Małgorzata M. Jakubowska

Positive Regulation der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Genexpression durch Insulin und Glucagon in primären Rattenhepatozyten

Cuvillier Verlag Göttingen

Aus der Abteilung Biochemie I
(Komm. Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. I. Probst)
im Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Positive Regulation der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Genexpression durch Insulin und Glucagon in primären Rattenhepatozyten

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

MAŁGORZATA MARIA JAKUBOWSKA

aus Końskie (Polen)

Göttingen 2004

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.ddb.de abrufbar.
1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2004
ISBN 3-86537-260-0

Dekan:	Prof. Dr. med. M. Droese

I. Berichterstatter:	PD Dr. med. Th. Kietzmann
II. Berichterstatterin:	PD Dr. rer. nat. S. Mihm
Tag der mündlichen Prüfung:	19. Oktober 2004

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
1. Auflage, 2004
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-260-0

Für meine Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS VI

TABELLENVERZEICHNIS VIII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IX

1. EINLEITUNG 1

1.1 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 als Regulator der Fibrinolyse 1

1.2 Modulation der PAI-1-Genexpression 2

1.2.1 Die 5´-regulatorische Region des PAI-1-Gens 3

1.3 Kontrolle der Genexpression durch Insulin und Glucagon 5

1.3.1 Kontrolle der Genexpression durch Insulin über Phosphatidylinositol-3-Kinase und Proteinkinase B 5

1.3.2 Kontrolle der Genexpression durch Insulin über die MAP-Kinase-Kaskade 7

1.3.3 Kontrolle der Genexpression durch Glucagon über die Aktivierung der Adenylatzyklase und der Phospholipase C 10

1.4 Aufgabenstellung 13

2. MATERIAL 14

2.1 Tiere und Tierhaltung 14

2.2 Bakterien, Vektoren und Plasmidkonstrukte 14

2.2.1 Bakterien 14

2.2.2 Vektoren 14

2.2.3 Plasmidkonstrukte 16

2.3 Digoxigenin-markierte RNA-Sonden 17

2.4 Antikörper 18

2.5 Enzyme 18

2.6 Hemmstoffe 20

2.7 Nachweis-, Reinigungs- und Synthesesysteme ("Kits") 21

2.8 Stammlösungen 21

2.9 Chemikalien 23

2.10 Sonstige Materialien 24

2.11 Geräte 25

3. METHODEN 28

3.1 Zellbiologische Methoden 28

3.1.1 Isolierung der Rattenhepatozyten 28

Perfusion der Leber 28

Herstellung der Hepatozytensuspension 28

3.1.2 Primärkultur von Rattenhepatozyten 31

3.1.3 Ernte, Proteingewinnung und Zellaufschluss von primär kultivierten Hepatozyten 32

3.2 Molekularbiologische Methoden 32

3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen für die Elektro-Transformation 32

3.2.2 Elektro-Transformation 33

3.2.3 Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA (Maxipräparation) 34

Maxipräparation 35

Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA 36

3.2.4 Transfektion von Hepatozyten mit der Calcium-Phospat-Technik 38

3.2.5 Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden 39

3.2.6 RNA-Isolierung aus primär kultivierten Rattenhepatozyten 39

3.2.7 Quantifizierung von mRNA durch Northern-Blot-Analyse 41

Denaturierung der RNA 42

Elektrophoresebedingungen 42

Visualisierung der RNA mit Ethidiumbromid 43

Transfer der RNA auf Nylonmembran 43

Hybridisierung der RNA mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden 44

Detektion und Quantifizierung 45

3.3 Biochemische Methoden 46

3.3.1 Proteinbestimmung 46

3.3.2 Western-Blot-Analyse 47

Vorbereitung der Proteine für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 47

Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen 47

Blotten der Proteine auf Nitrocellulose (NC) 49

Inkubation des "Blots" mit Antikörpern 51

Nachweis der gebundenen Antikörper durch die Peroxidase-Reaktion 52

3.3.3 Luciferase-Nachweis 52

3.4 Sicherheitsmaßnahmen 53

4. ERGEBNISSE 54

4.1 Modulation der PAI-1-Genexpression durch Insulin und pO_2 in primären Rattenhepatozyten 54

4.1.1 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Insulin unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten 54

4.1.2 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Insulin unter venösem pO_2 (8% O_2) in primären Rattenhepatozyten 54

4.1.3 Induktion des PAI-1-Proteins durch Insulin in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 55

4.2 Modulation der PAI-1-Genexpression durch Glucagon und pO_2 in primären Rattenhepatozyten 56

4.2.1 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Glucagon unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten 56

4.2.2 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Glucagon unter venösem pO_2 (8% O_2) in primären Rattenhepatozyten 57

4.2.3 Induktion des PAI-1-Proteins durch Glucagon in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 58

4.3 Modulation der PAI-1-Genexpression durch Insulin und Glucagon in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten 59

4.3.1 Modulation der PAI-1-mRNA-Expression durch Insulin und Glucagon in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten 59

4.3.2 Modulation der PAI-1-Proteinexpression durch Insulin und Glucagon in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten 60

4.4 Modulation der PAI-1-Genexpression durch cAMP und pO_2 in primären Rattenhepatozyten 62

4.4.1 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch cAMP unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten 62

4.4.2 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch cAMP unter venösem pO_2 (8% O_2) in primären Rattenhepatozyten 62

4.4.3 Modulation der PAI-1-Proteinexpression durch cAMP unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 in primären Rattenhepatozyten 63

4.5 Modulation der Insulin-, Glucagon- und cAMP-induzierten PAI-1-Genexpression durch Wortmannin, H7 und Rp-cAMPS in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 64

4.5.1 Modulation der Insulin-induzierten PAI-1-Genexpression durch Wortmannin in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 64

4.5.2 Modulation der Glucagon-abhängigen PAI-1-mRNA-Expression durch H7 und Rp-cAMPS in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 67

4.5.3 Modulation der durch cAMP induzierten PAI-1-mRNA-Expression durch Rp-cAMPS in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 69

4.6 Modulation der Luciferase-Aktivität durch Insulin und Glucagon in mit PAI-1-Promotor-Genkonstrukten transfizierten primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 71

4.6.1 Modulation der Luciferase-Aktivität durch Insulin in mit PAI-1-Promotor-Genkonstrukten transfizierten primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 71

4.6.2 Modulation der Luciferase-Aktivität durch Glucagon in mit PAI-1-Promotor-Genkonstrukten transfizierten primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 73

5. DISKUSSION 75

5.1 Die Insulin-abhängige Induktion der Ratten-PAI-1-Genexpression wird über den Phosphatidylinositol-3-Kinase- und Proteinkinase-B-Signalweg vermittelt 75

5.1.1 Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 75

5.1.2 Induktionswege des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors 1 77

5.1.3 Die Rolle des PI3K/PKB-Signalwegs in der Aktivierung der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Genexpression 81

5.1.4 Insulin- und HIF-abhängige PAI-1-Genexpression unter physiologischen und pathophysiologischen Gesichtspunkten 82

5.2 Die Glucagon-abhängige Induktion der Ratten-PAI-1-Genexpression wird über den zweiten Boten zyklisches Adenosin-3´,5´-monophosphat (cAMP) vermittelt 83

5.2.1 Zellspezifische Regulation der PAI-1-Genexpression durch cAMP 83

5.2.2 Alternative Signaltransduktionswege des second messengers cAMP 85

5.2.3 Alternative Aktivierungswege der Proteinkinase B 89

5.2.4 An der Glucagon-abhängigen Induktion der PAI-1-Expression kann die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 über den PKB- und/oder MAP-Kinase-Weg beteiligt sein 91

5.3 Schlussfolgerung 93

6. ZUSAMMENFASSUNG 94

7. LITERATURVERZEICHNIS 96

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Fibrinolyse	2
Abb. 2	Modell der Proteinkinase-B-Aktivierung	7
Abb. 3	Modell der Insulinsignalübertragung über den Grb2/sos-Komplex und die MAP-Kinase-Kaskade	9
Abb. 4	Modell der Signalweiterleitung über den Glucagonrezeptor	13
Abb. 5	Aufbau des pGL3-basic-Vektors	15
Abb. 6	Aufbau des Bluescript-Vektors (pSK)	15
Abb. 7	Luciferase-Gen-Konstrukte mit Bereichen des Ratten-PAI-1-Promotors	17
Abb. 8	Prinzip des Northern Blots	41
Abb. 9	Aufbau eines Vakuum Northern Blots	44
Abb. 10	Schematischer Aufbau eines Western Blots	50
Abb. 11	Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Insulin in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2	55
Abb. 12	Induktion der PAI-1-Proteinexpression durch Insulin in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2	56
Abb. 13	Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Glucagon in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2	57
Abb. 14	Induktion der PAI-1-Proteinexpression durch Glucagon in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2	58
Abb. 15	Induktion der PAI-1-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Insulin- und Glucagonkonzentration unter arteriellem (16% O_2) pO_2 in primären Rattenhepatozyten	60
Abb. 16	Induktion der PAI-1-Proteinexpression in Abhängigkeit von der Insulin- und Glucagonkonzentration unter arteriellem (16% O_2) pO_2 in primären Rattenhepatozyten	61
Abb. 17	Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch cAMP in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2	63
Abb. 18	Induktion der PAI-1-Proteinexpression durch cAMP in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2	64
Abb. 19	Versuchsaufbau zur Untersuchung der Hemmwirkung durch Wortmannin, H7 und Rp-cAMPS	65
Abb. 20	Hemmung der Insulin-abhängigen PAI-1-Genexpression durch Wortmannin in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2	66

Abb. 21 Hemmung der Glucagon-abhängigen PAI-1-Genexpression durch H7 und Rp-cAMPS in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 68

Abb. 22 Hemmung der cAMP-abhängigen PAI-1-Genexpression durch Rp-cAMPS in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 70

Abb. 23 Modulation der Insulin-abhängigen Induktion der Luc-Aktivität in mit PAI-1-Promotor-Luciferase-Genkonstrukten transfizierten Hepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 72

Abb. 24 Modulation der Glucagon-abhängigen Induktion der Luc-Aktivität in mit PAI-1-Promotor-Luciferase-Genkonstrukten transfizierten Hepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 74

Abb. 25 Struktur und die Sauerstoff-abhängige Regulation von HIF-1α 78

Abb. 26 Modell der Regulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 79

Abb. 27 Die cAMP-responsive Region in der PAI-1-mRNA 85

Abb. 28 Struktur von Epac I und II 88

Abb. 29 Modell der PI3K/PKB- und MAP-Kinase-Kaskade-Aktivierung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und cAMP 91

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Kongruenz zwischen Ratten-PAI-1-Promotorelementen und Consensussequenzen von Transkriptionsfaktoren sowie den entsprechenden Promotorelementen des humanen PAI-1-Promotors	4
Tab. 2	Beeinflussung der Genexpression durch Insulin	5
Tab. 3	Insulin-responsive Elemente (IRE)	10
Tab. 4	bHLH-PAS-Proteine	76

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

βFGF	basic fibroblast growth factor
4E-BP	4E-bindendes Protein
AC	Adenylatzyklase
ACT	β-Actin
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AhR	aryl hydrocarbon receptor
Ang II	Angiotensin II
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivator Protein-1
Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	aryl hydrocarbon receptor (AhR) nuclear translocator
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ATIII	Antithrombin III
ATF-1	activating transcription factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basische Helix-Loop-Helix-Struktur
BMAL	brain and muscle ARNT-like
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaM-K-Kinase	Ca^{2+}- und Calmodulin-abhängige Proteinkinase Kinase
cAMP	zyklisches Adenosin-3´,5´-monophosphat
CBP	CREB-bindendes Protein
cDNA	kopierte (copy) Desoxyribonukleinsäure
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	cAMP-responsive-element-binding protein
CREM	cAMP-responsive-element-binding modulator

CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2-(5´-chloro)-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)-phenylphosphat
C-TAD	carboxyterminale Transaktivierungsdomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEP-Domäne	Dishevelled, Egl-10, Plecstrin-Domäne
DIG	Digoxigenin
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendinitrilo-N, N, N´, N´-Tetra-Acetat
EGF	epidermal growth factor
Egr-1	early growth response protein 1
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N, N´-Tetra-Acetat
eIF-4E	eukaryotischer Translations-Initiations-Faktor 4E
Epac	Exchange protein activated by cAMP
EPAS	endothelial PAS domain protein
EPO	Erythropoetin
Erk 1/2	extracellular-ligand-regulated kinase 1/2
F-1,6-BP	Fructose-1,6-Bisphosphatase
FAS	Fettsäure-Synthase
Fe II	Eisen2+
FGF-2	fibroblast growth factor-2
FIH-1	factor inhibiting HIF-1
FK-TF	Forkhead-Transkriptionsfaktor
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Erdbeschleunigung
Gαs, -β, -γ	G-Proteine
G-6-Pase	Glucose-6-Phosphatase

