



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Das FoxO3-induzierte Transkriptom in primären humanen Endothelzellen

Autor: Tobias Czymai
Institut / Klinik: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Doktorvater: Prof. Dr. M. Goebeler

FoxOs (FoxO1, FoxO3, FoxO4) aus der Klasse der Forkheadtranskriptionsfaktoren stellen die Orthologe des Transkriptionsfaktors DAF-16 dar, welcher im Nematodenwurm *C. elegans* die Lebenszeit in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen reguliert. In Säugern kontrolliert er essentielle biologische Funktionen wie Apoptose, Zellzyklusarrest, Stressresistenz, vaskuläre Remodellierung und Metabolismus. FoxOs werden durch posttranslationale Modifikationen (PTM) wie Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung, wobei der Wachstumsfaktor-induzierte Rezeptortyrosinkinase - Phosphoinositid 3-Kinase - Proteinkinase B-Signalweg den wichtigsten Regulationsmechanismus darstellt. FoxOs regulieren die Genexpression durch die Bindung ihrer evolutionär konservierten DNA-Bindedomäne, der „Forkheadbox“, an Forkhead-responsive Elemente (FREs) in den Promotoren der Zielgene. Durch Interaktionen der Isoform-spezifischen Transaktivierungsdomäne existieren auch FRE-unabhängige und bisher unbekannte Mechanismen der Genregulation. Obwohl umfassende *in vitro*-Studien über die FoxO-spezifische Genexpression existieren, fehlen Ansätze zur Aufklärung des FRE-unabhängig induzierten Transkriptoms und der verantwortlichen Mechanismen in einem biologisch und klinisch relevanten Zelltyp. Die FRE-unabhängige Genexpression könnte den aus FoxO-Knockout-Maus-Studien stammenden scheinbaren Widerspruch erklären, dass sich Isoform-spezifische Funktionen während der Embryonalentwicklung und gleichzeitige Redundanz hinsichtlich der tumorsuppressiven Funktion in adulten Mäusen gegenüberstehen. Zur Klärung dieser Problematik sollte in der vorliegenden Arbeit sowohl das FRE-abhängige als auch -unabhängige Transkriptom von FoxO3 in primären humanen Endothelzellen (HUVEC) mittels Microarray näher untersucht werden, um daraus Rückschlüsse auf grundlegende Regulationsmechanismen zu ziehen.

Dazu wurden ein retroviral transduzierbares, PKB-insensitives und durch 4-Hydroxytamoxifen konditionell aktivierbares FoxO3-Östrogenrezeptor Fusionsprotein sowie eine daraus generierte FoxO3-FRE-Mutante verwendet, welche nicht mehr an FREs binden kann. Diese Mutante aktivierte weder ein Forkhead-responsives Luciferasekonstrukt noch band es mit Promotoren von ausgesuchten Zielgenen oder führte zu deren Transkription. Die bioinformatische Analyse von Microarray-Experimenten mit beiden FoxO3-Mutanten in HUVEC zeigte, dass prominente Funktionen von FoxOs FRE-unabhängig reguliert werden, darunter Apoptose, Zellzyklusarrest und Modulation des Immunsystems, wohingegen vaskuläre Remodellierung und Migration FRE-abhängig reguliert werden. Die funktionelle Charakterisierung ergab, dass die Expression von FoxO3 und der FRE-Mutante zu einem FRE-unabhängig regulierten G1-S-Zellzyklusarrest und anschließender Apoptose-Induktion führte. Eine Partizipation des extrinsischen Todesrezeptor-vermittelten Apoptosesignalweges wurde ausgeschlossen, da weder die Behandlung mit einem Inhibitor noch die Überexpression eines Antagonisten für diesen Signalweg die Apoptose antagonisieren konnten. Die Microarray-Analyse sowie die funktionelle Charakterisierung zeigten BIM als FRE-unabhängig regulierten Aktivator und NOXA als FRE-abhängig regulierten Sensitivierer der induzierten Apoptose.

Die Arbeit offenbart, dass prominente Funktionen von FoxOs durch FRE-unabhängige Mechanismen reguliert werden. Der Widerspruch zwischen funktioneller Redundanz bei gleichzeitiger spezifischer Funktion lässt sich durch die Existenz eines weiteren Regulationssystems erklären. Dabei interagieren in einem „FoxO-Puzzle“ die unterschiedlichen FoxO-Proteine mit zelltypspezifisch exprimierten Kofaktoren und determinieren zusammen mit dem Muster aus PTMs, dem „FoxO-Code“ den tatsächlichen Effekt der FoxO-Aktivierung. Da die genauen Details dieser Mechanismen noch immer unbekannt sind und die tumorsuppressive Wirkung verschiedener in der Tumorthherapie eingesetzter Medikamente durch die Aktivierung von FoxOs vermittelt wird, ist die genaue Aufklärung dieser Regulationsmechanismen von wichtigem klinischen Interesse für die Biomedizin.