Phosphorylierung von FOXO1 ausreichen. So ist eine AKT-Phosphorylierung an Ser473 unter Verwendung des Phospho-Ser473-pan-AKT-Antikörpers zu erkennen, wenn AKT1, die am stärksten exprimierte Isoform, herunterreguliert ist (Abb. 5.16b). Erst die Stimulation mit IGF-1 zeigt im Vergleich zu Kontrollzellen eine leicht verringerte Phosphorylierung von panAKT in Zellen, die mit *siAkt1* transfiziert wurden (Daten nicht gezeigt). In den Zellen, in denen alle Isoformen herunterreguliert waren, war auch noch eine schwache Ser473 Phosphorylierung im Westernblot detektierbar, wobei FOXO1 aber dephosphoryliert vorlag und im Kern lokalisiert war. (Abb. 5.18a und d). In der Betazelle wird die Isoform AKT1 als Hauptvermittler des PI3K-IRS2-Signalweges beschrieben⁶². Eine IRS2-Überexpression führte in INS-1E Zellen zu einer Aktivierung von AKT1, wohingegen AKT2 nicht und AKT3 nur unbeständig aktiviert wurden. Nur die Überexpression von AKT1, nicht aber die der AKT2 oder AKT3, führte zu einer Proliferation der Betazellen⁶². Die verschiedenen Mausmodelle zeigen, dass keine Isoform für die Erhaltung der Inselmasse essenziell ist, AKT1 aber für dessen Expansion

von Bedeutung zu sein scheint ²⁵⁸. So weisen transgene Mäuse, die eine Kinaseinaktive AKT1 in Betazellen exprimieren, zwar eine verminderte Insulinsekretion auf, die Betazellmasse ist aber interessanterweise nicht verändert ²⁵⁵.

6.4. FOXO1 wird nicht von SGK1 phosphoryliert

In Anlehnung an bisherige Publikationen konnte in INS-1E Zellen eine massive Induktion der SGK1-Produktion nach Glukokortikoid-Exzess beobachtet werden - ein Effekt, der durch den Glukokortikoid-Rezeptor-Hemmstoff Mifepristone (RU486) gehemmt werden konnte (Abb. 5.5). SGK1 kommt in drei verschiedenen Splicevarianten vor, die sich im ersten Exon unterscheiden ²⁵⁹. In ihrer Funktion differieren sie dahingehend, dass sie in der Zelle unterschiedlich lokalisiert sind und unterschiedliche Halbwertszeiten aufweisen. Alle Splicevarianten werden durch Glukokortikoide induziert, weisen aber unterschiedliche Expressionsmuster nach Stimulation durch Hypoxie oder Zelldifferenzierung auf. Ob alle Varianten in der Betazelle exprimiert werden, wurde nicht untersucht ²⁵⁹. Da in dieser Arbeit die Fragestellung auf Glukokortikoidinduktion der SGK1 fokussiert war, wurde nicht differenziert auf die einzelnen Splicevarianten eingegangen. Die verwendeten Primer detektierten alle Formen der SGK1 und der verwendete SGK1-Inhibitor sollte auch auf alle Varianten wirken, da sie sich in der katalytischen Einheit nicht unterscheiden.

SGK1 weist in verschiedenen Zellen ^{260 261} eine sehr kurze Halbwertszeit auf ²⁶¹ und wird unabhängig von dessen Aktivität ubiquitiniert und über das 26S Proteasom abgebaut. Im Unterschied dazu akkumuliert die Kinase nach Induktion durch Glukokortikoide in den Betazellen (Abb. 5.4f und 5.6). In der Arbeit von Ullrich *et al.* konnte die extreme SGK1-Induktion und -Akkumulation durch Glukokortikoide auch auf das Mausmodell übertragen werden ⁴⁸. Beim Steroiddiabetes spielt die Induktion der SGK1 hinsichtlich der gestörten Insulinsekretion eine wichtige Rolle. So ist der hemmende Effekt von Dexa auf die Insulinsekretion in SGK1-KO Mäusen aufgehoben ⁴⁸. SGK-1 teilt viele Substrate mit den AKT-Kinasen, was durch eine Homologie der katalytischen Domänen bedingt ist ⁹². Auch überschneiden sich dadurch ihre Funktionen und für beide Kinasen wird eine für das Überleben der Zelle wichtige Rolle beschrieben ^{111 262 263}. So stellt auch SGK1 als Downstream-Target des Insulin/IGF-1-PI3K-Signalweges eine in der Onkogenese relevante Kinase dar ¹⁰⁷. Michael (Diana Michael,

Dissertation, 2010) konnte in früheren Versuchen zeigen, dass die Überexpression von SGK1 in INS-1E Zellen zu keiner vermehrten Apoptose führt. SGK1 scheint somit nicht der Faktor zu sein, der die Glukokortikoid-induzierte Apoptose bedingt. FOXO stellt eines der Substrate von SGK1 dar ^{264 265}. Die hemmende Wirkung von SGK1 auf FOXO1 könnte somit einen positiven Effekt auf die Betazelle ausüben. Unerwarteterweise konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, dass SGK1 eine FOXO1 phosphorylierende Kinase ist (vgl. 2.3.3. und 2.3.4.). Transfektion mit siRNA gegen *Sgk1* oder mit einer Kinaseinaktiven und -aktiven SGK1 zeigte keine Veränderung in der Phosphorylierung von FOXO1, weder an Serin 256 noch an Serin 319 (Abb. 5.7 und 5.8). Auch der Einsatz des spezifischen SGK1-Inhibitors GSK650394 zeigte keine Effekte auf die Phosphorylierung und zelluläre Verteilung von FOXO1 (Abb. 5.11.). Die Spezifität des Inhibitors wurde durch eine Hemmung der SGK1 spezifischen Phosphorylierung von NDRG1 bestätigt (Abb. 5.10b). Außerdem reduzierte der Inhibitor die Dexa-induzierte Phosphorylierung von GSK3beta, ein weiteres SGK1-Substrat, nicht aber die von GSK3alpha (Abb. 5.13c). GSK3beta stellt auch ein Substrat der SGK1 dar ²⁶⁶. Diese Daten sprechen für eine hemmende Wirkung des Inhibitors auf SGK1. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auch durch die Wirkung auf SGK3, welche außerdem GSK3beta an Serin 9 phosphoryliert ²⁶⁷, verursacht wird. Ob der Inhibitor auf die Isoform 3 der SGK wirkt, wurde bisher nicht beschrieben.

SGK1 unterdrückt indirekt den proteasomalen Abbau unterschiedlicher Proteine, was sich durch die Eigenschaft, die E3-Ubiquitin-Ligase Nedd4 zu hemmen, erklären lässt ²⁶⁸. Auch wurde gezeigt, dass SGK1 eine Downregulation von FOXO3 bewirkt ^{269 109}. In INS-1E Zellen hatte SGK1 keinen Effekt auf die Proteinmengen von FOXO1. FOXO1 war in Ab- und Anwesenheit der Kinase durch Dexamethason erhöht. Auch der basale Spiegel an FOXO1-Protein war nicht verändert (Abb. 5.7).

Es ist bekannt, dass SGK1 FOXO3a an Ser315, 253 und Thr32 phosphoryliert und dadurch dessen zelluläre Verteilung beeinflusst. Serin 315 wurde hierbei stärker von SGK1 phosphoryliert, wobei Serin 253 verstärkt von AKT phosphoryliert wurde ^{111 270}. In den bisher publizierten Studien zu FOXO als Substrat der SGK1 wurde allerdings fast ausschließlich die Isoform O3 untersucht ^{111 109 271}. In dieser vorliegenden Arbeit wurde hingegen ausschließlich die Isoform O1 studiert. FOXO1 und FOXO3 haben zwar sich überschneidende Funktionen, lassen sich in ihrer Wirkung aber auch unterscheiden. So ist FOXO1 in der Leber insbesondere für die Regulation der Insulinsensitivität und FOXO3 für die Regulation der ROS-Antwort und Autophagie relevant ²⁷². In der

Betazellen korreliert nukleäres FOXO mit erhöhten mRNA-Mengen von *IRS2*²⁷³. In Langerhans'schen Inseln der Ratte und in INS-1E Zellen wird dieser Effekt über FOXO3 vermittelt. FOXO3 bindet an das IRE (*insulin response element*) im Promotor des *IRS2* Gens und induziert so die Transkription²⁷³. Wahrscheinlich ist hier eine Regulation von FOXO3 über JNK3 von Bedeutung²⁷⁴. FOXO1 hat nur einen geringen Einfluss auf die *IRS2*-Transkription²⁷³. Diese sich unterscheidenden Funktionen der FOXO-Isoformen könnten auch für die Möglichkeit einer unterschiedlichen Regulation sprechen, sodass SGK1 möglicherweise FOXO3 hemmt, aber keinen Einfluss auf FOXO1 hat. Ob FOXO3 speziell in Betazellen von SGK1 phosphoryliert wird, wurde allerdings bisher noch nicht untersucht. Di Pietro *et al.* zeigten, dass SGK1 direkt über die Phosphorylierung von FOXO1 an Ser319, Ser256 und Thr24 die Adipozytendifferenzierung reguliert²⁶⁵. In dieser Publikation wurde zudem belegt, dass die zytosolische Lokalisation von FOXO1 in MEF (*mouse embryonic fibroblasts*) Zellen nach Dexamethasongabe von SGK1 abhängig ist. Kürzlich wurde in (IL)-17-produzierenden CD4⁺ Helfer-T Zellen (TH17 Zellen) gezeigt, dass durch moderat erhöhte NaCl-Mengen induzierte SGK1 die FOXO1-Aktivität reduziert und dadurch auch die *FoxO1*-mRNA und das FOXO1-Protein verringert waren. FOXO1 führt durch direkte DNA-Bindung zu einer Induktion der eigenen mRNA-Transkription, welche durch die SGK1-abhängige Hemmung des TFs verhindert wurde. In mit FOXO1- und SGK1-kotransfizierten HEK293 Zellen war FOXO1 SGK1-abhängig an Ser319 und Ser256 phosphoryliert²⁷⁵. FOXO1-Phosphorylierung war in IL23 stimulierten T-Zellen, in denen SGK1 ausgeknockt war, reduziert, während die mRNA- und Proteinnengen entsprechend erhöht waren. Interessanterweise war die Transkription der SGK1 speziell in TH-17-Zellen durch TGF- β 1 induziert aber nicht in anderen T-Zellen. Diese SGK1-FOXO1-Achse ist relevant für die Differenzierung und Funktionalität pathogener TH17 Zellen und folglich entscheidend für die Entstehung einer Gewebsinflammation und Autoimmunantwort²⁷⁵. Arbeiten zur Regulation von FOXO1 durch SGK1 in Betazellen sind bisher aber nicht publiziert. Die vorliegende Arbeit zeigt somit zum ersten Mal, dass FOXO1 in Betazellen wahrscheinlich kein Substrat für die SGK1 darstellt.