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GcgR	Glucagonrezeptor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
Ggn	Glucagon
GK	Glucokinase
GLP-1, -2	glucagon-like peptide 1, 2
Grb2	Growth-factor-receptor-binding protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HC	Hepatozyten
Hepes	2-(-4-2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl-1-Ethansulfonat
HIF-1, -1α, -1β	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1, -1α, -1β
His	Histidin
HLF	HIF-1α-like factor
HPH-1, -2, -3	HIF-Prolylhydroxylasen-1, -2, -3
HRE	Hypoxie-responsives Element
HRF	HIF-1α-related factor
IBMX	Isobutylmethylxanthin
ICER	inducible cAMP early repressor
ID	transkriptionsinhibierende Domäne
IGF-1, -2	insulin-like growth factor -1, -2
IGF-BP1	insulin-like-growth-factor-Bindungsprotein 1
IL-1β	Interleukin-1β
Ins	Insulin
Ins(1,4,5)P3; IP3	Inositol-(1,4,5)-triphosphat
IRE	Insulin-responsives Element
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton

LB	Laura Bertani
LH	luteotropes Hormon
LUC	Luciferase
MAP	mitogen-activated protein
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MOP	member of the PAS domain protein
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
NB	Northern Blot
NC	Nitrocellulose
NCS	neugeborenen Kälberserum (new born calf serum)
NFκB	nuclear factorκB
NLS-C	carboxyterminal nuclear localisation signal
NLS-N	aminoterminal nuclear localisation signal
NPAS	neuronal PAS domain protein
OD	Optische Dichte
ODDD	oxygen-dependent degradation domain
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PAI-1-CRS	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-cAMP-responsive Sequenz
PAI-RBP1	PAI-RNA-bindendes Protein 1
PAS	(PER) periodic-(ARNT) aryl hydrocarbon receptor (AhR) nuclear translocator-(SIM) single minded
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PC 3	Prohormonconvertase 3
PCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PDGF	platelet-derived growth factor
PDK	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase
PH	Pleckstrin-Homologie-Domäne

PHD-1, -2, -3	Prolylhydroxylase-1, -2, -3
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PK	Pyruvatkinase
PKA/B/C	Proteinkinase A/B/C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
Pro	Prolin
PTEN	deletiertes Phosphatase-Tensin-Homolog von Chromosom 10 mit einer Phosphoinositid-Lipid-3-Phosphatase-Aktivität
pVHL	von-Hippel-Lindau-Tumorsupressor-Protein
Reg	regulatorische Domäne
REM	Ras exchange motif
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RSKB	ribosomale S6 Kinase B
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH2	src homology 2
SH3	src homology 3
Shc	SH2 domain-containing α2 collagen-related proteins
SIM	single minded
sos	son of sevenless
Sp1	stimulatory protein 1
SRE	Serum-responsives Element
SREBP	Sterol-regulatorisches-Element-bindendes Protein
ss	Einzelstrang (single strand)

Stlsg.	Stammlösung
TAD-N, -C	amino- und carboxyterminale Transaktivierungsdomäne
TAT	Tyrosinaminotransferase
TAZ-Domäne	transcriptional adapter zinc binding 1 domain
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TF II D	Transkriptionsfaktor II D
TGF-β	transforming growth factor β
Thr	Threonin
TMD	Transmembrandomänen
TNF-α	Tumornekrose-Faktor-α
t-PA	tissue-type plasminogen activator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
TTF-2	Thyroid-Transkriptionfaktor-2
Tyr	Tyrosin
Ub	Ubiquitin
u-PA	Urokinase, urokinase-type plasminogen activator
USF	upstream stimulatory factor
UV	Ultraviolett
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
Vol.	Volumenanteile

1. EINLEITUNG

1.1 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 als Regulator der Fibrinolyse

Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa (Kruithof 1988), das aus 379 Aminosäuren besteht und zu den Serinproteaseinhibitoren (Serpine) gehört (Kruithof et al. 1986 b). PAI-1 kann von vielen Gewebszelltypen wie z.B. denen aus Pankreas und Milz (Friess et al. 1998), Leber (Simpson et al. 1991), Niere (Yamamoto und Loskutoff 1997), Gehirn (Dietzmann et al. 2000), Fettgewebe (Samad et al. 1996), Synovialmembranen (Busso et al. 1997), Blutzellen (Simpson et al. 1991), vaskulären Endothelzellen (Erickson et al. 1985) und glatten Muskelzellen der Gefäßwand (Reilly und McFall 1991) exprimiert werden. Neben diesen Zelltypen wird PAI-1 auch von primär kultivierten Rattenhepatozyten gebildet (Heaton et al. 1989; Busso et al. 1994).

Serinproteaseinhibitoren sind an vielen wichtigen biologischen Prozessen, wie Blutgerinnung, Fibrinolyse oder Umbauprozessen der Extrazellularmatrix regulatorisch beteiligt. Neben PAI-1 sind z.B. das α1-Antitrypsin oder das Antithrombin III (ATIII) weitere wichtige Vertreter der Serinproteinaseinhibitoren. Eine besondere Rolle spielt PAI-1 bei der Regulation der endogenen Fibrinolyse.

Die Hauptaktivatoren der Fibrinolyse im Plasma sind t-PA (tissue-type plasminogen activator) und u-PA (Urokinase, urokinase-type plasminogen activator). Die inaktive Protease Plasminogen wird durch die u-PA- oder t-PA-vermittelte Bindung an Fibrin zu der Breitspektrumserinprotease Plasmin aktiviert (Hoylaerts et al. 1982; Lijnen und Collen 1988) und ist für den Abbau von Fibrinthromben verantwortlich. Der wichtigste Inhibitor der Fibrinolyse ist der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1, der die Aktivität der Plasminogenaktivatoren, sowohl t-PA als auch u-PA hemmt (Kruithof et al. 1986 a; Sprengers und Kluft 1987), indem es mit t-PA und u-PA stabile Komplexe mit einer Relation von 1:1 bildet (Lindahl et al. 1990).

PAI-1 wird als aktive Form, mit einer Halbwertszeit von 30 min (Kooistra et al. 1986), sezerniert und zirkuliert anschließend in einer latenten Form weiter. Das extrazelluläre Matrixprotein Vitronectin wurde als das Protein identifiziert, das durch Bindung an PAI-1 die aktive Form des Inhibitors stabilisiert (Declerck et al. 1988) (Abb. 1).

PAI-1 ist in der Lage an Fibrin, wenn es in hoch polymerisierter Form vorliegt, zu binden und behält dabei seine inhibitorische Aktivität gegenüber u-PA und t-PA (Wagner et al. 1989; Thorsen 1992). Dadurch schafft PAI-1 eine Stabilisierung der, durch Fibrinpolymerisation gebildeten, hoch organisierten Thromben.

Ein weiterer Inhibitor der Fibrinolyse ist das α2-Antiplasmin, das ein spezifischer Inhibitor von Plasmin ist und kovalent an das polymerisierte Fibrin bindet, was durch den aktivierten Gerinnungsfaktor XIII vermittelt wird (Ichinose et al. 1983).

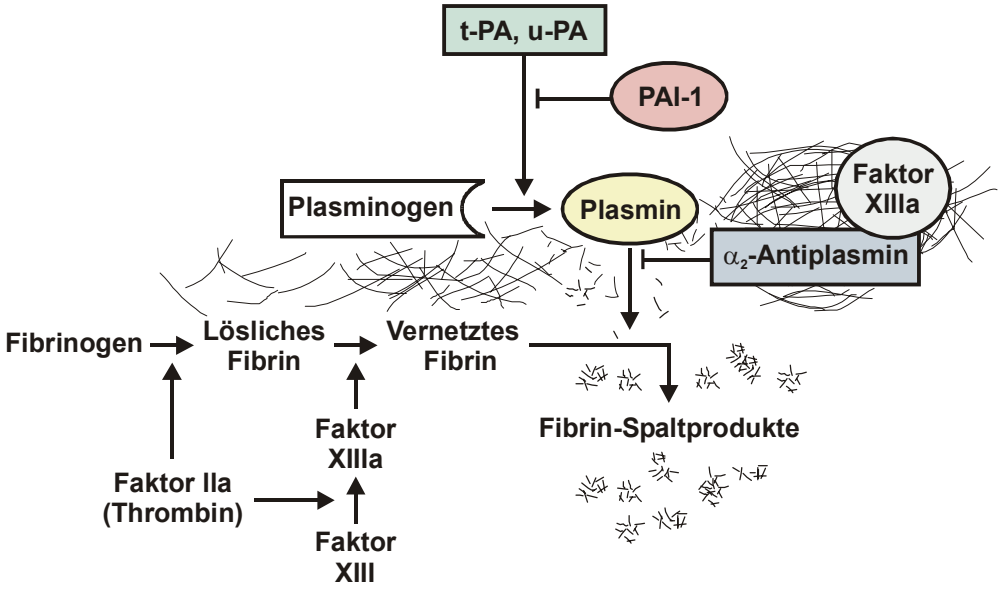

Abb. 1: **Fibrinolyse.** Die Hauptreaktionen des Gerinnungssystems sind in das endogene (intravaskuläre) und exogene (extravaskuläre) System gegliedert (nicht dargestellt). Beide Gerinnungkaskaden führen zu Bildung des Prothrombin-Komplexes (Prothrombinase), Fibrinmonomerbildung aus Fibrinogen, Bildung löslicher Fibrinkomplexe und schließlich der durch den Faktor XIIIa vermittelten Polymerisation zu vernetztem Fibrin. Das fibrinolytische System wird durch u-PA, t-PA und Plasminogen aktiviert. Plasminogen, t-PA oder u-PA und Fibrin bilden den ternären Komplex, was durch Plasmin zum Abbau von Fibrin zu Fibrinspaltprodukten (auch D-Dimäre genannt) führt. PAI-1 bindet ebenfalls an Fibrin, besonders wenn dieses in hochpolymerisierter Form vorliegt und behält dabei seine inhibitorische Aktivität gegenüber t-PA. α2-Antiplasmin kann die Plasminaktivität ebenfalls durch, über den Faktor XIIIa vermittelte, Bindung an Fibrin hemmen.

1.2 Modulation der PAI-1-Genexpression

Hohe Konzentrationen von PAI-1 sind mit thromboembolischen Erkrankungen wie der tiefen Beinvenenthrombose (Wiman et al. 1985), kardiovaskulären Erkrankungen (Schneiderman et al. 1992; Margaglione et al. 1994; Thogersen et al. 1998; Kohler und Grant 2000) oder dem akuten cerebralen ischämischen Infarkt (Lindgren et al. 1996; Johansson et al. 2000) assoziiert. In klinischen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass Hyperinsulinämie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II (Sobel et al. 1998), insbesondere bei Adipositas und arterieller Hypertonie, zu erhöhten PAI-1-Konzentrationen im Blut führte (Landin et al. 1990; Juhan-Vague und Alessi 1997; Carmassi et al. 1999; Mirza et al. 2000). Insulin induzierte die PAI-1-Expression *in vitro* in zahlreichen unterschiedlichen Zelltypen wie primär kultivierten humanen Hepatozyten (Kooistra et al. 1989; Grenett et al. 1999), der humanen Hepatomzelllinie HepG2 (Alessi

MC et al. 1988; Anfosso et al. 1993) oder arteriellen Endothel- und glatten Muskelzellen der Gefäße (Schneider et al. 1992; Schneider et al. 1997).

Die Induktion der PAI-1-Expression konnte neben Insulin auch durch weitere Faktoren wie PDGF (platelet-derived growth factor) und βFGF (basic fibroblast growth factor) (Lau 1999), TGF-β (transforming growth factor) (Sato Y et al. 1990), Angiotensin-II (Oikawa et al. 1997; Brown et al. 2000), TNF-α (Tumornekrose-Faktor-α) (Samad et al. 1996), Thrombin (Cockell et al. 1995) und Oxidationsprodukten (Dichtl et al. 1999) festgestellt werden. Eine bedeutende Steigerung der PAI-1-Expression konnte in Rattengeweben nach Injektion von Endotoxin (Escherichia coli Lipopolysaccharid), insbesondere im Leber- und Lungengewebe, nachgewiesen werden (Quax et al. 1990). Ferner wurden bei Patienten mit Sepsis, nach chirurgischen Eingriffen (Aoki et al. 1994), Trauma oder extrakorporaler Zirkulation (Kruithof et al. 1988) erhöhte PAI-1-Konzentrationen im Blut festgestellt, was zu der Annahme führt, dass PAI-1 auch eine Rolle als Akutphaseprotein spielen könnte. In HepG2 Zellen konnte durch Interleukin-1, einen Mediator der Akutphaseantwort, eine 40-fache PAI-1-mRNA-Induktion nachgewiesen werden (Healy und Gelehrter 1994).

Eine Hemmung der Thrombin- und Endotoxin-induzierten PAI-1-Expression konnte in humanen Endothelzellen durch Interferon-γ beobachtet werden (Gallicchio et al. 1996). Ebenso wurde durch cAMP eine Hemmung der PAI-1-Expression in Rattenhepatomzellen festgestellt (Heaton und Gelehrter 1990; Heaton et al. 1992).

1.2.1 Die 5´-regulatorische Region des PAI-1-Gens

Das PAI-1-Gen der Ratte (10,5 kb) besteht aus neun Exons und acht Introns (Bruzdzinski et al. 1990). Vergleiche der Gen-Struktur mit der des humanen PAI-1-Gens ergaben eine genaue Übereinstimmung der Intron-Exon-Struktur der Gene (Bosma et al. 1988). Zwei Regionen innerhalb des Ratten-PAI-1-Promotors sind ebenfalls nahezu kongruent (Bosma et al. 1988); die Region von -90 bp bis zur TATA-Box weist eine 90%ige, die Region von -755 bis -512 bp eine mehr als 80%ige Übereinstimmung mit der Sequenz des humanen PAI-1-Promotors auf (Bruzdzinski et al. 1990).

Die Funktion der 5´-regulatorischen Region wurde u.a. durch Transfektionen von PAI-1-Reporterenzym-Genen in Hepatomzellen untersucht. Durch Footprintanalysen konnten mögliche Bindungsproteine, die an der PAI-1-Genregulation beteiligt sind, identifiziert werden. Es wurden acht Regionen innerhalb der ersten 764 bp im Bereich der 5´-regulatorischen Region gefunden, mit denen Zellkernproteine von Ratten HTC Hepatomzellen interagieren können (Tab. 1) (Johnson et al. 1992).

Tab. 1: **Kongruenz zwischen Ratten-PAI-1-Promotorelementen und Consensussequenzen von Transkriptionsfaktoren sowie den entsprechenden Promotorelementen des humanen PAI-1-Promotors** (modifiziert nach Johnson et al. 1992)

Promotor-element	TF	Sequenz / Consensussequenz	Mensch
A-1	**PEA3**	-56 TCATCTATTTCCGGCCCACA -37 * * ACATCCTC T G	95%
A-2	**Sp-1**	-86 TTAGAAGGTGGGTGGGGCTGGAAC -63 * GAGGCTGAAT TG G GGC	79%
B	**Sp-1** **CTF/NF-1**	TG G GGC GAGGCTGAAT * ** -119 CAGGGCGGGCGAGCA -105 * TGGCNNNNNGCCAA A	33%
C	**?**	-171 TACACACACGTGT -159	79%
D	**?**	-210 AGGATTTGCTCAATTATCC -192	79%
E	**Sp-1** **CTF/NF-1**	TG G GGC GAGGCTGAAT * * -477 TGGCACTGGGCAGAAACCCAAGAGAAAGCCAAG -445 * * TGGCNNNNNGCCAA A	62%
F	**CTF/NF-1**	-542 TCTATTGGGCTTAAGTCCAAGAGG -519 * * TGGCNNNNNGCCAA A	75%
G	**?**	-666 GGTTATTGACACAAAGAGC -648	90%

Referenzen Consensussequenz: PEA3 (Gutman und Wasylyk 1990), Sp-1 (Dynan und Tjian 1983; Kadonaga et al. 1987; Jackson und Tjian 1988), CTF/NF-1 (Gutman und Wasylyk 1990). (*): keine Übereinstimmung zwischen den Basenpaaren; TF: Transkriptionsfaktor

Eine positive sowie negative Wirkung auf die PAI-1-Genexpression konnte bereits für viele Substanzen gezeigt werden. Welche PAI-1-Promotorelemente an dieser Regulation beteiligt sind, wurde bereits in unterschiedlichen Zellreihen untersucht. An dieser Stelle seien einige der bisher bekannten Modelle zur Regulation der PAI-1-Genexpression genannt.

Glucose regulierte die PAI-1-Genexpression über zwei angrenzende Sp-1-Elemente zwischen -85/-42 bp im Bereich der 5´-flankierenden Region des humanen PAI-1-Promotors in mit Luciferase-Genkonstrukten transfizierten vaskulären glatten Muskelzellen (Chen YQ et al. 1998). Die zwei Sp-1-Elemente (-72/-67 bp und -45/-40 bp)

vermittelten ebenfalls die Induktion der PAI-1-Genexpresson durch Angiotensin II in Rattenmesangiumzellen (Motojima et al. 2000). Eine Induktion der c-Fos/JunD-Heterodimerbildung war nach Stimulation von primär kultivierten Rattenlungenfibroblasten mit Fibrinogen-Spaltprodukten (D-Dimere) zu beobachten. Dies führte über ein AP-1-Element -59/-52 bp zur Induktion der PAI-1-Genexpression (Olman et al. 1999). In der humanen Hepatomzellreihe HepG2 wurde die PAI-1-Induktion über die Proteinkinase-C-Aktivierung durch PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) ebenfalls über das AP-1-Element vermittelt (Arts et al. 1999). In epithelialen Nierenzellen wurde gezeigt, dass USF-1 (upstream stimulatory factor 1) durch die Bindung an eine sogenannte E-Box -165/-160 bp die basale PAI-1-Expression erhöht (White LA et al. 2000). Ferner wurden zwei Hypoxie-responsive Elemente -175/-158 bp beschrieben, die für die Hypoxie-induzierte Expression des PAI-1-Gens verantwortlich sind (Kietzmann et al. 1999).

1.3 Kontrolle der Genexpression durch Insulin und Glucagon

1.3.1 Kontrolle der Genexpression durch Insulin über Phosphatidylinositol-3-Kinase und Proteinkinase B

Neben PAI-1, dessen Expression durch Insulin gesteigert wurde, sind mittlerweile weitere Gene identifiziert worden, deren Expression durch Insulin positiv reguliert wird; es sind aber auch Gene beschrieben worden, bei deren Expression Insulin eine negative Wirkung entfaltet (Tab. 2).

Tab. 2: **Beeinflussung der Genexpression durch Insulin**

Insulin	Zielgene
-induzierte Genexpression	Glucokinase (GK)[1]
	Sterol-regulatorisches-Element-bindendes Protein (SREBP)[2]
	Fettsäure-Synthase (FAS)[3]
	Pyruvatkinase (PK) (indirekt)[4]
	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1)[5]
-supprimierte Genexpression	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 1 (PCK-1)[6]
	Glucose-6-Phosphatase (G-6-Pase)[7]
	Fructose-1,6-Bisphosphatase (F-1,6-BP)[8]
	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-bindendes Protein (IGF-BP1)[9]

(1) Iynedjian et al. 1989; (2) Kim JB et al. 1998; (3) Wang D und Sul 1997; (4) Assimacopoulos-Jeannet und Jeanrenau 1990; (5) Kooistra et al. 1989; (6) Liao et al. 1998; (7) Lange et al. 1994; (8) el-Maghrabi et al. 1988; (9) Cichy et al. 1998.

Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor resultiert in der Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten der intrazellulären β-Ketten und der Tyrosinphosphorylierung von Insulin-Rezeptor-Substraten (IRS) durch die Insulin-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Aktivität der β-Ketten (Abb. 2) (Myers und White 1996; O´Brien und Granner 1996). Anschließend aktivieren die Phosphotyrosin-Reste der IRS durch die Bindung an die regulatorische Untereinheit p85 die PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) (Kazlauskas 1994; Pawson 1995). Dieser Prozess führt die PI3K-katalytische Untereinheit p110 zur Plasmamembran, wo sie das Hauptsubstrat Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($PI(4,5)P_2$) zu $PI(3,4,5)P_3$ sowie PI(4)P zu $PI(3,4)P_2$ phosphoryliert (Reif et al. 1996).

Der Abbau von $PI(3,4,5)P_3$ bzw. $PI(3,4)P_2$ erfolgt über die Dephosphorylierung durch den Tumorsuppressor PTEN (deletiertes Phosphatase- und Tensin-Homolog von Chromosom 10), einer Phosphoinositid-Lipid-3-Phosphatase (Stambolic et al. 1998; Cantley und Neel 1999) (Abb. 2). $PI(3,4,5)P_3$ sowie $PI(3,4)P_2$ binden mit hoher Affinität an die Pleckstrin-(PH)-Domäne der PKB und binden somit die Kinase an die Plasmamembran. An der Plasmamembran wird PKB am Threonin (Thr)308 und am Serin (Ser)473 phosphoryliert (Alessi DR und Cohen 1998; Bellacosa et al. 1998) und somit aktiviert. Bei der Kinase, die die Phosphorylierung am (Thr)308 vermittelt, handelt es sich um eine ubiquitär exprimierte Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) (Alessi DR et al. 1997; Stephens et al. 1998). Die Phosphorylierung von (Ser)473 ist unabhängig von PDK1 und scheint durch eine Kinase vermittelt zu werden, die im Gegensatz zu PDK1 von dem Kinase-Inhibitor Staurosporin unbeeinflusst bleibt (Hill et al. 2001).

PKB weist eine starke Identität mit den Proteinkinasen der PKA- und PKC-Familien auf und gehört zu den Serin/Threonin-Kinasen. Ebenso zeigt sie eine starke Verwandtschaft zu dem retroviralen Onkogen v-akt und wird deshalb auch Akt genannt (Burgering und Coffer 1995; Cross et al. 1995; Franke TF et al. 1995; Kohn et al. 1995).

Die drei vorkommenden Akt/PKB-Isoformen werden ubiquitär exprimiert, variieren jedoch in ihren Expressionswerten in den verschiedenen Geweben (Kandel und Hay 1999).

Jede Isoform enthält eine aminoterminale Pleckstrin-Homologie-(PH)-Domäne, eine Kinase-Domäne und eine carboxyterminale regulatorische Domäne (Abb. 2) (Coffer et al. 1998). Indirekt beeinflusst PKB den Glucose-Metabolismus (KH-Stoffwechsel) über die Regulation der Genexpression. Bisher ist bekannt, dass PKB die Expression der Glucose-Transporter GLUT1 und GLUT3 in den Rattenskelettmuskelzellen L6 und der Maus-Hepatom-Zelllinie Hepa1c1c7 (Hajduch et al. 1998; Barthel et al. 1999) sowie der GK in primären Rattenhepatozyten (Iynedjian et al. 2000) induziert.

Der PKB-Effekt auf die Gen-Expression verläuft über Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie Forkhead-Transkriptionsfaktoren und Elongationsfaktoren.

PKB beeinflusst so die NF-κB-abhängige Gentranskription durch Aktivierung der NF-κB-Inhibitor-(IκB)-Kinase (IKK) und Degradierung von IκB (Kane et al. 1999) und zum anderen die Proteinsynthese, indem PKB z.B. die Aktivität verschiedener Faktoren moduliert, die für die mRNA-Translation verantwortlich sind. So erfolgt die Induktion der mRNA-Translations-Initiation durch Phosphorylierung des 4E-bindenden Proteins (4E-BP) und Aktivierung des eukaryotischen Translations-Initiations-Faktors 4E (eIF-4E) (Proud und Denton 1997; Gingras et al. 1998).