Dass drei Splicevarianten von SGK1 existieren, deren Präsenz in der Betazelle allerdings nicht nachgewiesen ist, wurde bereits erwähnt. Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass zudem unterschiedliche Isoformen existieren, die durch alternative Translationsinitiationen von einer mRNA entstehen⁸⁹. Die beiden größeren (47 und 49 kDa) translationalen Isoformen der SGK1 werden schneller abgebaut, sind an der

Membran des ERs lokalisiert und für die Aktivierung von ENAC und das zelluläre Zurückhalten von FOXO3 relevant. Die kleineren Isoformen (42 und 45 kDa) hingegen haben eine längere Halbwertszeit, sind im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert und phosphorylieren GSK3beta⁸⁹. Der Antikörper gegen SGK1, der in dieser Arbeit für Westernblots verwendet wurde, detektiert alle Isoformen, da er SGK1 am carboxyterminalen Ende erkennt und sich die Isoformen N-terminal unterscheiden⁸⁹. Die Westernblots dieser Arbeit zeigen eine sehr starke Bande der SGK1 auf der Höhe der 49 kDa-Markerbande und eine darunterliegende schwächere Bande, welche noch oberhalb der 37 kDa-Markerbande liegt (Abb. 5.6a). Eine Immunfluoreszenzfärbung zeigt SGK1 unter konfokaler Mikroskopie sowohl zytosolisch, als auch nukleär lokalisiert. Hier fällt besonders eine punktuelle Akkumulation im Zellkern auf (Abb. 5.6b). Diese Beobachtungen sprechen zumindest für die Expression mehrerer Isoformen in INS-1E Zellen. Eine differenzierte Analyse der multiplen translationalen Formen der SGK1, sowie die genaue Lokalisation und damit verbundene funktionelle Spezifität der Kinase wäre ein interessanter Ansatz zur weiteren Analyse der Funktion der SGK1 in der Betazelle. Erst kürzlich wurde im Sammelkanalzellen aus der Niere eine durch Insulin und Aldosteron induzierte SGK1-Isoform beschrieben, die aufgrund ihrer N-terminalen Variation eine längere Halbwertszeit und verstärkte Funktion aufweist²⁷⁶.

6.5. SGK3 und AKT2

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SGK3 in INS-1E Zellen exprimiert wird, ihre Transkription aber nicht durch Glukokortikoide reguliert wird (Abb. 5.4h). Dies ist in Übereinstimmung mit bisherigen Publikationen, die eine Glukokortikoid-unabhängige Expression von SGK3 in Betazellen zeigen^{90 277 90}. Die Expression der Kinase scheint hingegen durch Oxidation^{90 278}, Il-3⁹⁶ und IGF-1/Insulin²⁷⁸ induziert zu werden. Auch Östrogene stimulieren SGK3, was in MCF-7 Zellen gezeigt werden konnte. Somit spielt diese Kinase auch bei hormonabhängigem Brustkrebs eine wichtige Rolle²⁷⁹. Eine Studie von Vogel *et al.* zeigte, dass Östrogene weibliche NZO-Mäuse vor einem Betazellverlust und Übergewicht-induzierten Diabetes mellitus schützt²⁸⁰. Ob hier die SGK3 eine Rolle spielt bleibt offen.

SGK3 wird als Schlüsselenzym des AKT-unabhängigen onkogenen Zellwachstums diskutiert²⁷⁸. In Krebszelllinien, die bei gleichzeitig starker PDK-1-Aktivität, ein AKT-

unabhängiges Wachstum zeigen, führte der Knockdown des PDK1 Targets SGK3 zu einer starken Reduktion des Zellwachstums²⁸¹. So war das durch einen Knockdown von PDK1 bedingt reduzierte Wachstum einer Brustkrebszelllinie nicht durch eine AKT Überexpression aufzuheben²⁸². Eine weitere Studie am Hepatokarzinom zeigte (HCC) außerdem eine wichtigere Rolle für SGK3 als für AKT bei der Zellproliferation auf²⁸³. Als Mechanismus für die zellproliferative Wirkung der Kinase werden u.a. auch die AKT-überschneidenden Eigenschaften diskutiert: so auch die Eigenschaft FOXO3 und GSK3beta zu phosphorylieren und damit zu hemmen^{278 96}. Außerdem wurde gezeigt, dass SGK3 das Überleben der Zelle durch Phosphorylierung von BAD unterstützt²⁸³. So könnte die Kinase auch in Betazellen von Bedeutung sein, wenn AKT gehemmt ist, wie es unter Dexa-Exzess der Fall ist. SGK3 könnte durch phosphorylierende Hemmung des pro-apoptischen FOXO1 die Zelle schützen. Dass SGK3 möglicherweise eine Rolle in der Betazellfunktion spielt, zeigt eine Studie an einer AKT2/SGK3-Doppelknockoutmaus (DKO-Maus)²³⁵. Hier weist die DKO-Maus im Vergleich zur AKT2-KO-Maus eine wesentlich verschlechterte Glukosehomöostase auf. Die DKO-Maus wies im Verhältnis zur AKT2-KO-Maus geringere Plasma-Insulin- und C-Peptidspiegel, eine geringere Betazellmasse und reduzierte Glukose-stimulierte Insulinsekretion, sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber exogenem Insulin auf²³⁵. Diese Beobachtungen könnten auf eine verschlechterte Betazellfunktion aufgrund des Verlustes von SGK3 hinweisen. Hier könnte eine verringerte SGK3-vermittelte hemmende Phosphorylierung von FOXO1 ein möglicher Mechanismus sein. FOXO3 wurde bereits als Substrat der SGK3 beschrieben. So wurde eine hemmende Wirkung von SGK3 auf die FOXO3-Aktivität beschrieben^{96 284}. Die vorliegende Arbeit zeigt nun erstmalig, dass weder SGK3 noch AKT2 (SGK3 und AKT2 Abb. 5.20b; für SGK3 Daten nicht gezeigt; AKT2 Abb.5.16c) die zelluläre Verteilung von FOXO1 beeinflusst. Diese Beobachtung wird dadurch weiter unterstützt, dass eine Herunterregulation der SGK3 alleine (Daten nicht gezeigt), sowie der AKT2 und SGK3 parallel den Phosphorylierungszustand von FOXO1 nicht verändert (Abb. 5.20a). FOXO1 scheint somit in Betazellen der Ratte kein Substrat der SGK3 zu sein. Ein alleiniger Knockout von SGK3 in der Maus zeigte in Übereinstimmung damit keinen Effekt auf die Glukosehomöostase im intraperitonealen Glukosetoleranztest²⁸⁴. Um die Aussage, dass SGK3 und AKT2 gemeinsam FOXO1 nicht phosphorylieren und im Zytosol zurückhalten, *in vivo* zu bestätigen, wäre es aufschlussreich die FOXO1-Regulation in Betazellen der mit Dexamethason behandelten Doppelknockoutmaus zu untersuchen.

Die Funktion der SGK3 in Betazellen ist bisher nicht umfangreich untersucht und bleibt ein interessantes Feld für weitere Experimente.

6.6. ERK-1/2 ist nicht in die Glukokortikoid-abhängige starke Phosphorylierung von FOXO1 involviert

Avram *et al.* ²¹³ zeigten, dass die Hemmung der PI3K durch LY294002 hoch signifikant die Dexa-vermittelte Apoptose in INS-1E Zellen steigert, während die Stimulation der PI3K mit IGF-1 signifikant den Zelltod reduzierte. Die Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY294002, der damit auch hemmend auf AKT wirkt, und gleichzeitige Stimulation mit IGF-1 führten hingegen zu einer stärkeren Senkung der Apoptoserate, als IGF-1 alleine. Dieser die Apoptose reduzierende Effekt wurde durch die zusätzliche Hemmung von ERK1/2 durch PD98059 aufgehoben. Die gleichzeitige Hemmung von ERK1/2 und PI3K verursachte eine ähnlich hohe Apoptoserate, wie die alleinige Hemmung von ERK1/2 in mit IGF-1 stimulierten Dexa-behandelten Zellen. Damit belegen diese Daten, dass ERK1/2 eine wichtige Rolle bei der Dexa-induzierten Betazell-Apoptose spielt. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Dexa-vermittelte Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung gezeigt werden, wenn die Zellen in KRB kultiviert wurden (Abb. 5.12). In der Studie von Avram *et al.* war die ERK1/2-Phosphorylierung durch Dexa alleine nicht erhöht. Dies kann aber auch an der in Vollmedium bestehenden hohen basalen ERK1/2-Phosphorylierung liegen. Diese wird durch hohe Glukosekonzentrationen im Vollmedium, sowie dadurch erhöhte Insulingehalte im Medium verursacht. Dass Glukose und Insulin zu einer Stimulation von ERK1/2 führen ist bekannt ^{285 286}. Es wurde beschrieben, dass FOXO3 ein Substrat der ERK1/2-Kinasen darstellt und dass diese Phosphorylierung die zytosolischen Lokalisation von FOXO3 bewirkt, allerdings auch dessen proteasomalen Abbau unterstützt ²⁸⁷. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der IGF-1 vermittelte schützende Effekt der ERK1/2-Aktivierung nicht durch eine Phosphorylierung an Ser256 von FOXO1 zu erklären ist. PD98059 führte zu keiner verringerten Phosphorylierung von FOXO1 an Ser256 (Abb. 5.12). Ob FOXO1 durch ERK1/2 an anderen Stellen als Ser256 phosphoryliert wird, wurde nicht untersucht.

Um den Einfluss von ERK1/2 auf FOXO1 zu untersuchen, müsste ergänzend untersucht werden, wie die zelluläre Lokalisation von FOXO1 unter Behandlung mit Dexamethason,

LY294002 (oder direkter Hemmung von AKT) bei gleichzeitiger IGF-1 Simulation in An- und Abwesenheit von PD98059 aussieht. Auf diese Weise würde erkennbar, ob durch IGF-1- und Dexa-aktiviertes ERK1/2 bei gleichzeitiger AKT-Hemmung in der Lage ist FOXO1 im Zytosol zu halten. Die für die zytosolische Lokalisation relevante Phosphorylierung von FOXO1 an Serin 256 konnte jedenfalls nicht durch gleichzeitige Behandlung mit Akti-1/2, SGK1, PD und Dexa in An- und Abwesenheit von IGF-1 gehemmt werden (Daten nicht gezeigt).

Eine schützende Wirkung durch ERK1/2 ist auch über die Phosphorylierung von BAD möglich. In retinalen Ganglionzellen wurde gezeigt, dass AKT und ERK1/2 nach IGF-1-Stimulation BAD an verschiedenen Serinen spezifisch phosphorylieren und auf diese Weise die Zellen vor der Apoptose schützen²⁸⁸. Außerdem wurde im Zusammenhang mit Glukokortikoiden publiziert, dass ERK1/2 indirekt die transkriptionelle Aktivität des GK-R hemmt^{289 290}.