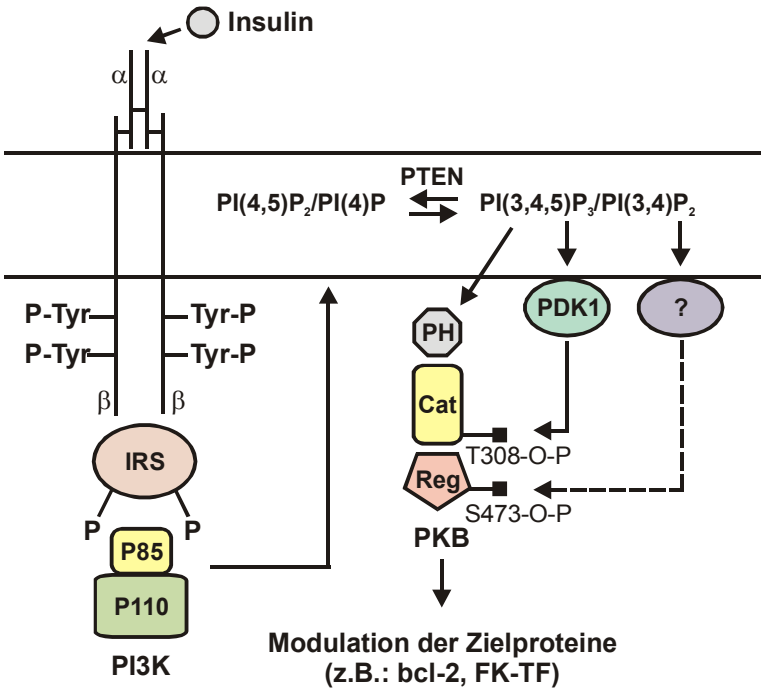

Abb. 2: **Modell der Proteinkinase-B-Aktivierung.** Erläuterung s. Text. Cat: katalytische Domäne; FK-TF: Forkhead-Transkriptionsfaktoren; IRS: Insulin-Rezeptor-Substrate; PDK: Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase; PH: Pleckstrin-Homologie-Domäne; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PI(4,5)P2/PI(3,4,5)P3: Phosphatidylinositol-bis/tris-Phosphat; PTEN: deletiertes Phosphatase-Tensin-Homolog von Chromosom 10 mit einer Phosphoinositid-Lipid-3-Phosphatase-Aktivität; PKB: Proteinkinase B; Reg: regulatorische Domäne; Tyr: Tyrosin.

1.3.2 Kontrolle der Genexpression durch Insulin über die MAP-Kinase-Kaskade

Neben der Aktivierung der PI3-Kinase über die Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS), die in erster Linie in den metabolischen Insulinweg mündet, gibt es auch einen Insulinsignalweg auf der Ebene der IRS-Proteine hin zum mitogenen Signalweg. Dieser wird nicht über die PI3-Kinase, sondern über die Signalproteine Grb2 (Growth-factor-receptor-binding protein 2), sos (son of sevenless) und G-Proteine (ras) hin zur MAP (mitogen-activated protein)-Kinase-Kaskade geleitet.

Wie bereits beschrieben führt die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor zur Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten der intrazellulären β-Ketten und der

Tyrosinphosphorylierung von Insulin-Rezeptor-Substraten (IRS) durch die Insulin-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Aktivität der β-Ketten (White MF et al. 1985; Sun et al. 1991; Keller et al. 1993). Zur Zeit sind neun dieser Substrate bekannt: IRS-1 (Rothenberg et al. 1991; Sun et al. 1992), IRS-2 (Sun et al. 1995), IRS-3 (Lavan et al. 1997 b) und IRS-4 (Lavan et al. 1997 a), die für die Signalübertragung über den Insulinrezeptor am spezifischsten sind. Des Weiteren Shc (SH2 domain-containing α2 collagen-related proteins), die in drei Isoformen vorkommen (Pelicci et al. 1992; Pronk et al. 1993); Gab-1 (Holgado-Madruga et al. 1996) und $p62^{doc}$ (Carpino et al. 1997). Für den mitogenen Insulinsignalweg sind die Substrate IRS-1 und Shc von besonderer Bedeutung.

IRS-1 besitzt eine Vielzahl von Tyrosin-Resten, die nach der Phosphorylierung als spezifische Erkennungsmotive für Adapterproteine mit SH2-Domänen (src homology 2) fungieren (Songyang et al. 1993). Neben der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3K besitzen auch die Adapterproteine Grb2, Crk (Beitner-Johnson et al. 1996) und Nck (Lee CH et al. 1993) diese SH2-Domänen (Sun et al. 1993). Im Gegensatz zu IRS-1 besitzen Shc-Proteine nur einen Tyrosin-Rest, der phosphoryliert werden kann (Tyr)317 und als Bindungsstelle für Grb2 fungiert (Rozakis-Adcock et al. 1992). Beim IRS-1 bindet Grb2 über seine SH2-Domäne an das (Tyr)895 (White MF und Kahn 1994). Somit kann Grb2 bei der Insulinsignalübertragung sowohl an die IRS als auch an die Shc binden (Skolnik et al. 1993; Myers et al. 1994) (Abb. 3).

Grb2 besitzt eine SH2-Domäne und 2 SH3-Domänen (src homology 3) (Lowenstein et al. 1992). Die SH-3 Domänen des Grb2 vermitteln die Bindung von Proteinen, die Prolinreiche-Motive besitzen. An die SH3-Domänen von Grb2 bindet Sos, benannt nach dem Drosophila-melanogaster-Gen son-of-sevenless, der den Guanosinnukleotid-austausch für das $p21^{ras}$ vermittelt (Simon et al. 1991; Bowtell et al. 1992; Martegani et al. 1992; Shou et al. 1992; Wei et al. 1992). Die Aktivierung von $p21^{ras}$ durch Sos wird über den Austausch von GDP gegen GTP vermittelt (Aronheim et al. 1994; Quilliam et al. 1994; Holsinger et al. 1995). Das aktivierte $p21^{ras}$ transloziert die Proteinkinase Raf an die Plasmamembran und aktiviert diese (Moodie et al. 1993; Van Aelst et al. 1993; Vojtek et al. 1993; Warne et al. 1993; Magnuson et al. 1994; McCormick 1994; Williams und Roberts 1994). Raf ist ein relativ spezifischer Aktivator von MAP-Kinase-Kinasen (Dent et al. 1992; Howe et al. 1992; Kyriakis et al. 1992; Zheng und Guan 1994). Die MAP-Kinase-Kinase (mitogen-activated protein kinase kinase), auch MEK genannt, wird direkt durch Raf phosphoryliert und dadurch aktiviert. MAP-Kinase-Kinase aktiviert seinerseits Erk-1 und Erk-2 (extracellular-ligand-regulated kinase), auch MAP-Kinasen gennannt. Die Aktivierung von Erk-1 und Erk-2 erfolgt durch Phosphorylierung ihrer Tyrosin- und Threonin-Reste durch die MAP-Kinase-Kinase (Abb. 3). Die MAP-Kinasen Erk-1 und -2 werden in den meisten Zellen gebildet und sind in der Lage, eine Vielzahl von Proteinen

zu phosphorylieren. Dadurch sind sie an der Regulation von Transkriptionsfaktoren, wie Elk-1 und c-Jun, der Regulation von zellulären Enzymen, wie der Phospholipase A_2, und anderer Proteinkinasen, wie p90rsk, beteiligt (Marais et al. 1995).

Diskutiert wird ebenfalls ein möglicher Feedback-Mechanismus, bei dem Erk die Aktivierung von Ras limitiert. Bei der Stimulation von Zellen durch unterschiedliche Faktoren, die die Ras/Raf/MEK/Erk-Kaskade aktivieren (Insulin, PDGF (platelet-derived growth factor), v-Ras und v-Raf), wurde die Posphorylierung von Sos an seinen Serin/Threonin-Resten beobachtet, was zur Abdissoziation des Grb2-Sos-Komplexes führte und somit die Signalübertragung limitierte (Cherniack et al. 1994; Cherniack et al. 1995; Waters et al. 1995). Des Weiteren wird auch ein Erk-unabhängiger Feedback-Mechanismus diskutiert, bei dem eine MEK-abhängige, jedoch Erk-unabhängige Kinase für die Phosphorylierung von Sos und Abdissoziation des Grb2-Sos-Komplexes verantwortlich ist (Holt et al. 1996; Zhao et al. 1998).

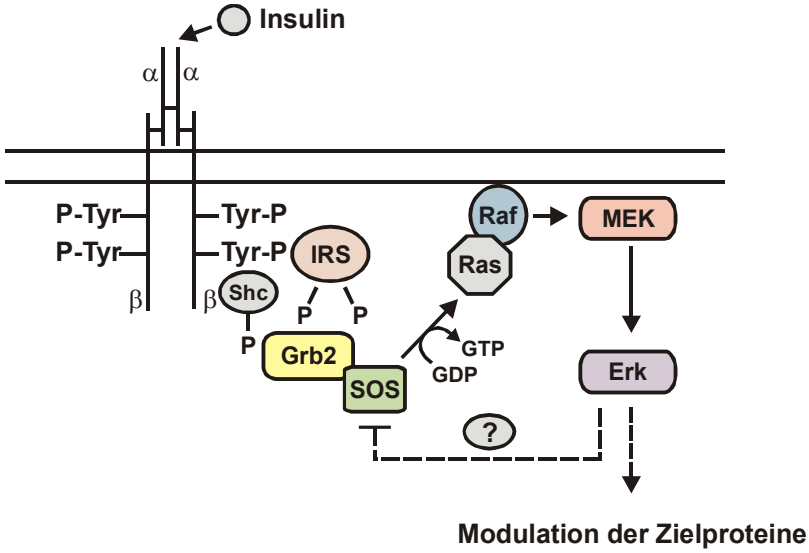

Abb. 3: **Modell der Insulinsignalübertragung über den Grb2/sos-Komplex und die MAP-Kinase-Kaskade.** Erläuterung s. Text. Erk: extracellular-ligand-regulated kinase; GDP: Guanosindiphosphat; Grb2: Growth-factor-receptor-binding protein 2; GTP: Guanosintriphosphat; IRS: Insulin-Rezeptor-Substrate; MEK: mitogen-activated protein kinase kinase; shc: SH2 domain-containing α2 collagen-related proteins; sos: son of sevenless; Tyr: Tyrosin

Die Kontrolle der Genaktivität durch Insulin erfolgt über unterschiedliche Insulin-responsive Elemente (Tab. 3). Eines dieser Insulin-responsiven Elemente ist AP-1 (Aktivator Protein 1) mit der Consensussequenz TGA(G/C)TCA. An diese Promotorsequenz bindet der AP-1-Transkriptionskomplex, der durch Vertreter der Transkriptionsfaktorfamilien Fos (c-Fos, Fra-1 (fos-related antigen-1), Fra-2, FosB) und Jun (c-Jun, JunB, JunD) gebildet wird (Angel und Karin 1991). Durch Insulin wird die AP-1-Aktivität erhöht, was z.B. die Insulin-induzierte Genexpression des Malatenzyms (Streeper et al. 1998) oder Collagenase-Gens erklärt (Rutter et al. 1995; Chapman et al.

1999). Die Aktivierung von AP-1 durch Insulin erfolgt über die MAP-Kinase-Kaskade, indem z.B. die c-Fos- und c-Jun-mRNA-Expression induziert wird (O´Brien und Granner 1996). Die Insulin-induzierte Fra-1-mRNA-Expression erfolgt ebenfalls über Erk, ebenso wie die Aktivierung des Fra-1-Proteins durch seine Phosphorylierung durch Erk (Hurd et al. 2002).

Tab. 3: **Insulin-responsive Elemente (IRE)**

IRE	Gene	Consensussequenz	Effekt
GAPDH IRE-A-like Motiv	GAPDH; Apo A-I	CCCGCCTC	Positiv
SRE	c-Fos; β-Actin	CC(A/T)6 GG	Positiv
AP-1 Motiv	Collagenase-1; Malatenzym	TGA(G/C)TCA	Positiv
Ets Motiv	Prolactin; Somatostatin	(C/A)GGA(A/T)	Positiv
E-box Motiv	Pyruvatkinase; Fettsäuresynthase	CANNTG	Positiv
SREBP Motiv	Glucokinase ?	ATCACCCCAC	Positiv
TTF-2 Motiv	Thyreoglobulin; Thyreoperoxidase	C(T/A)(A/G)A(A/G)(C/A)AAACA	Positiv
PCK-like Motiv	PCK; IGF-BP1; TAT; G-6-Pase; Apo CIII	T(G/A)TTT(T/G)(G/T)	Negativ

Apo: Apolipoprotein; AP-1: Activator Protein 1; G-6-Pase: Glucose-6-Phosphatase; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; IGF-BP1: insulin-like-growth-factor-Bindungsprotein 1; PCK: Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; SREBP: Sterol-regulatorisches-Element-bindendes Protein; SRE: Serum-responsives Element; TAT: Tyrosinaminotransferase; TTF-2: Thyroid-Transkriptionsfaktor 2; ?: das SREBP-Element der Glucokinase ist noch nicht genau lokalisiert (O'Brien et al. 2001)

1.3.3 Kontrolle der Genexpression durch Glucagon über die Aktivierung der Adenylatzyklase und der Phospholipase C

Glucagon ist ein Peptidhormon mit 29 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 3485 Da. Es ist das proteolytische Spaltprodukt des Proglucagons, das außer in den α-Zellen der Langerhans´schen Inseln des Pankreas auch durch andere Gewebszellen exprimiert werden kann (z.B. ZNS, intestinale Mucosa). Aus Proglucagon werden durch gewebsspezifische proteolytische Prozessierung unterschiedliche Peptidhormone, u.a. das Glucagon, gebildet. In den enteroendokrinen Zellen des Darms wird aus Proglucagon z.B. durch die Prohormonconvertase 3 (PC 3) das GLP-1 und 2 (glucagon-like peptide 1 und 2) (Rouille et al. 1997 b). In den α-Zellen des Pankreas ist die Prohormonconvertase 2 für die Glucagonentstehung aus Proglucagon verantwortlich (Rouille et al. 1994; Rouille et al. 1997 a; Furuta et al. 2001). Glucagon spielt eine Schlüsselrolle im Kohlenhydratstoffwechsel und ist dabei der Hauptantagonist der Insulin-induzierten

Vorgänge. Die wichtigste physiologische Funktion von Glucagon ist die Induktion der Gluconeogenese und Glycogenolyse der Leber (Ikeda T et al. 1989), was zum Anstieg der Glucosekonzentration führt (Young et al. 1993; Hvidberg et al. 1994). Die Glucagonwirkung wird über einen Glucagonrezeptor vermittelt, der aufgrund seiner Struktur zur Gruppe der R7G- oder 7TMD-Rezeptoren gehört (Jelinek et al. 1993; Mayo et al. 2003). Er ist über sieben Transmembrandomänen (TMD) in die Plasmamembran integriert und weist einen N-terminalen, extrazellulären und C-terminalen, intrazellulären Bereich sowie jeweils 4 intra- und extrazelluläre Schleifen auf. Durch die Bindung von Glucagon an den N-Terminus und die transmembranären Domänen des GcgR (Unson et al. 1996) wird eine Konformationsänderung ausgelöst, durch die intrazellulär die Aktivierung von G-Proteinen verursacht wird. An der Signaltransduktion des Glucagonrezeptors sind zwei G-Proteine beteiligt: $G_s\alpha$, das zur Aktivierung der Adenylatzyklase, cAMP Bildung und Proteinkinase-A-Aktivierung führt und G_q, das die Phospholipase C aktiviert, was zur Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat und intrazellulärer Calziumkonzentrationserhöhung führt.

Für die Kopplung des G_s-Proteins an die intrazelluläre Region des GcgR scheinen Sequenzen aus der zweiten und dritten intrazellulären Schleife notwendig zu sein (Cypess et al. 1999). Das G_s-Protein besteht in seiner inaktiven Form als Heterotrimer aus drei Untereinheiten α, β und γ. Die $G_s\alpha$-Untereinheit wird durch einen GDP-GTP-Austausch und seine Abdissoziation von den β- und γ-Untereinheiten aktiviert und stimuliert die Adenylatzyklase (Coulter und Rodbell 1992; Post et al. 1992). Bei der Adenylatcyklaseaktivierung wird GTP zu GDP und P_i (anorganisches Phosphat) hydrolysiert, wodurch die $G_s\alpha$-Untereinheit wieder inaktiv wird und mit der Untereinheit-β und -γ assoziiert. Die Aktivierung der Adenylatcyklase führt zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels (Gawler et al. 1987; Li et al. 1997). Zusätzlich kann durch die Bindung von Glucagon an seinen Rezeptor über die $G\alpha q$-Proteinaktivierung die Phospholipase-C-Aktivität gesteigert werden, was zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels führt (Wakelam et al. 1986; Pittner und Fain 1991; Jelinek et al. 1993) (Abb. 4).

Die intrazelluläre Funktion von cAMP ist die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). PKA ist ein tetrameres Enzym, das aus zwei regulatorischen R-Untereinheiten und zwei katalytischen C-Untereinheiten, besteht. In Abwesenheit von cAMP werden die Substratbindungsstellen der C-Untereinheiten durch die R-Untereinheiten blockiert. Durch die Bindung von jeweils zwei cAMP-Molekülen an jede R-Untereinheit kommt es zu einer Konformationsänderung und zur Abdissoziation der beiden C-Untereinheiten. Dadurch werden die Substratbindungsstellen der PKA frei gemacht und stehen den katalytischen Vorgängen zur Verfügung (Roesler et al. 1988). Die aktivierte PKA phosphoryliert

spezifische Serylreste einer Reihe von Proteinen wie z.B. Glucogensynthetase, hormonsensitive Lipase, Myosinkinase oder Cholesterinester-Hydrolase.

Erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel können ebenfalls die Transkription spezifischer Gene beeinflussen. Die cAMP-abhängigen Gene enthalten in ihrer Promotorregion eines oder mehrere cAMP-responsive Elemente (CRE) mit der Struktur 5´-TGACGTCA-3´ (Comb et al. 1986; Montminy et al. 1986), die eine auffallende Ähnlichkeit zu der AP-1-Sequenz besitzt (Borrelli et al. 1992). Die Aktivierung von Genen, die CRE als Enhancer-Element enthalten, erfolgt nach Bindung der Transkriptionsfaktoren CREB (cAMP-responsive-element-binding protein), CREM (cAMP-responsive-element-binding modulator) und / oder ATF-1 (activating transcription factor 1). CREB ist ein dimeres Protein und gehört zusammen mit CREM und ATF-1 zu Transkriptionsfaktoren mit einer Leuzin-Zipper-Struktur, die für die Dimerisierung verantwortlich ist (Landschulz et al. 1988). Die dimeren Traskriptionsfaktoren werden durch die in den Kern translozierte PKA an Serin-Resten phosphoryliert: CREB an Ser(133), CREM an Ser(117), und ATF-1 an Ser(63) (Yamamoto et al. 1988; Gonzalez und Montminy 1989; de Groot et al. 1993). Der aktivierte Transkriptionsfaktor kann mit den Coaktivatoren CBP (CREB-binding protein) und p300 dem Transkriptionsfaktor TF II D (Ferreri et al. 1994) sowie der RNA-Polymerase II (Kee et al. 1996; Kim TK et al. 1998; Nakajima et al. 1997 a; Nakajima et al. 1997 b) assoziieren und die Transkription des jeweiligen Gens stimulieren (Abb. 4). Beispiele für CRE-Elemente enthaltende Gene sind Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, Proenkephalin, Somatostatin und das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) (Roesler et al. 1988).

In der Gruppe der CRE-bindenden Faktoren gibt es neben den Aktivatoren der Genexpression auch Repressoren. Beispiele für Aktivatoren sind CREB, CREMτ und ATF-1 (activating transcription factor 1) (Meyer und Habener 1993). Durch alternatives RNA-Splicing entstehen aus dem Transkriptionsprodukt des für CREM codierenden Gens Repressoren, wie die CREM-Isoformen CREMα, -β und -γ, sowie die ICER´s (inducible cAMP early repressor) (Laoide et al. 1993; Molina et al. 1993). Daneben gehören auch E4BP4 (Cowell et al. 1992) sowie CREB-2 (Karpinski et al. 1992) zu den CRE-bindenden Faktoren, die eine negative Wirkung auf die Expression der jeweiligen Gene haben.

Ein zweiter Effekt, der über den Glucagonrezeptor vermittelt wird, ist die Erhöhung der intrazellulären Calziumkonzentration. Es konnte gezeigt werden, dass die Calziumkonzentrationserhöhung durch Glucagon über eine Induktion des Ca^{2+}-Einstroms und Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+}-Speichern vermittelt wird (Mine et al. 1988; Benedetti et al. 1989; Bygrave et al. 1993). Das Inositol-(1,4,5)-triphosphat (IP3) ist der intrazelluläre Überträgerstoff, der für die Erhöhung der Calciumkonzentration verantwortlich ist. Die Bildung von IP3 aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

(PIP(4,5)2) wird durch die aktivierte Phospholipase C vermittelt (Wakelam et al. 1986; Pittner und Fain 1991; Jelinek et al. 1993; Hansen et al. 1998).

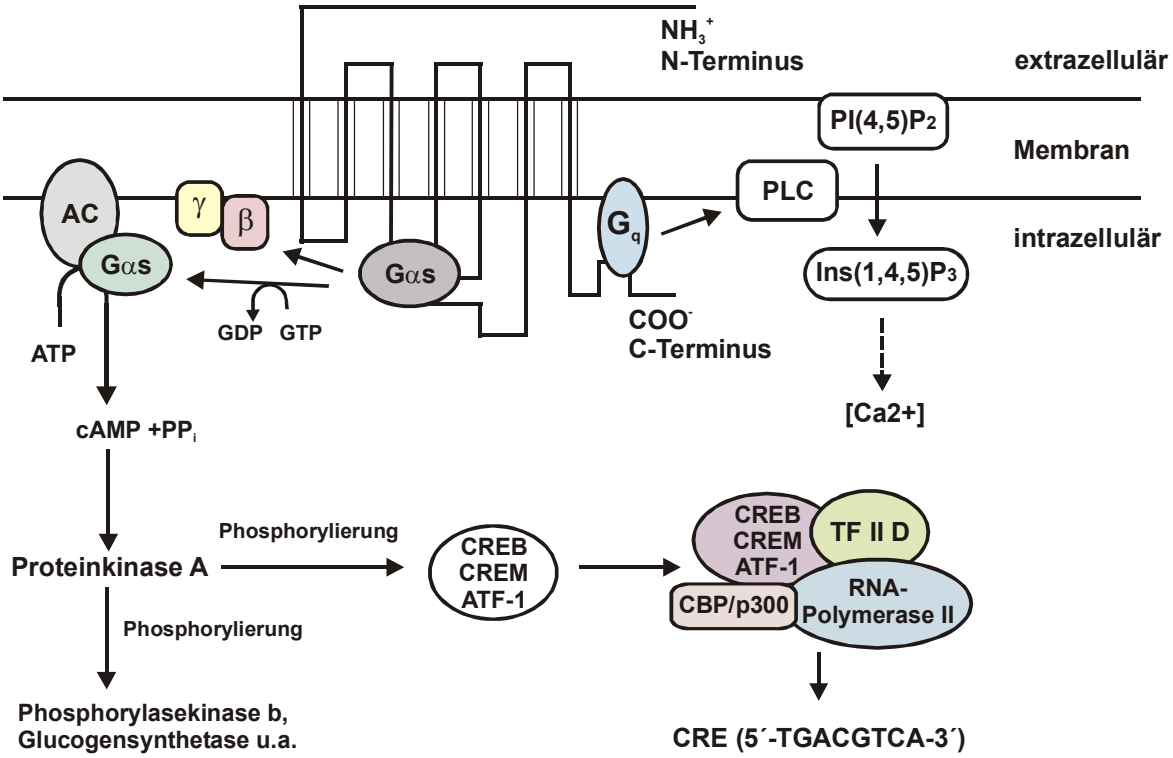

Abb. 4: **Modell der Signalweiterleitung über den Glucagonrezeptor.** Erläuterung siehe Text. AC: Adenylatzyklase; ATF-1: activating transcription factor 1; ATP: Adenosintriphosphat; CBP: CREB-binding protein; CRE: cAMP-responsives Element, CREB: cAMP-responsive-element-binding protein, CREM: cAMP-responsive-element-binding modulator; Gαs, -β, -γ: G-Proteine; GDP: Guanosindiphosphat; GTP: Guanosintriphosphat; Ins(1,4,5)P3: Inositol-1,4,5-triphosphat; PLC: Phospholipase C; PI(4,5)P2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; TF II D: Transkriptionsfaktor II D

1.4 Aufgabenstellung

Da Insulin die PAI-1-Genexpression in primär kultivierten humanen Hepatozyten, der humanen Hepatomzellreihe HepG2 und arteriellen Endothelzellen induzierte, sollte überprüft werden, ob Insulin diese Wirkung auch in primären Rattenhepatozyten entfaltet und ob dabei der PI3K/PKB-Signalweg von Bedeutung ist. Weiterhin sollte versucht werden, mittels Transfektion von Ratten-PAI-1-Promotor-Luc-Genkonstrukten, mögliche Insulin-responsive Genelemente zu identifizieren.

Da Glucagon der klassische Insulinantagonist ist, sollte untersucht werden, ob Glucagon die Insulin-vermittelte PAI-1-Genexpression in primären Rattenhepatozyten supprimiert. Des Weiteren sollten ebenfalls mittels Transfektion von Ratten-PAI-1-Promotor-Luc-Genkonstrukten mögliche Glucagon-responsive Genelemente identifiziert werden.