Die Rolle von ERK-1/2 in der Betazelle wird kontrovers diskutiert. Unter manchen Umständen ist die Aktivität von ERK1/2 mit Apoptose assoziiert und unter anderen Umständen mit proliferativen und anti-apoptischen Effekten^{240 291}. Die Stimulation von ERK1/2 wird zudem mit Autophagie assoziiert²⁹². Die Wirkung der Kinase hängt auch davon ab, in welchem Stadium des Zellzyklus sich die Zelle befindet²⁹³. Dies könnte auch erklären, warum in dieser Arbeit unter Dexamethason eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet wurde (Abb. 5.12), in anderen Zellen aber eher eine Hemmung der ERK1/2-Kinasen beschrieben wird²⁹⁴. Interessanterweise zeigt eine Studie, dass Mäuse Prolaktinrezeptor-abhängig eine erhöhte ERK1/2 Phosphorylierung und damit verbundene Betazellproliferation in der Schwangerschaft aufweisen. Nach der Geburt und bei Beginn der Laktation dagegen ist die ERK1/2-Phosphorylierung Glukokortikoid-abhängig durch Induktion der Phosphatase MSK-1 reduziert. Diese Beobachtungen gingen mit einer reduzierten Betazellproliferation einher²⁹⁴. Desweiteren ist interessanterweise eine Interaktion von SGK1 und ERK1/2 nach Stimulation mit Dexa oder Serum beschrieben worden, welche zum einen je Stimuli die subzelluläre Lokalisierung von SGK1 bestimmt²⁹¹ und zum anderen für die Aktivierung von ERK1/2²⁹⁵ relevant ist. Eine transkriptionelle Aktivierung der SGK1²⁹⁶, sowie die Aktivierung von SGK1 durch ERK1/2^{297 270} wurden auch beschrieben. Da SGK1 in Betazellen akkumuliert, könnte damit auch die stabile Phosphorylierung von ERK1/2 nach 24 h Dexamethason im Vergleich zu einer transienten Aktivierung von ERK1/2, wie sie in anderen Zellen²⁹⁸ beschrieben wurde, erklärt werden. Hier sind

allerdings weitere Versuche notwendig, um diese Hypothese zu untersuchen. Die Regulation von ERK1/2 und die damit verbundene Funktion ist sehr komplex^{299 300}, was eine sehr gründliche Analyse notwendig macht, um dem Verständnis der Rolle von ERK1/2 in Betazellen näher zu kommen.

6.7. Weitere mögliche Mechanismen der Dexa-vermittelten Effekte

6.7.1. STAT3

Glukokortikoide und eine Aktivierung von FOXO1 scheinen synergistisch auf die Transkription des Gens, welches für das pro-apoptotische Protein BIM kodiert, zu wirken (Abb. 5.24a).

Eine synergistische Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität des an die DNA-gebundenen Glukokortikoid-Rezeptors hat die Bindung des *acute-phase response factors* STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)³⁰¹. STAT3 stimuliert außerdem durch direkte Promotorbindung die Transkription von *FoxO1* und *3* in T-Lymphozyten. Diese Induktion führte zu einer Lebensverlängerung von aktivierten Lymphozyten. Ein Knockdown von *Stat3* hingegen reduzierte die Expression von FOXO1¹⁶⁴. Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass aktives tyrosinphosphoryliertes STAT3 mit FOXO1 interagiert und dessen Rückhalten im Zytosol, aber auch eine nukleäre Translokation bewirken kann³⁰². Welche Zielgene allerdings durch STAT3-gebundenes FOXO1 transkribiert werden, bleibt offen. In T-Lymphocyten bewirkt dieser durch Zytokine induzierte Mechanismus eine verstärkte Transkription der Zellzyklusinhibitoren, wie p27 und IKappaBeta^{164 302}. In dieser Arbeit konnte eine Regulation von FOXO1 durch STAT3 in INS-1E-Zellen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um 90 Prozent verringerte STAT3 Proteinmengen hatten keinen Einfluss auf die Translokation von FOXO1 und veränderten auch nicht die Dexa-induzierte Erhöhung des Gesamtfoxoproteins. Eine leichte Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung von STAT3 durch die Behandlung mit Dexa konnte jedoch nachgewiesen werden. Interessanterweise wird auch SGK1 als Aktivator des STAT3-Signalweges in murinem Herzgewebe beschrieben³⁰³. Eine sehr viel stärkere STAT3-Phosphorylierung konnte allerdings nach einer 24-stündigen Behandlung mit 600 µmol/l Palmitat detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass Palmitat eine Akkumulation von FOXO1 im Kern bewirkt. Hier stellt hingegen PKCdelta einen wichtigen Regulator dar

¹⁸⁰. In PKCdelta-überexprimierenden INS-1E Zellen ist FOXO1 im Zellkern lokalisiert. Interessanterweise ist diese nukleäre Lokalisation von FOXO1 nicht apoptotisch. Eine Behandlung der PKCdelta-überexprimierenden Zellen mit Palmitat führt diese aber genauso wie Kontrollzellen in den Zelltod (Gerst F, nicht publizierte Daten). PKCdelta Knockdown führt zu einer hauptsächlich zytoplasmatischen Lokalisation von FOXO1 und schützt die Zellen vor Palmitat-induzierter Apoptose ¹⁸⁰. Dieser Effekt von Palmitat und PKCdelta weist auch darauf hin, dass die Zellen eine zusätzliche Herausforderung erfahren müssen, sodass eine FOXO1-abhängige Apoptose eingeleitet wird. Was die Umschaltung der anti-apoptotischen zur pro-apoptotischen Wirkung von FOXO1 bewirkt, ist nicht eindeutig geklärt. Da FOXO1 durch viele posttranslationalen Modifikationen und die Interaktion mit verschiedenen Proteinen reguliert wird (vgl. 2.3.4.), ist es eine große Herausforderung diesen Mechanismus aufzuklären. In Betazellen scheint eine Deacetylierung von FOXO1 durch SIRT-1 und eine Phosphorylierung durch JNK in diesem Zusammenhang eine Rolle zu spielen ^{304 305}. Eine Hemmung von JNK z. B. verhindert den Palmitat-induzierten Zelltod, führt aber nicht zu einer zytoplasmatischen Lokalisation von FOXO1 ³⁰⁶.

6.7.2. Phosphatasen

Eine weitere Möglichkeit der konstanten Phosphorylierung von FOXO1, aber auch ERK1/2 unter Dexa-Exzess könnte auch eine Hemmung von Phosphatasen darstellen. So könnte die Phosphorylierung von FOXO1 trotz einer verringerten Aktivität von AKT erklärt werden. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es wurde aber bereits gezeigt, dass eine PP2A-Phosphataseaktivität eine Voraussetzung für die Wirkung von Glukokortikoiden darstellt. Die Dephosphorylierung von JNK1 durch PP2A führt zu einem an Serin 226 dephosphoryliert vorliegenden Glukokortikoid-Rezeptor. Dies ist essenziell für die Translokation des Rezeptors in den Zellkern und somit auch essenziell für dessen transkriptionelle Aktivität ³⁰⁷. Eine Aktivität der PP2A passt zu der in dieser Arbeit nach Dexa-Behandlung beobachteten signifikanten Reduzierung der Phosphorylierung des PP2A-Substrates AKT in INS-1E Zellen (Abb. 5.1a). Allerdings sind die Dexa-verursachten hohen Phosphorylierungsspiegel von FOXO1 (Abb. 5.2b und c), ERK1/2 (Abb. 5.12) oder JNK1/2 (Daten nicht gezeigt), welche zudem Substrate der PP2A darstellen, kontrovers. Eine Publikation von 1998 zeigte aber, dass die Aktivierung der Phosphatase PP2A die Wirkung von Glukokortikoiden in kortikotropen hypophysären AtT-20/D16-16-Zellen zwar nachahmen kann, die Studie zeigt aber auch,

dass die Aktivität der PP2A selber nicht durch Dexamethason verändert wird, sodass ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen muss³⁰⁸. Zudem konnten Ranta *et al.*³⁰⁹ zeigen, dass Dexamethason (24h, 100 nmol/l) zu einer Aktivierung der Phosphatase PP2B (Calcineurin) führt. Interessanterweise ist Calcineurin auch für die maximale Aktivität von ERK1/2 nach Glukosestimulus in Betazellen essentiell²⁸⁵. Die erhöhte Calcineurin-Aktivität führt außerdem zu einer Dephosphorylierung von BAD. So verursachte auch die Hemmung von Calcineurin eine reduzierte Apoptose nach Dexa-Behandlung³⁰⁹. Diese Daten unterstützen die Hypothese dieser Arbeit, dass die mitochondrialen *BH3-only*-Proteine, wie BAD oder BIM einen entscheidenden Mediator des Glukokortikoid-induzierten Betazelltodes darstellen.

6.7.3. GILZ

Ein weiteres Protein, welches durch Glukokortikoide induziert wird, ist das zu der Gruppe der TSC22-Proteine gehörende GILZ (*glucocorticoid induced leucine zipper*). Es ist bekannt, dass GILZ durch Interaktion mit anderen Proteinen, wie AP-1 oder Nfκappa B die Dexa abhängige Expression bestimmter Gene reguliert. Es wurde gezeigt, dass FOXO3 durch GILZ gehemmt wird und dadurch die Expression von BIM reduziert wird. Dies hat eine verringerte Apoptose zur Folge³¹⁰. Ein bekannter Mechanismus ist, dass GILZ FOXO3 durch einen CRM1-abhängigen Mechanismus im Zytosol hält³¹¹. Auch eine Regulation von FOXO1 durch GILZ konnte kürzlich in spermatogenen Stammzellen gezeigt werden³¹². Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass die Ubiquitinierung und Degradation der SGK1 durch GILZ gehemmt wird³¹³. Diese GILZ-abhängigen Mechanismen spielen in der Betazelle aber vermutlich keine Rolle. Cannarile *et al.* zeigten, dass GILZ ubiquitär, außer in der Leber und im Pankreas, exprimiert wird³¹⁴. Da die Fragestellung dieser Arbeit auf die Betazelle fokussiert war, wurde GILZ nicht untersucht.

6.8. Glukokortikoide sensibilisieren Betazellen für zytotoxische Effekte, die eine FOXO1-Aktivierung verursachen

Der Verlust der Betazelle stellt einen entscheidenden Faktor bei der Entstehung des Diabetes mellitus dar. Aus diesem Grund wird allgemein die Induktion der Apoptose in Betazellen als negativ angesehen und die Proliferation und das Überleben der Zelle

werden angestrebt. Unter diesem Aspekt können die Kinasen AKT und SGK als ‚good guys‘ angesehen werden und FOXO als ‚bad guy‘. Wie in jeder anderen Körperzelle ist aber die Homöostase der Zelle wichtig: So führt eine unkontrollierte/dysregulierte Proliferation zu Krebs und ein unkontrollierter/dysregulierter Zelltod zum funktionellen Organversagen. In der Betazelle inhibiert FOXO1 zum Beispiel essentiell die Betazellneogenese pankreatischer Duktuszellen, ist aber gleichzeitig für die Erhaltung der Insulinsekretion unter metabolischem Stress erforderlich³¹⁵. FOXO1 scheint in der Betazelle ein Faktor zu sein, der bereits vorgeschädigte bzw. abnorme Zellen in die Apoptose führt, aber nicht den alleinigen Initiator der Apoptose darstellt. Dies wird auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, wenn Glukokortikoide und aktives FOXO1 synergistisch auf die Apoptose wirken. FOXO1 funktioniert somit auch als Sensor kranker/vorgeschädigter Zellen, der ab einer bestimmten Schwelle, bzw. Kombination verschiedener externer Stimuli die Apoptose unterstützt. Auf diese Weise kann FOXO1 vor der Erkrankung des gesamten Organes, und folglich eventuell auch des Organismus schützen. Ist FOXO im Kern lokalisiert, wie unter ROS-Bedingungen oder im Hungerzustand der Zelle¹³⁵, bewirkt er die Transkription der Gene, die für antioxidativ wirkende Enzyme kodieren¹⁸¹. Dies unterstützt die Wiederherstellung der Homöostase der Zelle. Oder FOXO1 ist inaktiv, die Zelle befindet sich aber beispielsweise bedingt durch Glukokortikoide unter Stressbedingungen. Kommt nun ein zusätzlicher Stressfaktor, wie Palmitat oder andere AKT-hemmende Bedingungen dazu, leitet aktiviertes FOXO1 die Zelle in die Apoptose.

Um die genauen Mechanismen von FOXO1 und auch den Wechsel der anti- zu proapoptotischen Wirkungen differenziert zu untersuchen, wäre es interessant in Zukunft unter definierten Bedingungen mit Hilfe von *Gene Array*-Analysen die Induktion der unterschiedlichen Zielgene von FOXO1 zu untersuchen. Die Analyse der FOXO1-Funktionen wird durch die sehr komplexe Regulation des Transkriptionsfaktors erschwert. Neben posttranslationalen Modifikationen, wie der Phosphorylierung, spielen auch die Acetylierung, Methylierung, Glykosylierung und die Interaktion mit weiteren Kofaktoren/Proteinen eine wesentliche Rolle. Auch miRNAs scheinen FOXO1 zu regulieren³¹⁶ und durch FOXO1 reguliert zu werden³¹⁷. Diese Aspekte wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, stellen aber ein interessantes und wesentliches Feld zur weiteren Analyse und zum Verständnis der Regulation und Wirkung von FOXO1 in Betazellen dar.

6.9. Schlussfolgerung

Diese Arbeit zeigt, dass für die Regulation von FOXO1 in Betazellen alle drei AKT-Isoformen relevant sind. Unter Glukokortikoid-Exzess hat SGK1 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von FOXO1 an Ser256 und Ser319 und verändert auch nicht die subzelluläre Lokalisation des TFs. Zudem wird erstmalig gezeigt, dass FOXO1 nicht den Initiator der Glukokortikoid-vermittelten Apoptose in Betazellen darstellt, obwohl Glukokortikoide die Synthese des TFs stimulieren. Dadurch wirkt eine Glukokortikoid-unabhängige Stimulation von FOXO1 synergistisch auf den Betazelltod. Abbildung 6.1 zeigt die Ergebnisse dieser Arbeit in einem möglichen Modell des Ablaufs des Glukokortikoid-induzierten Betazelltodes.

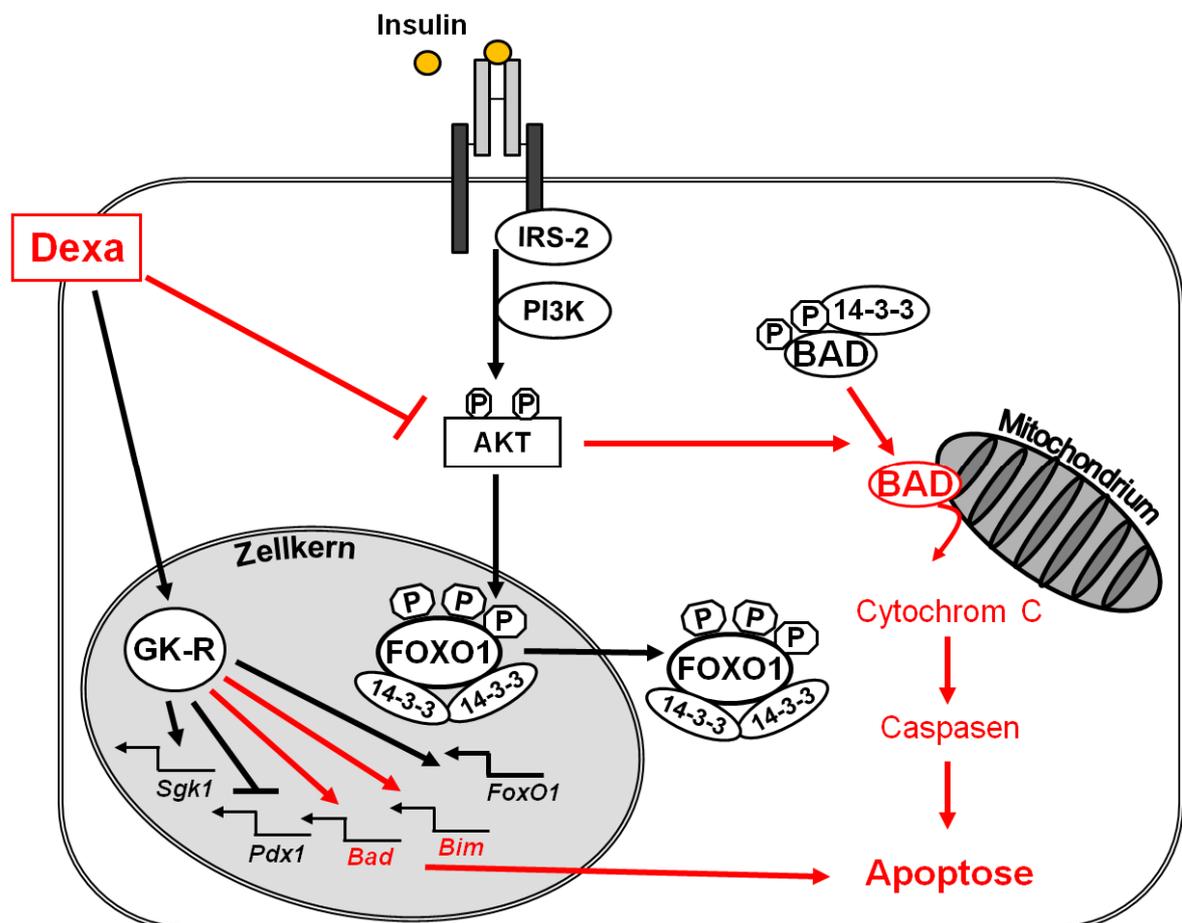


Abbildung 6.1: Dexamethason-induzierter Betazelltod wird nicht durch FOXO1 initiiert.

GK-R: Glukokortikoid-Rezeptor; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase

Referenzen

1. Holst, J. J. & Gromada, J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, E199–206 (2004).
2. Jin, W. & Patti, M.-E. Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Clin. Sci. (Lond)*. 116, 99–111 (2009).
3. Lusis, A. J., Attie, A. D. & Reue, K. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. *Nat. Rev. Genet.* 9, 819–30 (2008).
4. Weir, G. C. & Bonner-Weir, S. Five Stages of Evolving Beta-Cell Dysfunction During Progression to Diabetes. *Diabetes* 53, S16–S21 (2004).
5. Weir, G. C. & Bonner-Weir, S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1281, 92–105 (2013).
6. Kitamura, T. The role of FOXO1 in β -cell failure and type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 615–23 (2013).
7. Chadt, A., Yeo, G. S. H. & Al-Hasani, H. Nutrition-/diet-induced changes in gene expression in pancreatic β -cells. *Diabetes. Obes. Metab.* 14 Suppl 3, 57–67 (2012).
8. Schäfer, S. A., Machicao, F., Fritsche, A., Häring, H.-U. & Kantartzis, K. New type 2 diabetes risk genes provide new insights in insulin secretion mechanisms. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93 Suppl 1, S9–24 (2011).
9. Muoio, D. M. & Newgard, C. B. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 193–205 (2008).
10. Maury, E. & Brichard, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 314, 1–16 (2010).
11. Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–56 (2004).
12. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. a. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 457–65 (2012).
13. Stefan, N. & Häring, H.-U. Circulating fetuin-A and free fatty acids interact to predict insulin resistance in humans. *Nat. Med.* 19, 394–5 (2013).
14. Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806 (2001).
15. Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J. & Cantley, L. C. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol. Cell* 10, 151–62 (2002).
16. Johnson, J. A. *et al.* Diabetes and cancer (1): evaluating the temporal relationship between type 2 diabetes and cancer incidence. *Diabetologia* 55, 1607–18 (2012).

17. Handelsman, Y. *et al.* Diabetes and cancer--an AACE/ACE consensus statement. *Endocr. Pract.* 19, 675–93 (2013).
18. Stefan, N., Fritsche, A. & Häring, H.-U. [Diabetes and cancer risk]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 137, 1003–6 (2012).
19. Rorsman, P. & Braun, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 155–79 (2013).
20. Cabrera, O. *et al.* The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2334–9 (2006).
21. Bosco, D. *et al.* Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* 59, 1202–10 (2010).
22. A. Hediger, M., Mueckler, M. & Thorens, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 121–138 (2013).
23. Thorens, B. Glucose sensing and the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Obes. (Lond)*. 32 Suppl 6, S62–71 (2008).
24. Rorsman, P. & Trube, G. Glucose dependent K⁺-channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP. *Pflugers Arch.* 405, 305–9 (1985).
25. Rosário, L. M. *et al.* Bursting electrical activity in pancreatic beta-cells: evidence that the channel underlying the burst is sensitive to Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels. *Pflugers Arch.* 424, 439–47 (1993).
26. Henquin, J. C. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52, 739–51 (2009).
27. Henquin, J. C., Nenquin, M., Ravier, M. A. & Szollosi, A. Shortcomings of current models of glucose-induced insulin secretion. *Diabetes. Obes. Metab.* 11 Suppl 4, 168–79 (2009).
28. Henquin, J.-C. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93 Suppl 1, S27–31 (2011).
29. Maechler, P. & Wollheim, C. B. Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402, 685–9 (1999).
30. Maechler, P. Mitochondrial function and insulin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 379, 12–8 (2013).
31. Ashcroft, F. M. & Rorsman, P. Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 54, 87–143 (1989).
32. Henquin, J. C. Role of voltage- and Ca²⁺(+)-dependent K⁺ channels in the control of glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells. *Pflugers Arch.* 416, 568–72 (1990).
33. Gilon, P. & Henquin, J. C. Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca²⁺ concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J. Biol. Chem.* 267, 20713–20 (1992).
34. Gilon, P., Shepherd, R. M. & Henquin, J. C. Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ as evidences in single pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 268, 22265–8 (1993).

35. Kasai, H., Takahashi, N. & Tokumaru, H. Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. *Physiol. Rev.* 92, 1915–64 (2012).
36. Gilon, P. & Henquin, J. C. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr. Rev.* 22, 565–604 (2001).
37. Itoh, Y. *et al.* Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422, 173–6 (2003).
38. Wagner, T. F. J. *et al.* Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 1421–30 (2008).
39. Colsoul, B., Vennekens, R. & Nilius, B. Transient receptor potential cation channels in pancreatic β cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 161, 87–110 (2011).
40. Uchida, K. & Tominaga, M. The role of thermosensitive TRP (transient receptor potential) channels in insulin secretion. *Endocr. J.* 58, 1021–8 (2011).
41. Düfer, M. *et al.* Bile acids acutely stimulate insulin secretion of mouse β -cells via farnesoid X receptor activation and K(ATP) channel inhibition. *Diabetes* 61, 1479–89 (2012).
42. Ullrich, S. & Wollheim, C. B. Expression of both alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in an insulin-secreting cell line. Parallel studies of cytosolic free Ca²⁺ and insulin release. *Mol. Pharmacol.* 28, 100–6 (1985).
43. Hamamdžić, D., Duzić, E., Sherlock, J. D. & Lanier, S. M. Regulation of alpha 2-adrenergic receptor expression and signaling in pancreatic beta-cells. *Am. J. Physiol.* 269, E162–71 (1995).
44. Mergler, S. *et al.* Characterization of voltage operated R-type Ca²⁺ channels in modulating somatostatin receptor subtype 2- and 3-dependent inhibition of insulin secretion from INS-1 cells. *Cell. Signal.* 20, 2286–95 (2008).
45. Tirone, T. A. *et al.* Pancreatic somatostatin inhibits insulin secretion via SSTR-5 in the isolated perfused mouse pancreas model. *Pancreas* 26, e67–73 (2003).
46. Ullrich, S. *et al.* Dexamethasone increases Na⁺/K⁺ ATPase activity in insulin secreting cells through SGK1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 662–7 (2007).
47. Lambillotte, C., Gilon, P. & Henquin, J. C. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J. Clin. Invest.* 99, 414–23 (1997).
48. Ullrich, S. *et al.* Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion. *Diabetes* 54, 1090–9 (2005).
49. Drews, G., Krippeit-drews, P. & Düfer, M. *The Islets of Langerhans*. 654, (Springer Netherlands, 2010).
50. Fu, Z., Gilbert, E. R. & Liu, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* 9, 25–53 (2013).
51. Müller, D., Huang, G. C., Amiel, S., Jones, P. M. & Persaud, S. J. Identification of insulin signaling elements in human beta-cells: autocrine regulation of insulin gene expression. *Diabetes* 55, 2835–42 (2006).