2. MATERIAL

2.1 Tiere und Tierhaltung

Die Experimente wurden mit Hepatozyten aus männlichen Wistar-Ratten (180-280 g) der Firma Winkelmann (Borchen/Westfalen) durchgeführt. Die Tiere wurden frühestens 6 d nach Transport für die Präparation von Hepatozyten verwendet. Solange wurden sie im 12h-Hell-Dunkel-Rhythmus (19 h - 7 h Dunkelphase) mit freiem Zugang zum Futter (Rattendiät “ssniff“, Fa. Spezialitäten GmbH, Soest/ Westfalen) bei einer Raumtemperatur von 19-23°C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 50% gehalten. Bei einer Futteraufnahme von 12-15 g und einem Wasserverbrauch von 12-25ml pro Tag ergab sich eine wöchentliche Gewichtszunahme von 30-40 g. Die Präparation der Hepatozyten erfolgte in den ersten 3 h der Hellphase. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von Nembutal der Firma Sigma (München) (80 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert.

2.2 Bakterien, Vektoren und Plasmidkonstrukte

2.2.1 Bakterien

Zur Transformation und Anreicherung der Plasmide wurde der *E. coli* K 12 Sicherheitsstamm DH5α oder der *E. coli* Stamm XL 1-blue der Firma Stratagene verwendent.

2.2.2 Vektoren

PGL3-Basic-Vektor

Zur Herstellung der Plasmide pGL3PAI-766, pGL3PAI-766M1 und pGL3PAI-766M2 wurde der Vektor pGL3-basic (4.818 kb) der Firma Promega, in dessen Polylinker die entsprechende Region des Promotors oder der Mutanten des Ratten-Plasminogen-Activator-Inhibitor 1 (PAI-1) einkloniert wurde, verwendet. Die Polylinkerregion zeichnet sich durch die Aneinanderreihung singulärer Restriktionsschnittstellen aus, die der Einklonierung von DNA-Fragmenten dienen. Der Polylinker wird von Sequenzen flankiert, an die die Primer GL-Primer-2 und reverser Primer, die zur DNA-Sequenzierung der einklonierten DNA-Fragmente notwendig sind, binden. Der Vektor enthält das Luciferase-Gen (luc +) als Reportergen zum Nachweis der Genexpression und zwei Polyadenylierungssignale. Zusätzlich trägt der Vektor pGL3-basic ein Ampicillin-Resistenzgen und zwei Replikationsursprünge ori/f1 ori, letzteres für die Produktion von single-stranded DNA (ssDNA) (Abb. 5).

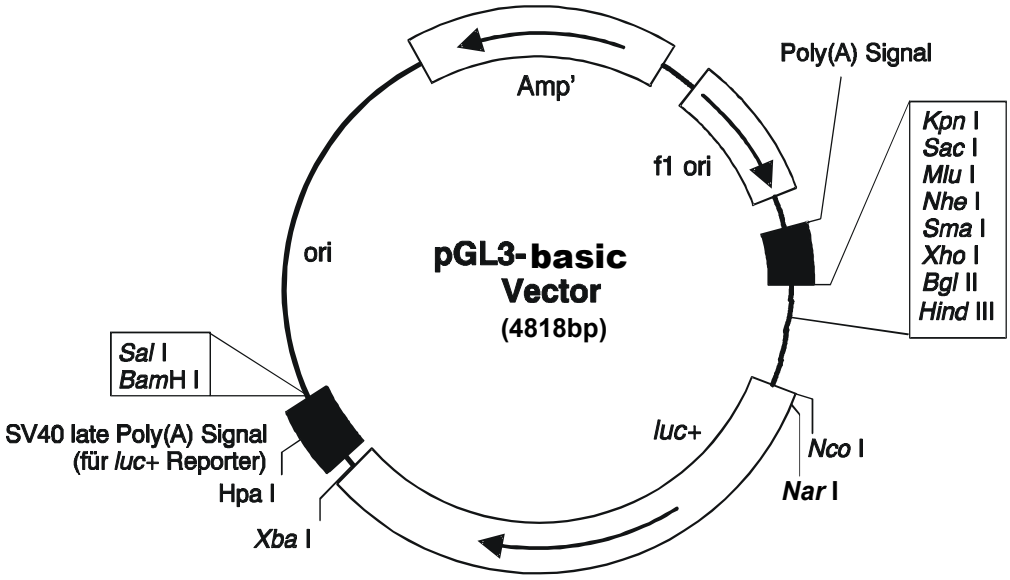

Abb. 5: **Aufbau des pGL3-basic-Vektors.** Dem Polylinker (41 bp) folgt das Luciferase-Gen (luc +, 1649 bp) und ein Poly-A-Signal (221 bp). Ein weiteres Poly-A-Signal (153 bp) befindet sich vor dem Polylinker. Weiterhin sind ein Ampicillinresistenz-Gen (β-Lactamase; Amp´; 857 bp) und zwei Replikationsursprünge ori und f1 ori (454 bp) enthalten. Luc + wird in Uhrzeiger-, Amp´ gegen die Uhrzeigerrichtung abgelesen.

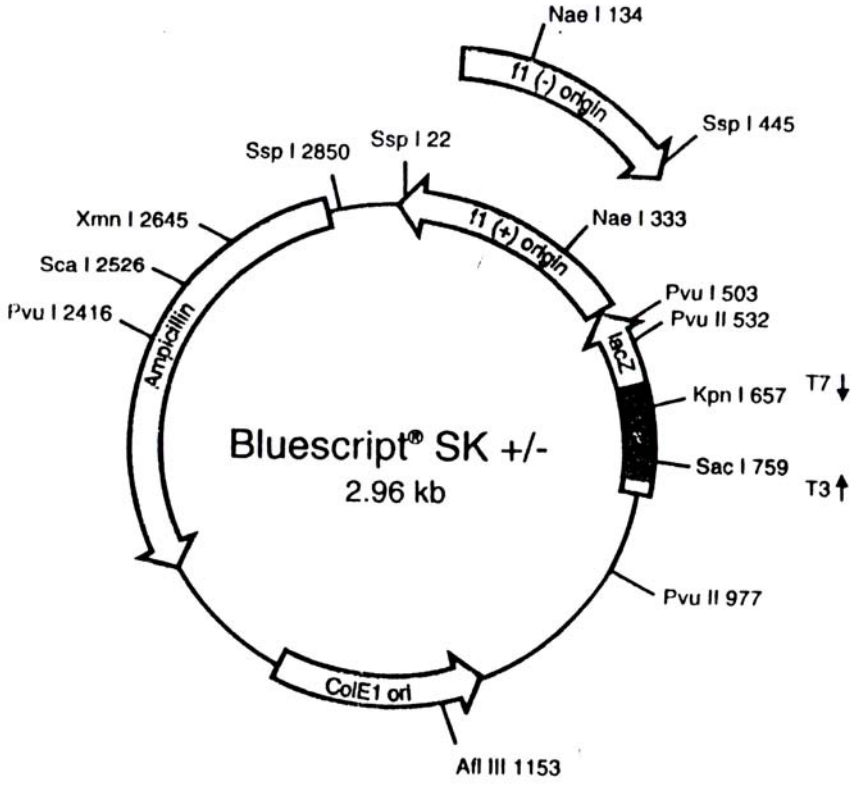

Abb. 6: **Aufbau des Bluescript-Vektors (pSK).** Der Vektor besitzt die Replikationsstelle ColE1 ori, das Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion transformierter Bakterien in Ampicillin-haltigen Medien. Das LacZ-Gen exprimiert β-Galactosidase und ermöglicht ein blau/weiß-Screening rekombinanter Bakterien. In dieses Gen ist eine multiple Klonierungsstelle integriert, die von den T3- und T7-Promotoren für die in-vitro-Transkription und von den Sequenzen für den universalen und reversen Primer flankiert wird.

pSK-Vektor

Zur in-vitro-Synthese von RNA wurde der Plasmidvektor Bluescript (pBS-SK) der Firma Stratagene (Heidelberg) eingesetzt.

Der Vektor stammt vom pUC19-Vektor ab und besteht aus 2958 bp. Er ist ein Transkriptionsvektor, der T3- und T7-RNA-Polymerase-Promotoren, eine multiple Klonierungsstelle (Polylinker), die viele singuläre Restriktionsstellen zur Einklonierung von DNA enthält, und Primer-Sequenzen (universaler und reverser Primer) besitzt, die für die DNA-Sequenzierung notwendig sind (Abb. 6)

2.2.3 Plasmidkonstrukte

pSK-PAI53 rat

Zur Herstellung der Digoxigenin-markierten Antisense-PAI-1-RNA-Sonde wurde das pSK-PAI53-rat-Plasmid verwendet. Das Plasmid wurde aus dem Vektor Bluescript (pBS-SK) der Firma Stratagene (Heidelberg) hergestellt, in dessen Polylinker die entsprechenden PAI-1-cDNA einkloniert wurden. Das pSK-PAI53-rat-Plasmid lag im Institut bereits vor.

pGL-3-Konstrukte: pGL3PAI-766, pGL3PAI-766M1, pGL3PAI-766M2

Die Plasmide pGL3PAI-766, pGL3PAI-766M1 und pGL3PAI-766M2 wurden aus dem Vektor pGL3-Basic (4818bp) der Firma Promega hergestellt, in dessen Polylinker die entsprechenden Promotorelemente einkloniert wurden. Die Promotorelemente wurden in die Polylinkerregion einkloniert, nachdem der pGL3-Vektor mit *Bgl II* und *Sac I* verdaut und mit Phosphatase behandelt wurde, um eine Religation der offenen Enden zu verhindern. Die doppelsträngigen, phosphorylierten Promotorelemente, welche im 5´ und 3´ Bereich komplementäre Enden zu der *Bgl II*-, bzw. im 5´ Bereich zur *Sac I*- und im 3´ Bereich zur *Bgl II*-Schnittstelle besaßen, sowie der geschnittene, dephosphorylierte Vektor wurden mit Hilfe von T4-Ligase ligiert. Die pGL3-Konstrukte lagen im Institut bereits vor und sind in Abb. 7 dargestellt.

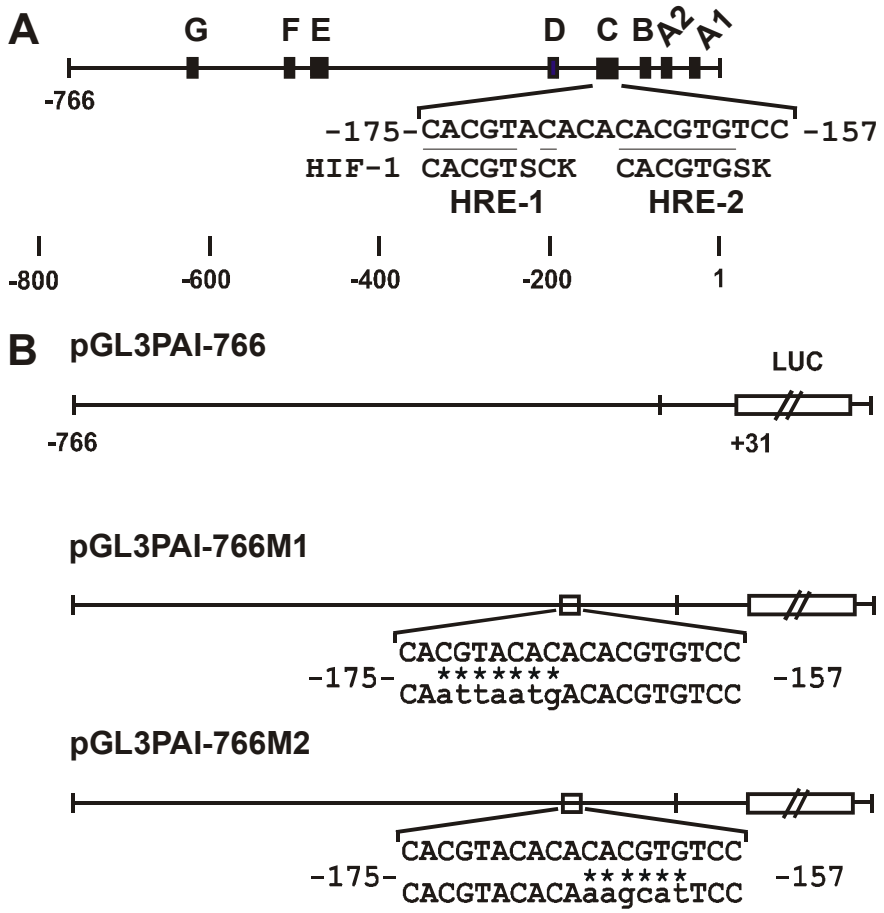

Abb. 7: **Luciferase-Gen-Konstrukte mit Bereichen des Ratten-PAI-1-Promotors.** (A) Die Promotorelemente im 5´-regulatorischen Bereich des Ratten-PAI-1-Promotors [A-G]. Im "C"-Bereich die zwei potentiellen HIF-1-responsiven Elemente (HRE) mit Angabe der Sequenz und der HIF-1-Consensus-Sequenz BACGTSSK (unterstrichen) (B=G/C/T; S=C/G; K=G/T). (B) Die Ratten-PAI-1-Promotorregionen wurden in den pGL3-basic-Vektor vor das Luciferase-Gen kloniert. Die Sequenzen, die das HRE-1 und -2 umfassen, sind unterhalb der offenen Klammer angegeben, der mutierte Strang darunter. Die Kleinbuchstaben weisen auf die mutierten Basen hin. Sterne zeigen die Mutation an.

2.3 Digoxigenin-markierte RNA-Sonden

Digoxigenin-markierte Antisense-β-Actin-(ACT)-RNA-Sonde wurde mittels in-vitro-Transkription aus pBS-ACT durch die T3-RNA-Polymerase hergestellt. Transkribiert wurde ein 550 bp großes Fragment, mit der Position 69 - 618 (Embl. HSA 1007). Durch den Einbau von Digoxigenin-markierten Uridinomonophosphaten (DIG-UMP) wurde das Transkript markiert und konnte so für Hybridisierungen eingesetzt werden. Im Northern Blot konnte eine für ACT spezifische Bande mit einer Größe von 1,8 kb nachgewiesen werden.

Digoxigenin-markierte Antisense-PCK-RNA als Hybridisierungssonde lag ebenfalls im Labor bereits vor. Die Digoxigenin-markierte Antisense-PAI-1-RNA-Sonde, die verwendet wurde, ist in 3.2.5 beschrieben.

2.4 Antikörper

Zum Nachweis des Ratten-Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Proteins wurde ein Affinitätschromatographie-gereinigter polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, der gegen das PAI-1-Protein der Ratte und anderer Spezies und gegen PAI-1/PA-Komplexe gerichtet ist, eingesetzt (American Diagnostics, Heidelberg, Deutschland).

Zum Nachweis der Primärantikörper wurde Anti-Kaninchen-IgG-HRP (Horseradish-Peroxidase) aus Ziege benutzt (Santa Cruz, Kalifornien).

2.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen:

Alle Restriktionsendonukleasen waren von Boehringer/ Mannheim.

Enzym	**Erkennungssequenz**	**Puffer**
BamH I	G^GATCC	B
Bgl II	A^GATCT	M
Cla I	AT^CGAT	H
EcoR I	G^AATTC	H
Hind III	A^AGCTT	B
Nhe I	G^CTAGC	M
Not I	GC^GGCCGC	H
Pst I	CTGCA^G	H
Sma I	CCC^GGG	A
Sac I	GAGCT^C	A
Sty I	C^C(A, T)(A, T)GG	H
Xba I	T^CTAGA	H

Inkubationspuffer

	A	B	H	M
Tris-Acetat	33 mM	-	-	-
Tris-HCl	-	10 mM	50 mM	10 mM
Mg-Acetat	10 mM	-	-	-
Na-Acetat	66 mM	-	-	-
$MgCl_2$	-	5 mM	10 mM	10 mM
NaCl	-	100 mM	100 mM	100 mM
DTE	-	-	1 mM	1 mM
DTT	0,5 mM	-	-	-
Mercaptoethanol	-	1 mM	-	-
pH-Wert bei 37 °C	7,9	8,0	7,5	7,5

Restriktionsendonukleasen spalten nur unter bestimmten Pufferbedingungen. Für den Verdau wurden die vom Hersteller jeweils empfohlenen Puffer eingesetzt, bei denen das Enzym seine volle Aktivität besitzt.

DNA/RNA-modifizierende Enzyme:

T3-, T7-DNA-abhängige-RNA-Polymerase

Die Bakteriophagen T3-DNA-abhängige-RNA-Polymerase benötigt als Matrize ein doppelsträngiges DNA-Molekül. Der Vektor Bluescript besitzt Promotoren für die T3- und T7-DNA-abhängigen-RNA-Polymerasen. So kann ausgehend von diesen Promotoren durch diese Enzyme *in vitro* einzelsträngige RNA in 5´-3´-Richtung synthetisiert werden. Die Transkriptsequenz ist komplementär zu einer der DNA-Sequenzen des DNA-Doppelstranges. Je nach Orientierung des einklonierten DNA-Fragmentes kann so zwischen dem T3- und T7-Promotor gewählt werden, um die erwünschte mRNA-Sequenz zu gewinnen. Die Polymerasen sind Mg^{2+}-abhängig und benötigen die vier Ribonukleosidtriphosphate ATP, CTP, GTP und UTP zur Synthese. Das Produkt trägt auf der 5´-Seite drei Phosphorylgruppen und endet mit einer 3´-OH-Gruppe am 3´-Ende (Sambrook et al. 1989).

Sonstige Enzyme:

Collagenase

Die Collagenase wird bei der Präparation von Rattenlebereinzelzellen verwendet. Sie ist eine Protease und löst Collagen im Bindegewebe der Leber auf. Proteasen sind nicht spezifisch für bestimmte Substrate (bestimmte Proteine), sondern für bestimmte Strukturmerkmale der Peptidketten.

Lysozym

Lysozym ist ein bakterizides Enzym, das die glykosidische Bindung des Mureins in der Bakterienzellwand spaltet. Es ist eine Muramidase.

RNase A

In einzelsträngiger RNA schneidet die aus Rinderpankreas isolierte RNase A die Phosphodiesterasebindung von Pyrimidinnukleosiden auf deren 3´-Seite. Dabei entstehen Nukleosid-5´-Monophosphate. RNase A besitzt ein MW von 13,7 kDa und ein pH-Optimum bei 7,0-7,5 (Sambrook et al. 1989; Produktinformation). Sie wird bei der Isolierung von DNA verwendet. Da die RNase A hitzestabil ist, kann sie vor Gebrauch zur Inaktivierung eventuell vorhandener Dnasen 10 min bei 100 °C gekocht werden.

2.6 Hemmstoffe

H-7 (1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methyl-piperazine·2HCl), Biomol Research Laboratories, USA

H7 ist ein unspezifischer Hemmstoff der die PKA (Proteinkinase A) (Ki = 3.0µM), PKG, MLCK (Myosin-leichte Kette-Kinase) und PKC (Proteinkinase C) hemmt. Der Hemmstoff ist zellwandpermeabel (Hidaka et al. 1984, Produktinformation).

Rp-cAMPS (Rp-Adenosine-3',5'-cyclic mono-Phosphorothioate triethylamine salt), Biomol Research Laboratories, USA

Rp-cAMPS ist ein spezifischer competitiver Inhibitor der cAMP-abhängigen Aktivierung von Proteinkinasen durch cAMP. (Botelho et al. 1988, Produktinformation). Der Hemmstoff ist zellwandpermeabel und wird durch Phosphodiesterasen nicht dektiviert (Braumann et al. 1986, Produktinformation).

Wortmannin, Biomol Research Laboratories, USA

Wortmannin ist ein selektiver Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (Ui et al. 1995, Produktinformation) und ist zellwandpermeabel. Die Hemmung wird durch eine kovalente Bindung an die PIP_3 (Wymann et al. 1996, Produktinformation) vermittelt. Andere Kinasen, wie zum Beispiel die PI-4-Kinase, werden erst dann gehemmt, wenn Wortmannin in einer 100-fach höheren Konzentration, als für die Hemmung der PIP_3 benötigt, eingesetzt wird. In isolierten Rattenadipozyten werden die durch Insulin vermittelten metabolischen Effekte ohne die Beeinflussung der Insulin-Rezeptor-Thyrosinkinaseaktivität nur auf der Ebene der PIP_3, gehemmt (Okada et al. 1993, Produktinformation).

2.7 Nachweis-, Reinigungs- und Synthesesysteme ("Kits")

DIG-Nucleic-Acid Detection Kit, Boehringer/ Mannheim

Luciferase Assay Kit, Berthold/ Pforzheim

ECL-Kit, Amersham/ Braunschweig

JETstar, Plasmid Purification System, Genomed/ Bad Oeynhausen

2.8 Stammlösungen

Die Stammlösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit sterilem H_2O angesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Alle Lösungen für RNA-Versuche wurden mit DEPC-H_2O angesetzt.

APS

		Endkonzentration
APS	100 mg/ml	10%

APS wurde immer frisch angesetzt.

Blocking-Reagenz 10%

50 mg Blocking-Reagenz (keine weiteren Herstellerangaben) wurde unter Erhitzen in 500 ml 1× Maleinsäure-Puffer gelöst. Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

Natriumacetat 2M pH 4,1

		Endkonzentration
3 M NaAc	2 Teile	2M
Essigsäure (konz.)	1 Teil	

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Essigsäure auf 4,1 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

Natriumacetat 3 M pH 5,2

		Endkonzentration
NaAc	24,61 g	300 mM
H_2O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Essigsäure auf pH 5,2 eingestellt. Man muss hier berücksichtigen, dass für die pH-Wert-Einstellung ein sehr großes Volumen an Essigsäure benötigt wird. Die Lösung wurde autoklaviert.

PBS 10x

		Endkonzentration
NaCl	81,82 g/l	1,4 M
KCl	2,02 g/l	27 mM
Na_2HPO_4	16,02 g/l	90 mM
KH_2PO_4	2,04 g/l	15 mM

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde mit DEPC-H_2O angesetzt und autoklaviert.

SDS

		Endkonzentration
SDS	10 g/100 ml	10%

Falls das SDS ausfällt, muss es erwärmt werden, bis es wieder gelöst ist.

SSC 20x

		Endkonzentration
NaCl	175,32 g/l	3 M
Natrium-Citrat	88,25 g/l	0,3 M

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

Tris/HCl 1 M

		Endkonzentration
Tris	12,11 g/l	1 M

Die Lösung wurde für verschiedene Stammlösungen mit HCl auf folgende pH-Werte eingestellt: pH 7,5; 8,0; 9,0. Die Lösungen wurden autoklaviert.

Tris/HCl 0,1 M

		Endkonzentration
Tris	1,211 g/l	0,1 M

Die Lösung wurde für verschiedene Stammlösungen mit HCl auf folgende pH-Werte eingestellt: pH 7,5; 8,0; 9,0. Die Lösungen wurden autoklaviert.

2.9 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in p.a. Qualität bezogen.

Biometra/ Göttingen:

MOPS

Boehringer/ Mannheim:

Anti-DIG-AP-AK, Blocking-Reagenz, Collagenase, CSPD, DIG-RNA-Labeling-Mix, RNase A, T3-Polymerase

Fluka Chemie/ Buchs, Schweiz:

Glycerol, Guanidiniumthiocyanat

Gibco-BRL, Life Technologies/ Eggenstein:

Agarose, Medium M199

Kodak/ Rochester, USA:

Entwickler- und Fixiererlösung

MBI Fermentas/ St. Leon-Rot:

DNA-Standards

Merck/ Darmstadt:

Alle üblichen Laborchemikalien, Formamid, H_2O_2

Messer-Griesheim/ Düsseldorf:

Stickstoff-, Kohlendioxid-, Sauerstoffgemische

Pharmacia Biotech/ Freiburg:

LMW-Proteinstandard

Promega/ Mannheim:

Luciferase Zell Lysis Reagenz (Lysis-Puffer)

Roth/ Karlsruhe:

Hepes, Phenol (in Tris-Puffer pH 7,0-7,5)

Serva/ Heidelberg:

Acrylamid, Ampicillin, Ammoniumpersulfat, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie-Blue, β-Mercaptoethanol, Paraformaldehyd, Ponceau S, Penicillin, Rinderserumalbumin, SDS, TEMED, Tween 20

Sigma/ München:

cAMP, Dexamethason, Ethidiumbromid, Formamid, Glucagon, Insulin, N-Lauroylsarcosin, Maleinsäure, Tris

2.10 Sonstige Materialien

3 MM-Whatmanpapier, verstärkte Nitrocellulose, Schleicher und Schüll/ Melsungen

Hyperfilm MP und N Nylonmembran, Amersham/ Braunschweig

Kulturschalen, Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Polystyrolröhrchen, Greiner/ Nürtingen

Sterilfilter Nalgene 0,2 μm, Sartorius GmbH/ Göttingen

Braunülen 2G14, Braun/ Melsungen

Dialyseschlauch VISKING, Typ 8/32, Roth/ Karlsruhe

2.11 Geräte

Automatische Pipettenhilfe, Typ Varipette 4710, Eppendorf/ Hamburg

Automatische Pipettenhilfen, Typ Pipetman P 20, P 200, P 1000, Abimed Analysen-Technik GmbH/ Langenfeld

Begasungsbrutschrank "Cytoperm 8080" und "B 5060 EK/O_2", Gasmonitor, Heraeus/ Hanau