52. Leibiger, I. B., Leibiger, B., Moede, T. & Berggren, P. O. Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways. *Mol. Cell* 1, 933–8 (1998).
53. Aspinwall, C. A. *et al.* Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca²⁺ stores in insulin-stimulated insulin secretion in beta -cells. *J. Biol. Chem.* 275, 22331–8 (2000).
54. Bouche, C. *et al.* Insulin enhances glucose-stimulated insulin secretion in healthy humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4770–5 (2010).
55. Iversen, J. & Miles, D. W. Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated, perfused canine pancreas. *Diabetes* 20, 1–9 (1971).
56. Khan, F. A., Goforth, P. B., Zhang, M. & Satin, L. S. Insulin activates ATP-sensitive K(+) channels in pancreatic beta-cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Diabetes* 50, 2192–8 (2001).
57. FRERICHS, H., REICH, U. & CREUTZFELDT, W. [INSULIN SECRETION IN VITRO. I. INHIBITION OF GLUCOSE-INDUCED INSULIN RELEASE BY INSULIN]. *Klin. Wochenschr.* 43, 136–40 (1965).
58. Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L. & Vigneri, R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.* 30, 586–623 (2009).
59. Vinciguerra, M. & Foti, M. PTEN and SHIP2 phosphoinositide phosphatases as negative regulators of insulin signalling. *Arch. Physiol. Biochem.* 112, 89–104 (2006).
60. Hennige, A. M. *et al.* Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes. *J. Clin. Invest.* 112, 1521–32 (2003).
61. Zhang, W. *et al.* FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 10105–17 (2006).
62. Buzzi, F. *et al.* Differential effects of protein kinase B/Akt isoforms on glucose homeostasis and islet mass. *Mol. Cell. Biol.* 30, 601–12 (2010).
63. Stambolic, V. & Woodgett, J. R. Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol.* 16, 461–6 (2006).
64. Chen, W. S. *et al.* Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* 15, 2203–8 (2001).
65. Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F. & Birnbaum, M. J. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 276, 38349–52 (2001).
66. Cho, H. *et al.* Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728–31 (2001).
67. Easton, R. M. *et al.* Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1869–78 (2005).

68. Peng, X.-D. *et al.* Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 17, 1352–65 (2003).
69. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–101 (2005).
70. Mahajan, K. & Mahajan, N. P. PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *J. Cell. Physiol.* 227, 3178–84 (2012).
71. Stronach, E. A. *et al.* DNA-PK mediates AKT activation and apoptosis inhibition in clinically acquired platinum resistance. *Neoplasia* 13, 1069–80 (2011).
72. Datta, S. R., Brunet, A. & Greenberg, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905–27 (1999).
73. Yung, H. W., Charnock-Jones, D. S. & Burton, G. J. Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner. *PLoS One* 6, e17894 (2011).
74. Kuo, Y.-C. *et al.* Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J. Biol. Chem.* 283, 1882–92 (2008).
75. Frattali, A. L., Treadway, J. L. & Pessin, J. E. Transmembrane signaling by the human insulin receptor kinase. Relationship between intramolecular beta subunit trans- and cis-autophosphorylation and substrate kinase activation. *J. Biol. Chem.* 267, 19521–8 (1992).
76. Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R. N. & Montminy, M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300, 1574–7 (2003).
77. Yun, B.-G. & Matts, R. L. Hsp90 functions to balance the phosphorylation state of Akt during C2C12 myoblast differentiation. *Cell. Signal.* 17, 1477–85 (2005).
78. Sato, S., Fujita, N. & Tsuruo, T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10832–7 (2000).
79. Du, K. & Tsichlis, P. N. Regulation of the Akt kinase by interacting proteins. *Oncogene* 24, 7401–9 (2005).
80. Dickson, L. M. & Rhodes, C. J. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, E192–8 (2004).
81. Chan, T. O., Rittenhouse, S. E. & Tsichlis, P. N. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 965–1014 (1999).
82. Cardone, M. H. *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318–21 (1998).
83. Brazil, D. P., Yang, Z.-Z. & Hemmings, B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* 29, 233–42 (2004).
84. Gottlieb, T. M., Leal, J. F. M., Seger, R., Taya, Y. & Oren, M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 21, 1299–303 (2002).

85. Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 21–35 (2011).
86. Los, M., Maddika, S., Erb, B. & Schulze-Osthoff, K. Switching Akt: from survival signaling to deadly response. *Bioessays* 31, 492–5 (2009).
87. Ishiki, M. & Klip, A. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology* 146, 5071–8 (2005).
88. Webster, M. K., Goya, L. & Firestone, G. L. Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase. *J. Biol. Chem.* 268, 11482–5 (1993).
89. Arteaga, M. F., Alvarez de la Rosa, D., Alvarez, J. A. & Canessa, C. M. Multiple translational isoforms give functional specificity to serum- and glucocorticoid-induced kinase 1. *Mol. Biol. Cell* 18, 2072–80 (2007).
90. Kobayashi, T., Deak, M., Morrice, N. & Cohen, P. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem. J.* 344 Pt 1, 189–97 (1999).
91. Lang, F. *et al.* (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol. Rev.* 86, 1151–78 (2006).
92. Pearce, L. R., Komander, D. & Alessi, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 9–22 (2010).
93. Klingel, K. *et al.* Expression of cell volume-regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G998–G1002 (2000).
94. Lang, F. *et al.* Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8157–62 (2000).
95. Lang, F., Artunc, F. & Vallon, V. The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 18, 439–48 (2009).
96. Liu, D., Yang, X. & Songyang, Z. Identification of CISK, a new member of the SGK kinase family that promotes IL-3-dependent survival. *Curr. Biol.* 10, 1233–6 (2000).
97. Waldegger, S. *et al.* Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene. *Genomics* 51, 299–302 (1998).
98. Firestone, G. L., Giampaolo, J. R. & O’Keeffe, B. A. Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell. Physiol. Biochem.* 13, 1–12 (2003).
99. Grahammer, F. *et al.* Intestinal function of gene-targeted mice lacking serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G1114–23 (2006).
100. Boini, K. M. *et al.* Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 mediates salt sensitivity of glucose tolerance. *Diabetes* 55, 2059–66 (2006).

101. García-Martínez, J. M. & Alessi, D. R. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* 416, 375–85 (2008).
102. Chen, W. *et al.* Regulation of a third conserved phosphorylation site in SGK1. *J. Biol. Chem.* 284, 3453–60 (2009).
103. Perrotti, N., He, R. A., Phillips, S. A., Haft, C. R. & Taylor, S. I. Activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase (Sgk) by cyclic AMP and insulin. *J. Biol. Chem.* 276, 9406–12 (2001).
104. Hong, F. *et al.* mTOR-raptor binds and activates SGK1 to regulate p27 phosphorylation. *Mol. Cell* 30, 701–11 (2008).
105. Shelly, C. & Herrera, R. Activation of SGK1 by HGF, Rac1 and integrin-mediated cell adhesion in MDCK cells: PI-3K-dependent and -independent pathways. *J. Cell Sci.* 115, 1985–93 (2002).
106. Park, J. *et al.* Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* 18, 3024–33 (1999).
107. Sherk, A. B. *et al.* Development of a small-molecule serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 antagonist and its evaluation as a prostate cancer therapeutic. *Cancer Res.* 68, 7475–83 (2008).
108. Wu, W. *et al.* Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res.* 64, 1757–64 (2004).
109. Dehner, M., Hadjihannas, M., Weiske, J., Huber, O. & Behrens, J. Wnt signaling inhibits Forkhead box O3a-induced transcription and apoptosis through up-regulation of serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1. *J. Biol. Chem.* 283, 19201–10 (2008).
110. Kobayashi, T. & Cohen, P. Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem. J.* 339 (Pt 2, 319–28 (1999).
111. Brunet, A. *et al.* Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol. Cell. Biol.* 21, 952–65 (2001).
112. Zhang, B. H. *et al.* Serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK phosphorylates and negatively regulates B-Raf. *J. Biol. Chem.* 276, 31620–6 (2001).
113. Alessi, D. R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M., Hemmings, B. A. & Cohen, P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 399, 333–8 (1996).
114. Murray, J. T. *et al.* Exploitation of KESTREL to identify NDRG family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3. *Biochem. J.* 384, 477–88 (2004).
115. Nishio, S. *et al.* Cap43/NDRG1/Drg-1 is a molecular target for angiogenesis and a prognostic indicator in cervical adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 264, 36–43 (2008).
116. Li, J. & Kretzner, L. The growth-inhibitory Ndr1 gene is a Myc negative target in human neuroblastomas and other cell types with overexpressed N- or c-myc. *Mol. Cell. Biochem.* 250, 91–105 (2003).

117. Tessier, M. & Woodgett, J. R. Serum and glucocorticoid-regulated protein kinases: variations on a theme. *J. Cell. Biochem.* 98, 1391–407 (2006).
118. Zhou, R. & Snyder, P. M. Nedd4-2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.* 280, 4518–23 (2005).
119. Yun, C. C. *et al.* The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the Na⁺/H⁺ exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K⁺ channel ROMK1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2823–30 (2002).
120. Lang, F. *et al.* Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase - implications for transport, excitability and cell proliferation. *Cell. Physiol. Biochem.* 13, 41–50 (2003).
121. Wagner, C. A. *et al.* Effects of the serine/threonine kinase SGK1 on the epithelial Na⁽⁺⁾ channel (ENaC) and CFTR: implications for cystic fibrosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 11, 209–18 (2001).
122. Chen, S. Y. *et al.* Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2514–9 (1999).
123. Boehmer, C. *et al.* Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel SCN5A. *Cardiovasc. Res.* 57, 1079–84 (2003).
124. Palmada, M. SGK1 Kinase Upregulates GLUT1 Activity and Plasma Membrane Expression. *Diabetes* 55, 421–427 (2006).
125. Gamper, N. *et al.* IGF-1 up-regulates K⁺ channels via PI3-kinase, PDK1 and SGK1. *Pflugers Arch.* 443, 625–34 (2002).
126. Wagner, C. A. *et al.* The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/LAT1 is associated in *Xenopus* oocytes with a non-selective cation channel that is regulated by the serine/threonine kinase sgk-1. *J. Physiol.* 526 Pt 1, 35–46 (2000).
127. Jeyaraj, S., Boehmer, C., Lang, F. & Palmada, M. Role of SGK1 kinase in regulating glucose transport via glucose transporter GLUT4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 629–35 (2007).
128. Boehmer, C. *et al.* Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1/3 and protein kinase B. *J. Neurochem.* 86, 1181–8 (2003).
129. Schniepp, R. *et al.* Retinal colocalization and in vitro interaction of the glutamate transporter EAAT3 and the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 [correction]. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1442–9 (2004).
130. Rajamanickam, J., Palmada, M., Lang, F. & Boehmer, C. EAAT4 phosphorylation at the SGK1 consensus site is required for transport modulation by the kinase. *J. Neurochem.* 102, 858–66 (2007).
131. Boehmer, C. *et al.* Regulation of the excitatory amino acid transporter EAAT5 by the serum and glucocorticoid dependent kinases SGK1 and SGK3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 738–42 (2005).
132. Schwab, M. *et al.* Association of SGK1 gene polymorphisms with type 2 diabetes. *Cell. Physiol. Biochem.* 21, 151–60 (2008).

133. Friedrich, B. *et al.* Variance of the SGK1 gene is associated with insulin secretion in different European populations: results from the TUEF, EUGENE2, and METSIM studies. *PLoS One* 3, e3506 (2008).
134. Talchai, C., Lin, H. V., Kitamura, T. & Accili, D. Genetic and biochemical pathways of beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes. Obes. Metab.* 11 Suppl 4, 38–45 (2009).
135. Glauser, D. A. & Schlegel, W. The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic beta cells. *J. Endocrinol.* 193, 195–207 (2007).
136. Kaestner, K. H., Knochel, W. & Martinez, D. E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 14, 142–6 (2000).
137. Arden, K. C. Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Exp. Gerontol.* 41, 709–17 (2006).
138. Kenyon, C. J. The genetics of ageing. *Nature* 464, 504–12 (2010).
139. Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I. & Mori, N. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem. J.* 349, 629–34 (2000).
140. Van der Vos, K. E. & Coffey, P. J. FOXO-binding partners: it takes two to tango. *Oncogene* 27, 2289–99 (2008).
141. Hedrick, S. M., Hess Michelini, R., Doedens, A. L., Goldrath, A. W. & Stone, E. L. FOXO transcription factors throughout T cell biology. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 649–61 (2012).
142. Huang, H. & Tindall, D. J. Dynamic FoxO transcription factors. *J. Cell Sci.* 120, 2479–87 (2007).
143. Kim, D. H. *et al.* FoxO6 integrates insulin signaling with gluconeogenesis in the liver. *Diabetes* 60, 2763–74 (2011).
144. Kim, D. H., Zhang, T., Lee, S. & Dong, H. H. FoxO6 in Glucose Metabolism. *J. Diabetes* (2013). doi:10.1111/1753-0407.12027
145. Hosaka, T. *et al.* Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2975–80 (2004).
146. Furuyama, T. *et al.* Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 279, 34741–9 (2004).
147. Nakae, J. *et al.* Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat. Genet.* 32, 245–53 (2002).
148. Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W. & DePinho, R. A. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301, 215–8 (2003).
149. Paik, J.-H. *et al.* FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* 128, 309–23 (2007).
150. Jacobs, F. M. J. *et al.* FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J. Biol. Chem.* 278, 35959–67 (2003).

151. Van der Heide, L. P., Jacobs, F. M. J., Burbach, J. P. H., Hoekman, M. F. M. & Smidt, M. P. FoxO6 transcriptional activity is regulated by Thr26 and Ser184, independent of nucleo-cytoplasmic shuttling. *Biochem. J.* 391, 623–9 (2005).
152. Lam, E. W.-F., Francis, R. E. & Petkovic, M. FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 722–6 (2006).
153. Van der Vos, K. E. & Coffey, P. J. The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 579–92 (2011).
154. Brunet, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857–68 (1999).
155. Kops, G. J. P. L. *et al.* Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2025–36 (2002).
156. Greer, E. L. & Brunet, A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410–25 (2005).
157. Tran, H. *et al.* DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 296, 530–4 (2002).
158. Gross, D. N., van den Heuvel, A. P. J. & Birnbaum, M. J. The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene* 27, 2320–36 (2008).
159. Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D. L. & Accili, D. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J. Clin. Invest.* 108, 1359–67 (2001).
160. Wang, M. C., Bohmann, D. & Jasper, H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* 121, 115–25 (2005).
161. Greer, E. L. *et al.* An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 17, 1646–56 (2007).
162. Nowak, K., Killmer, K., Gessner, C. & Lutz, W. E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 244–52 (2007).
163. Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C. Y., Coffey, P. J. & Demoulin, J.-B. The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. *J. Biol. Chem.* 284, 10334–42 (2009).
164. Oh, H.-M. *et al.* STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of Class O Forkhead transcription factors. *J. Biol. Chem.* 286, 30888–97 (2011).
165. Renault, V. M. *et al.* The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. *Oncogene* 30, 3207–21 (2011).
166. Zhao, Y., Wang, Y. & Zhu, W.-G. Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 276–82 (2011).
167. Brunet, A. *et al.* 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* 156, 817–28 (2002).

168. Obsilova, V. *et al.* 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry* 44, 11608–17 (2005).
169. Huang, H. *et al.* Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1649–54 (2005).
170. Singh, A. *et al.* Protein phosphatase 2A reactivates FOXO3a through a dynamic interplay with 14-3-3 and AKT. *Mol. Biol. Cell* 21, 1140–52 (2010).
171. Brenkman, A. B., de Keizer, P. L. J., van den Broek, N. J. F., Jochemsen, A. G. & Burgering, B. M. T. Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4. *PLoS One* 3, e2819 (2008).
172. Martinez, S. C. *et al.* Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Diabetes* 57, 846–59 (2008).
173. Lehtinen, M. K. *et al.* A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell* 125, 987–1001 (2006).
174. Wang, F., Nguyen, M., Qin, F. X.-F. & Tong, Q. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell* 6, 505–14 (2007).
175. Matsuzaki, H. *et al.* Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11278–83 (2005).
176. Qiang, L., Banks, A. S. & Accili, D. Uncoupling of acetylation from phosphorylation regulates FoxO1 function independent of its subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 285, 27396–401 (2010).
177. Yamagata, K. *et al.* Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol. Cell* 32, 221–31 (2008).
178. Kaneto, H. *et al.* Crucial role of PDX-1 in pancreas development, beta-cell differentiation, and induction of surrogate beta-cells. *Curr. Med. Chem.* 14, 1745–52 (2007).
179. Kitamura, T. *et al.* The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J. Clin. Invest.* 110, 1839–47 (2002).
180. Hennige, A. M. *et al.* Overexpression of kinase-negative protein kinase Cdelta in pancreatic beta-cells protects mice from diet-induced glucose intolerance and beta-cell dysfunction. *Diabetes* 59, 119–27 (2010).
181. Kitamura, Y. I. *et al.* FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab.* 2, 153–63 (2005).
182. Kitamura, T. *et al.* Regulation of pancreatic juxtaductal endocrine cell formation by FoxO1. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4417–30 (2009).
183. Johansson, K. a *et al.* Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. *Dev. Cell* 12, 457–65 (2007).
184. Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V, Sussel, L. & Accili, D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell* 150, 1223–34 (2012).

185. Butler, A. E. *et al.* Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–10 (2003).
186. Donath, M. Y. & Halban, P. A. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47, 581–9 (2004).
187. Maedler, K. *et al.* Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* 50, 69–76 (2001).
188. Kharroubi, I. *et al.* Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145, 5087–96 (2004).
189. El-Assaad, W. *et al.* Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* 144, 4154–63 (2003).
190. Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B. & Andrews, D. W. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008714 (2013).
191. Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205–19 (2004).
192. Kepp, O. *et al.* Bim and Bmf synergize to induce apoptosis in *Neisseria gonorrhoeae* infection. *PLoS Pathog.* 5, e1000348 (2009).
193. Hübner, A., Cavanagh-Kyros, J., Rincon, M., Flavell, R. A. & Davis, R. J. Functional cooperation of the proapoptotic Bcl2 family proteins Bmf and Bim in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 30, 98–105 (2010).
194. Adams, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 17, 2481–95 (2003).
195. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 231–41 (2008).
196. Eizirik, D. L., Cardozo, A. K. & Cnop, M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr. Rev.* 29, 42–61 (2008).
197. Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. & Lenzen, S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46, 1733–42 (1997).
198. Kaufman, R. J., Back, S. H., Song, B., Han, J. & Hassler, J. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in β -cells. *Diabetes. Obes. Metab.* 12 Suppl 2, 99–107 (2010).
199. Cetkovic-Cvrlje, M. & Eizirik, D. L. TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* 6, 399–406 (1994).
200. Buckingham, J. C. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl , S258–68 (2006).
201. Vera, F., Zenuto, R. R. & Antenucci, C. D. Differential responses of cortisol and corticosterone to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in a subterranean rodent (*Ctenomys talarum*). *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* 317, 173–84 (2012).

202. Andrews, R. C. & Walker, B. R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin. Sci. (Lond)*. 96, 513–23 (1999).
203. Schäcke, H., Döcke, W. D. & Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther.* 96, 23–43 (2002).
204. Clore, J. N. & Thurby-Hay, L. Glucocorticoid-induced hyperglycemia. *Endocr. Pract.* 15, 469–74
205. Tounian, P., Schneiter, P., Henry, S., Delarue, J. & Tappy, L. Effects of dexamethasone on hepatic glucose production and fructose metabolism in healthy humans. *Am. J. Physiol.* 273, E315–20 (1997).
206. Vidal-Puig, A. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 99, 2416–22 (1997).
207. Ong, J. M., Simsolo, R. B., Saffari, B. & Kern, P. A. The regulation of lipoprotein lipase gene expression by dexamethasone in isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 130, 2310–6 (1992).
208. Beaudry, J. L. & Riddell, M. C. Effects of glucocorticoids and exercise on pancreatic β -cell function and diabetes development. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 28, 560–73 (2012).
209. Ranta, F. *et al.* Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4. *Diabetes* 55, 1380–90 (2006).
210. Philippe, J. & Missotten, M. Dexamethasone inhibits insulin biosynthesis by destabilizing insulin messenger ribonucleic acid in hamster insulinoma cells. *Endocrinology* 127, 1640–5 (1990).
211. Gremlich, S., Roduit, R. & Thorens, B. Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic beta cells. Comparison with the effects of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 272, 3216–22 (1997).
212. Delaunay, F. *et al.* Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 100, 2094–8 (1997).
213. Avram, D. *et al.* IGF-1 protects against dexamethasone-induced cell death in insulin secreting INS-1 cells independent of AKT/PKB phosphorylation. *Cell. Physiol. Biochem.* 21, 455–62 (2008).
214. Borboni, P. *et al.* Quantitative analysis of pancreatic glucokinase gene expression in cultured beta cells by competitive polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 117, 175–81 (1996).
215. So, A. Y.-L., Chaivorapol, C., Bolton, E. C., Li, H. & Yamamoto, K. R. Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet.* 3, e94 (2007).
216. Del Monaco, M. *et al.* Identification of novel glucocorticoid-response elements in human elastin promoter and demonstration of nucleotide sequence specificity of the receptor binding. *J. Invest. Dermatol.* 108, 938–42 (1997).
217. Reichardt, H. M. *et al.* Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 20, 7168–73 (2001).

218. Jonat, C. *et al.* Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189–204 (1990).
219. Stöcklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F. & Groner, B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383, 726–8 (1996).
220. Gehring, U. [Glucocorticoid receptors: basis for the diverse clinical actions of glucocorticoids]. *Med. Klin. (Munich)*. 99, 228–35 (2004).
221. Asfari, M. *et al.* Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130, 167–78 (1992).
222. Merglen, A. *et al.* Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* 145, 667–78 (2004).
223. Park, K.-S., Wiederkehr, A. & Wollheim, C. B. Defective mitochondrial function and motility due to mitofusin 1 overexpression in insulin secreting cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 16, 71–7 (2012).
224. Casimir, M., Rubi, B., Frigerio, F., Chaffard, G. & Maechler, P. Silencing of the mitochondrial NADH shuttle component aspartate-glutamate carrier AGC1/Aralar1 in INS-1E cells and rat islets. *Biochem. J.* 424, 459–66 (2009).
225. Stone, D., David, A., Bolognani, F., Lowenstein, P. R. & Castro, M. G. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *J. Endocrinol.* 164, 103–18 (2000).
226. Bett, A. J., Prevec, L. & Graham, F. L. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* 67, 5911–21 (1993).
227. Danthinne, X. & Imperiale, M. J. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* 7, 1707–14 (2000).
228. Mizuguchi, H. & Kay, M. A. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum. Gene Ther.* 9, 2577–83 (1998).
229. Mizuguchi, H. & Kay, M. A. A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 10, 2013–7 (1999).
230. Chung, C. T. & Miller, R. H. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 3580 (1988).
231. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408 (2001).
232. Zhang, X. *et al.* Inhibition of forkhead box O1 protects pancreatic beta-cells against dexamethasone-induced dysfunction. *Endocrinology* 150, 4065–73 (2009).
233. Feng, Y., Wang, Q., Wang, Y., Yard, B. & Lang, F. SGK1-mediated fibronectin formation in diabetic nephropathy. *Cell. Physiol. Biochem.* 16, 237–44 (2005).
234. Lindsley, C. W. *et al.* Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 761–4 (2005).
235. Yao, L.-J. *et al.* Novel role for SGK3 in glucose homeostasis revealed in SGK3/Akt2 double-null mice. *Mol. Endocrinol.* 25, 2106–18 (2011).

236. Lachelin, G. C., Barnett, M., Hopper, B. R., Brink, G. & Yen, S. S. Adrenal function in normal women and women with the polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49, 892–8 (1979).
237. Halban, P. A., Praz, G. A. & Wollheim, C. B. Abnormal glucose metabolism accompanies failure of glucose to stimulate insulin release from a rat pancreatic cell line (RINm5F). *Biochem. J.* 212, 439–43 (1983).
238. Poitout, V., Olson, L. K. & Robertson, R. P. Insulin-secreting cell lines: classification, characteristics and potential applications. *Diabetes Metab.* 22, 7–14 (1996).
239. Ullrich, S., Abel, K. B., Lehr, S. & Greger, R. Effects of glucose, forskolin and tolbutamide on membrane potential and insulin secretion in the insulin-secreting cell line INS-1. *Pflugers Arch.* 432, 630–6 (1996).
240. Ullrich, S. Chapter 37 IGF-1 and insulin-receptor signalling in insulin secreting cells : from function to survival Discovery of insulin and IGF-1 receptors : subtypes , structures and ligand affinities. *The Islets of Langerhans, Series: Adv. Exp. Med. Biol. Edition 2*, (August 2014)
241. Arumugam, R. *et al.* The interplay of prolactin and the glucocorticoids in the regulation of beta-cell gene expression, fatty acid oxidation, and glucose-stimulated insulin secretion: implications for carbohydrate metabolism in pregnancy. *Endocrinology* 149, 5401–14 (2008).
242. Nahlé, Z. *et al.* CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR delta/beta-mediated adaptation to metabolic stress. *J. Biol. Chem.* 283, 14317–26 (2008).
243. Castellero, E., Alamdari, N., Aversa, Z., Gurav, A. & Hasselgren, P.-O. PPAR β/δ regulates glucocorticoid- and sepsis-induced FOXO1 activation and muscle wasting. *PLoS One* 8, e59726 (2013).
244. Lütznér, N., Kalbacher, H., Kroner-Herzig, A. & Rösl, F. FOXO3 is a glucocorticoid receptor target and regulates LKB1 and its own expression based on cellular AMP levels via a positive autoregulatory loop. *PLoS One* 7, e42166 (2012).
245. Miao, H., Zhang, Y., Lu, Z., Liu, Q. & Gan, L. FOXO1 involvement in insulin resistance-related pro-inflammatory cytokine production in hepatocytes. *Inflamm. Res.* 61, 349–58 (2012).
246. Poulsen, R. C., Carr, A. J. & Hulley, P. A. Protection against glucocorticoid-induced damage in human tenocytes by modulation of ERK, Akt, and forkhead signaling. *Endocrinology* 152, 503–14 (2011).
247. Puthanveetil, P. *et al.* The increase in cardiac pyruvate dehydrogenase kinase-4 after short-term dexamethasone is controlled by an Akt-p38-forkhead box other factor-1 signaling axis. *Endocrinology* 151, 2306–18 (2010).
248. Waddell, D. S. *et al.* The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E785–97 (2008).
249. Aoyagi, K. *et al.* Acute inhibition of PI3K-PDK1-Akt pathway potentiates insulin secretion through upregulation of newcomer granule fusions in pancreatic β -cells. *PLoS One* 7, e47381 (2012).
250. Abrams, M. T., Robertson, N. M., Yoon, K. & Wickstrom, E. Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. *J. Biol. Chem.* 279, 55809–17 (2004).

251. Frankfurt, O. & Rosen, S. T. Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates. *Curr. Opin. Oncol.* 16, 553–63 (2004).
252. Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–41 (1997).
253. Nuutinen, U. *et al.* Inhibition of PI3-kinase-Akt pathway enhances dexamethasone-induced apoptosis in a human follicular lymphoma cell line. *Exp. Cell Res.* 312, 322–30 (2006).
254. Kwon, S. & Hermayer, K. L. Glucocorticoid-induced hyperglycemia. *Am. J. Med. Sci.* 345, 274–7 (2013).
255. Bernal-Mizrachi, E. *et al.* Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells. *J. Clin. Invest.* 114, 928–36 (2004).
256. Tzivion, G., Dobson, M. & Ramakrishnan, G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1938–45 (2011).
257. Holst, L. S. *et al.* Protein kinase B is expressed in pancreatic beta cells and activated upon stimulation with insulin-like growth factor I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 181–6 (1998).
258. Schultze, S. M., Jensen, J., Hemmings, B. A., Tschopp, O. & Niessen, M. Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism. *Arch. Physiol. Biochem.* 117, 70–7 (2011).
259. Simon, P. *et al.* Differential regulation of serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) splice variants based on alternative initiation of transcription. *Cell. Physiol. Biochem.* 20, 715–28 (2007).
260. Lang, F. & Cohen, P. Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci. STKE* 2001, re17 (2001).
261. Bogusz, A. M., Brickley, D. R., Pew, T. & Conzen, S. D. A novel N-terminal hydrophobic motif mediates constitutive degradation of serum- and glucocorticoid-induced kinase-1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *FEBS J.* 273, 2913–28 (2006).
262. Zhang, L., Cui, R., Cheng, X. & Du, J. Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I κ B kinase. *Cancer Res.* 65, 457–64 (2005).
263. Leong, M. L. L., Maiyar, A. C., Kim, B., O’Keeffe, B. A. & Firestone, G. L. Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 5871–82 (2003).
264. Feroze-Zaidi, F. *et al.* Role and regulation of the serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 in fertile and infertile human endometrium. *Endocrinology* 148, 5020–9 (2007).
265. Di Pietro, N. *et al.* Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) regulates adipocyte differentiation via forkhead box O1. *Mol. Endocrinol.* 24, 370–80 (2010).
266. Sakoda, H. *et al.* Differing roles of Akt and serum- and glucocorticoid-regulated kinase in glucose metabolism, DNA synthesis, and oncogenic activity. *J. Biol. Chem.* 278, 25802–7 (2003).

267. Dai, F. *et al.* Human serum and glucocorticoid-inducible kinase-like kinase (SGKL) phosphorylates glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) at serine-9 through direct interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1191–6 (2002).
268. Lang, F. *et al.* (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol. Rev.* 86, 1151–78 (2006).
269. Lang, F. & Stournaras, C. Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. *Hormones (Athens)*. 12, 160–71
270. You, H. *et al.* p53-dependent inhibition of FKHRL1 in response to DNA damage through protein kinase SGK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14057–62 (2004).
271. Nasir, O. *et al.* Relative resistance of SGK1 knockout mice against chemical carcinogenesis. *IUBMB Life* 61, 768–76 (2009).
272. Tikhanovich, I., Cox, J. & Weinman, S. A. Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28 Suppl 1, 125–31 (2013).
273. Tsunekawa, S. *et al.* FoxO feedback control of basal IRS-2 expression in pancreatic β -cells is distinct from that in hepatocytes. *Diabetes* 60, 2883–91 (2011).
274. Abdelli, S. & Bonny, C. JNK3 maintains expression of the insulin receptor substrate 2 (IRS2) in insulin-secreting cells: functional consequences for insulin signaling. *PLoS One* 7, e35997 (2012).
275. Wu, C. *et al.* Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* 496, 513–7 (2013).
276. Raikwar, N. S., Liu, K. Z. & Thomas, C. P. A regulated NH2-terminal Sgk1 variant with enhanced function is expressed in the collecting duct. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 303, F1527–33 (2012).
277. Dai, F. *et al.* Cloning and mapping of a novel human serum/glucocorticoid regulated kinase-like gene, SGKL, to chromosome 8q12.3-q13.1. *Genomics* 62, 95–7 (1999).
278. Bruhn, M. A., Pearson, R. B., Hannan, R. D. & Sheppard, K. E. AKT-independent PI3-K signaling in cancer - emerging role for SGK3. *Cancer Manag. Res.* 5, 281–92 (2013).
279. Wang, Y. *et al.* SGK3 is an estrogen-inducible kinase promoting estrogen-mediated survival of breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 25, 72–82 (2011).
280. Vogel, H. *et al.* Estrogen deficiency aggravates insulin resistance and induces β -cell loss and diabetes in female New Zealand obese mice. *Horm. Metab. Res.* 45, 430–5 (2013).
281. Vasudevan, K. M. *et al.* AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell* 16, 21–32 (2009).
282. Gagliardi, P. A. *et al.* 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 controls breast tumor growth in a kinase-dependent but Akt-independent manner. *Neoplasia* 14, 719–31 (2012).
283. Liu, M. *et al.* Serum and glucocorticoid kinase 3 at 8q13.1 promotes cell proliferation and survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 55, 1754–65 (2012).

284. McCormick, J. A. *et al.* Targeted disruption of the protein kinase SGK3/CISK impairs postnatal hair follicle development. *Mol. Biol. Cell* 15, 4278–88 (2004).
285. Duan, L. & Cobb, M. H. Calcineurin increases glucose activation of ERK1/2 by reversing negative feedback. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22314–9 (2010).
286. Lawrence, M. C. *et al.* The roles of MAPKs in disease. *Cell Res.* 18, 436–42 (2008).
287. Yang, J.-Y. *et al.* ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat. Cell Biol.* 10, 138–48 (2008).
288. Yang, X. *et al.* IGF-1 protects retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis by activating the Erk-1/2 and Akt pathways. *Mol. Vis.* 19, 1901–12 (2013).
289. Irusen, E. *et al.* p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109, 649–57 (2002).
290. Rogatsky, I., Logan, S. K. & Garabedian, M. J. Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2050–5 (1998).
291. Pavlovic, D., Andersen, N. A., Mandrup-Poulsen, T. & Eizirik, D. L. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 contributes to cytokine-induced apoptosis in purified rat pancreatic beta-cells. *Eur. Cytokine Netw.* 11, 267–74 (2000).
292. Kubisch, J. *et al.* Complex regulation of autophagy in cancer - integrated approaches to discover the networks that hold a double-edged sword. *Semin. Cancer Biol.* 23, 252–61 (2013).
293. Ramos, J. W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2707–19 (2008).
294. Nicoletti-Carvalho, J. E. *et al.* MKP-1 mediates glucocorticoid-induced ERK1/2 dephosphorylation and reduction in pancreatic β -cell proliferation in islets from early lactating mothers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299, E1006–15 (2010).
295. Won, M. *et al.* Protein kinase SGK1 enhances MEK/ERK complex formation through the phosphorylation of ERK2: implication for the positive regulatory role of SGK1 on the ERK function during liver regeneration. *J. Hepatol.* 51, 67–76 (2009).
296. Mizuno, H. & Nishida, E. The ERK MAP kinase pathway mediates induction of SGK (serum- and glucocorticoid-inducible kinase) by growth factors. *Genes Cells* 6, 261–8 (2001).
297. Lee, C.-T. *et al.* Serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the MAPK/ERK signaling pathway that mediates memory formation in rats. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1311–20 (2006).
298. Kumar, S. *et al.* Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 2412–25 (2009).
299. Stork, P. J. S. & Schmitt, J. M. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 12, 258–66 (2002).
300. Wrighton, K. H. Cell signalling: A new MAP for miRNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 734–734 (2009).

301. Langlais, D., Couture, C., Balsalobre, A. & Drouin, J. The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome. *Mol. Cell* 47, 38–49 (2012).
302. Oh, H.-M., Yu, C.-R., Dambuza, I., Marrero, B. & Egwuagu, C. E. STAT3 protein interacts with Class O Forkhead transcription factors in the cytoplasm and regulates nuclear/cytoplasmic localization of FoxO1 and FoxO3a proteins in CD4(+) T cells. *J. Biol. Chem.* 287, 30436–43 (2012).
303. Yang, M. *et al.* Serum-glucocorticoid regulated kinase 1 regulates alternatively activated macrophage polarization contributing to angiotensin II-induced inflammation and cardiac fibrosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1675–86 (2012).
304. Hughes, K. J., Meares, G. P., Hansen, P. A. & Corbett, J. A. FoxO1 and SIRT1 regulate beta-cell responses to nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 286, 8338–48 (2011).
305. Kawamori, D. *et al.* The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation. *J. Biol. Chem.* 281, 1091–8 (2006).
306. Paz, K. *et al.* A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272, 29911–8 (1997).
307. Kobayashi, Y., Mercado, N., Barnes, P. J. & Ito, K. Defects of protein phosphatase 2A causes corticosteroid insensitivity in severe asthma. *PLoS One* 6, e27627 (2011).
308. Tian, L., Knaus, H. G. & Shipston, M. J. Glucocorticoid regulation of calcium-activated potassium channels mediated by serine/threonine protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 273, 13531–6 (1998).
309. Ranta, F. *et al.* Regulation of calcineurin activity in insulin-secreting cells: stimulation by Hsp90 during glucocorticoid-induced apoptosis. *Cell. Signal.* 20, 1780–6 (2008).
310. Asselin-Labat, M.-L. *et al.* GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* 104, 215–23 (2004).
311. Latré de Laté, P. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 285, 5594–605 (2010).
312. Ngo, D. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) regulates testicular FOXO1 activity and spermatogonial stem cell (SSC) function. *PLoS One* 8, e59149 (2013).
313. Soundararajan, R., Wang, J., Melters, D. & Pearce, D. Glucocorticoid-induced Leucine zipper 1 stimulates the epithelial sodium channel by regulating serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 stability and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 285, 39905–13 (2010).
314. Cannarile, L. *et al.* Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell Death Differ.* 8, 201–3 (2001).
315. Kobayashi, M. *et al.* FoxO1 as a double-edged sword in the pancreas: analysis of pancreas- and β -cell-specific FoxO1 knockout mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E603–13 (2012).
316. Guttilla, I. K. & White, B. A. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 284, 23204–16 (2009).

317. Singhal, R., Bard, J. E., Nowak, N. J., Buck, M. J. & Kandel, E. S. FOXO1 regulates expression of a microRNA cluster on X chromosome. *Aging (Albany, NY)*. 5, 347–56 (2013).

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 2.1: VEREINFACHTE SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER INSULINSEKRETION	11
ABBILDUNG 2.2: INSULINSIGNALWEG	13
ABBILDUNG 2.3: STRUKTUR UND REGULATION VON FOXO-PROTEINEN	22
ABBILDUNG 4.1: BEISPIEL EINES TESTS DER GLUKOSE-STIMULIERTEN INSULINSEKRETION VON INS-1E ZELLEN	45
ABBILDUNG 5.1: DEXA REDUZIERT DIE PHOSPHORYLIERUNG VON AKT. ERHÖHTE GESAMTPROTEIN-MENGEN VON FOXO1 BLEIBEN PHOSPHORYLIERT UND IN DER ZELLE ZYTOSOLISCH LOKALISIERT	64
ABBILDUNG 5.2: EFFEKTE VON DEXA AUF DIE TRANSKRIPTION DER FOXO-ISOFORMEN	65
ABBILDUNG 5.3: DER GLUKOKORTIKOIDREZEPTOR-INHIBITOR MIFEPRISTONE HEMMT DIE DEXA-INDUZIERTE TRANSKRIPTION DER FOXO-ISOFORMEN	66
ABBILDUNG 5.4: EFFEKTE VON DEXA AUF DIE TRANSKRIPTION DER AKT- UND SGK-ISOFORMEN	67
ABBILDUNG 5.5: DER GLUKOKORTIKOIDREZEPTOR-INHIBITOR MIFEPRISTONE HEMMT DIE DEXA-STIMULIERTE TRANSKRIPTION VON SGK1	68
ABBILDUNG 5.6: DEXA INDUZIERT DIE SYNTHESE VON SGK1	69
ABBILDUNG 5.7: TRANSFEKTION MIT SISGK1 BEEINFLUSST NICHT DIE PHOSPHORYLIERUNG VON FOXO1	70
ABBILDUNG 5.8: VERÄNDERTE AKTIVITÄT VON SGK1 BEEINFLUSST NICHT DIE PHOSPHORYLIERUNG VON FOXO1	71
ABBILDUNG 5.9: SERUMFREIE ZELLKULTUR HAT KEINEN EFFEKT AUF DIE ZYTOSOLISCHE VERTEILUNG VON FOXO1	72
ABBILDUNG 5.10: KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DES SGK1-INHIBITORS GSK650394	73
ABBILDUNG 5.11: DER SGK1-INHIBITOR HAT KEINEN EFFEKT AUF DIE PHOSPHORYLIERUNG UND ZELLULÄRE VERTEILUNG VON FOXO1	75
ABBILDUNG 5.12: DER MEK1- INHIBITOR PD98059 HEMMT DIE PHOSPHORYLIERUNG VON ERK1/2 ABER NICHT DIE PHOSPHORYLIERUNG VON FOXO1	76
ABBILDUNG 5.13: DIE KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DES PAN-AKT-INHIBITORS AKTI-1/2 AUF P-FOXO1 UND P-GSK3A/B	78
ABBILDUNG 5.14: AKTI-1/2 HEMMT DIE PHOSPHORYLIERUNG VON FOXO1 UND FÜHRT ZU DESSEN AKKUMULATION IM ZELLKERN	80
ABBILDUNG 5.15: DEXA FÜHRT ZU ERHÖHTEN FOXO1-PROTEINMENGEN SOWOHL IM ZYTOSOL ALS AUCH IM ZELLKERN	82
ABBILDUNG 5.16: DIE VERRINGERTE EXPRESSION EINER AKT-ISOFORM REDUZIERT NICHT DIE PHOSPHORYLIERUNG VON FOXO1	85
ABBILDUNG 5.17: DIE VERRINGERTE EXPRESSION ZWEIER AKT-ISOFORMEN VERÄNDERT NICHT DIE PHOSPHORYLIERUNG UND ZELLULÄRE VERTEILUNG VON FOXO1	86
ABBILDUNG 5.18: DIE PHOSPHORYLIERUNG UND NUKLEÄRE AKKUMULATION VON FOXO1 HÄNGT VON ALLEN DREI AKT-ISOFORMEN 1,2 UND 3 AB	88
ABBILDUNG 5.19: MRNA-SPIEGEL DER MIT SIAKT2/SGK3 TRANSFIZIERTEN ZELLEN	89

ABBILDUNG 5.20: DIE ERNIEDRIGTE TRANSKRIPTION VON <i>AKT2</i> UND <i>SGK3</i> VERÄNDERT NICHT DIE DEXA-VERMITTELTEN EFFEKTE AUF DIE PHOSPHORYLIERUNG UND ZELLULÄRE VERTEILUNG VON <i>FOXO1</i>	90
ABBILDUNG 5.21: MRNA-SPIEGEL DER <i>FOXO</i> -ISOFORMEN IN ZELLEN, DIE MIT <i>SIFOXO1</i> TRANSFIZIERT WURDEN	91
ABBILDUNG 5.22: EFFEKTE EINER REDUZIERTEN <i>FOXO1</i> -SYNTHESE AUF DIE DEXA-VERMITTELTE APOPTOSE	92
ABBILDUNG 5.23: DEXA-VERMITTELTE SPALTUNG VON <i>CASPASE3</i> FINDET UNABHÄNGIG VON DER AKTIVITÄT VON <i>FOXO1</i> STATT	93
ABBILDUNG 5.24: MRNA SPIEGEL VON <i>FOXO1</i> -TARGETGENEN NACH DEXA-BEHANDLUNG IN <i>FOXO1</i> -DEFIZIENTEN <i>INS-1E</i> ZELLEN	95
ABBILDUNG 5.25: IN MURINEN BETAZELLEN HAT DEXA VERGLEICHBARE EFFEKTE AUF DIE TRANSKRIPTION VON <i>FOXO1</i> UND <i>3</i> UND DEREN TARGETGENE <i>BIM</i> UND <i>PDX1</i> , WIE IN <i>INS-1E</i> -ZELLEN	96
ABBILDUNG 5.26: DEXA FÜHRT ZU EINER AKKUMULATION VON <i>FOXO1</i> IN MURINEN BETAZELLEN	97
ABBILDUNG 6.1: DEXAMETHASON-INDUZIERTER BETAZELLTOD WIRD NICHT DURCH <i>FOXO1</i> INITIIERT.	117