Eismaschine, Inco-Ziegra/ Isernhagen

Eppendorf-Tischzentrifugen, Typ 5414 und 5415 C, Eppendorf-Netheler GmbH/ Hamburg

Eppendorfthermostat, Typ 5320, Eppendorf - Netheler GmbH/ Hamburg

Flachbettelektrophoresegelkammern, Eigenbau der Institutswerkstatt

Geltrockner, Schütt Labortechnik/ Göttingen

Hybridisierungsschrank OV 3 und -Gefäße, Biometra/ Göttingen

Magnetrührer mit Heizung, Typ RCT B, Ika Labortechnik/ Staufen

Mikrowellengerät, Typ KOR-6105, Daewoo Electronics Deutschland GmbH/ Butzbach

Millipore-Anlage, "Milli-Q", Millipore/ Neuisenburg

pH Meter, pH 535 Multi Cal, Schütt Labortechnik/ Göttingen

Röntgenfilmkassetten, Intras/ Göttingen

Schüttelinkubator, Modell 3-25, New Brunswick Scientific Co., Inc./ Edison, New Jersey 08818, USA

Sicherheitswerkbank, Typ MRF 06.12 - GS, Prettl Laminarflow und Prozesstechnik GmbH/ Bempflingen

Sigma-Tischzentrifuge 3 E-1, Sigma Laborzentrifugen GmbH/ Osterode/ Harz

Sorvall-Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge, RC 5 und RC 5 B, Du Pont Instruments/ Bad Nauheim

Spannungsgerät, Typ EPS 500/400, Pharmacia LKB GmbH/ Freiburg

Steril-Arbeitsbank, Typ Lamin Air, TL 2472, Heraeus/ Hanau

Sterilpumpe, DBP Nr. P24333991, Schleicher und Schüll/ Dassel

Thermocycler, Bio-Med/ Theres

UV-Stratalinker, Modell 1800, Stratagene/ Heidelberg

Vakuum-Blot-Kammer, Biometra/ Göttingen

Wippe, Eigenbau der Institutswerkstatt

3. METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung der Rattenhepatozyten

Die Isolierung der Hepatozyten erfolgte unter aseptischen Bedingungen durch Collagenase-Perfusion der Leber (modifiziert nach Berry und Friend 1969).

Perfusion der Leber

1. Nicht-rezirkulierende in-situ-Prä-Perfusion der Leber: Nach Öffnen der Bauchhöhle wurde die Leber über eine in die Vena portae eingeführte Kunststoffkanüle mit 150-200 ml Prä-Perfusionsmedium mit einer Flussrate von 30 ml/min blutfrei gespült. Der Aufschluss erfolgte über eine unterhalb der Einmündung der Nierenvenen in die Vena cava inferior eingeführte Kanüle.

2. Rezirkulierende Perfusion: Die anschließende Perfusion mit einer Flussrate von 30 ml/min und einer Dauer von 7-11 min mit Collagenase-Perfusionsmedium führte zur Auflösung des Zellverbandes. Über die in die Vena cava inferior eingeführte Kanüle wurde das Medium mit einem Schlauch zurück in ein Sammelgefäß geleitet. Der Perfusionskreislauf wurde durch Ligatur der Vena cava inferior vor der Einmündung ins Herz geschlossen. Sowohl Prä-Perfusions- als auch Perfusionsmedium wurden vom Sammelgefäß über einen Oxygenator gepumpt, von wo aus sie mit einem Druck von 10-15 cm Wassersäule in die Vena portae strömten.

Herstellung der Hepatozytensuspension

Nach Beendigung der Perfusion wurde die Leber aus dem Tier herauspräpariert und in eine mit Waschmedium gefüllte Glasschale überführt. Die Leberkapsel wurde vorsichtig mit zwei Pinzetten zerrissen und die Zellen unter leichtem Schwenken aus dem Leberlappen herausgespült. Anschließend wurden Bindegewebs- und Kapselbestandteile entfernt sowie größere Zellaggregate durch Filtration der primären Suspension durch ein Nylonnetz (Porengröße 79 μm) abgetrennt. Die Trennung der Hepatozyten von Nicht-Parenchymzellen und Zelltrümmern erfolgte durch mehrfache selektive Sedimentation der Zellen (20 *g*, 2 min) und Verwerfen des Überstandes. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Hepatozyten in M 199 aufgenommen. Pro 1 g Feuchtgewicht der sedimentierten Zellen wurden 50 ml M 199 zugegeben; die Suspension hatte eine Zelldichte von etwa 10^6/2,5 ml.

Medien und Lösungen für die Hepatozytenpräparation und -kultur

Alle Medien und Lösungen für die Zellkultur wurden in entmineralisiertem Wasser, das nochmals durch Quarzdestillation gereinigt war, angesetzt, in autoklavierte Glasgefäße sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Krebs-Ringer-Stammlösung :

		Endkonzentration
NaCl	7 g/l	120 mM
KCl	0,36 g/l	4,8 mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,296 g/l	1,2 mM
KH_2PO_4	0,163 g/l	1,2 mM
$NaHCO_3$	2,016 g/l	24,4 mM

Die Lösung wurde mit Carbogen äquilibriert und auf pH 7,35 eingestellt.

Präperfusionslösung :

		Endkonzentration
EGTA	0,1 g/l	0,25 mM

gelöst in Krebs-Ringer-Stammlösung.

Collagenase-Perfusionsmedium:

		Endkonzentration
HEPES	3,356 g/l	15 mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,588 g/l	4 mM
Collagenase	0,5 g/l	

gelöst in Krebs-Ringer-Stammlösung.

Für jede Hepatozytenpräparation wurde die Collagenase kurze Zeit vorher im Perfusionsmedium gelöst, für 30 min mit Carbogen äquilibriert und anschließend sterilfiltriert.

Waschmedium:

		Endkonzentration
HEPES/NaOH pH 7,4	4,766 g/l	20 mM
NaCl	7 g/l	120 mM
KCl	0,36 g/l	4,8 mM
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,296 g/l	1,2 mM
KH_2PO_4	0,163 g/l	1,2 mM
Rinderserumalbumin	4 g/l	0,4%

Medium 199:

		Endkonzentration
Pulvermedium M 199 mit Earle`s Salzen ohne $NaHCO_3$	9,77 g/l	
Glucose x H_2O	1,1 g/l	5,5 mM
HEPES	3,6 g/l	15 mM
$NaHCO_3$	1,5 g/l	18 mM
Rinderserumalbumin	4 g/l	0,4%

Lösung A wurde durch Lösen von $NaHCO_3$ in 550 ml H_2O hergestellt und mit Carbogen für mehrere Stunden begast. Der pH wurde auf 7,35 eingestellt. Lösung B wurde aus Pulvermedium, Rinderserumalbumin und HEPES hergestellt und der pH auf 7,35 eingestellt. Anschließend wurden die Lösungen A und B zusammengegossen und nochmals mit Carbogen begast, bis ein pH-Wert von 7,35 erreicht war. Nachfolgend wurde das Medium sterilfiltriert.

3.1.2 Primärkultur von Rattenhepatozyten

Die Hepatozytensuspension wurde direkt nach der Herstellung mit fetalem Kälberserum (4 ml/100 ml Suspension) - zur besseren Anheftung an den Boden der Polystyrolschalen - , der Antibiotika-Stammlösung (1 ml/100 ml Suspension), 10^{-7} M Dexamethason und 10^{-9} M Insulin als permissiven Wachstumsfaktor versetzt. Die Kultivierung der Hepatozyten erfolgte unter verschiedenen Bedingungen entsprechend der nachfolgenden Verwendung der Zellen:

Art der Verwendung	Zellzahl / Volumen der ausplatierten Suspension	∅ der Kulturschale
Transfektion	$1x10^6$/1,5 ml	60 mm
Protein-Gewinnung	$4x10^6$/3 ml	60 mm
RNA-Isolierung	$3x10^6$/9 ml	100 mm

Nach der Anheftungsphase von 4 h (bei transfizierten Zellen 5 h) wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Hepatozyten wurden dann im Medium 199 mit den oben angegebenen Hormon- und Antibiotikakonzentrationen aber ohne fetales Kälberserum weiterkultiviert. Es wurden 2,5 ml Medium pro 60 mm Kulturschale und 6 ml pro 100 mm Kulturschale zugegeben. Alle 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Inkubation der Hepatozyten erfolgte in Begasungsbrutschränken bei einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 8% O_2 (v/v) oder 16% O_2 (v/v), 5% CO_2 und entsprechend 87% (v/v) oder 79% N_2 bei 37°C.

Hormon- und Antibiotika-Stammlösungen

Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

Antibiotika

Penicillin G, Natrium-Salz	0,64 g/100 ml
Streptomycinsulfat	1,17 g/100 ml

in 0,9% NaCl-Lösung.

Dexamethason (100µM)

Dexamethason	3,92 g/100 ml

in 0,9% NaCl-Lösung.

Dexamethason wurde zunächst in 0,3 ml Ethanol gelöst und dann mit 0,9% NaCl-Lösung auf 100 ml aufgefüllt.

Glucagon (10 µM)

Glucagon	3,6 mg/100 ml
Rinderserumalbumin	100 mg/100 ml

in 0,9% NaCl-Lösung.

Glucagon wurde bei pH 10 gelöst, anschließend neutralisiert und mit Rinderserumalbumin versetzt, um die Anheftung von Glucagon an die Wand des Glasgefäßes zu verhindern.

Insulin (10 µM)

Insulin	6 mg/100 ml
Rinderserumalbumin	100 mg/100 ml

in 0,9% NaCl-Lösung.

Insulin wurde bei pH 2,5 gelöst, neutralisiert und mit Rinderserumalbumin versetzt.

3.1.3 Ernte, Proteingewinnung und Zellaufschluss von primär kultivierten Hepatozyten

Am Ende eines Versuchs wurden die Zellen auf den Kulturschalen aus dem Brutschrank genommen, sofort zweimal mit kaltem 0,9% NaCl gewaschen und bei -20°C für höchstens 12 h eingefroren. Innerhalb der nächsten 2 h erfolgte die RNA-Isolierung.

Von den Kulturschalen mit Zellen zur Proteingewinnung wurde nach der Inkubationszeit 1 ml Medium entnommen und in Eppendorf-Cups überführt.

Transfizierte Zellen wurden nach 15 min Schwenken in 300 µl 1 x Lysis Puffer abgeschabt, in Eppendorf-Cups überführt und auf Eis gestellt. Nach 15 s vortexen wurde das Zell-Lysat durch einmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen bei 37°C weiter aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden 2 min mit einer Tischzentrifuge (15.800 *g*, 14.000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup transferiert und konnte so bei -70°C aufbewahrt werden. Ferner wurde er in Biolumineszenzmessungen eingesetzt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen für die Elektro-Transformation

Eine TET-Platte (Endkonzentration 60 µg/ml LB) wurde mit *E. coli* XL 1 Bakterien aus einer Glycerolkultur beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 50 ml LB-Medium mit TET (60 µg/µl) wurden mit einer Einzelkolonie, die aus dem Ösenausstrich der Glycerolkultur gewachsen ist, angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden in 4 Erlenmeyerkolben 250 ml LB-Medium mit je 5 ml der Kultur beimpft und 3-4 h bei 37°

weiterinkubiert bis eine OD_{600} von 0,5-0,8 erreicht war. Alle 4 Suspensionen wurden danach 15 min bei (4.800 rpm GSA-Rotor) bei 4°C zentrifugiert. Pellets wurden in je 250 ml 10% Glycerin in Millipore Q gelöst und erneut 15 min bei (4.800 rpm GSA-Rotor) bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden je 2 Pellets zusammen in 250 ml 10% Glycerin in Millipore Q resuspendiert und 12 min bei 4.080 *g* (5.000 rpm GSA-Rotor) bei 4°C zentrifugiert. Beide Pellets wurden dann in 50 ml 10% Glycerin in Millipore Q gelöst und erneut 15 min bei 4.080 *g* (5.000 rpm GSA-Rotor) bei 4°C zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 2 ml 10% Glycerin in Millipore Q resuspendiert, in 70 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C bis zum Gebrauch gelagert. Die Kompetenz der Bakterien wurde durch die Transformation (s.u.) mit einem Plasmid, das ein Ampicillin-Resistenzgen enthält, überprüft. Dazu wurde der Transformationsansatz auf einem ampicillinhaltigen Agarboden ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag die Zahl der Kolonien bestimmt.

LB-Medium (Luria Bertani)

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

Mit NaOH wurde ein pH von 7,3 eingestellt. Das Medium wurde sofort nach dem Ansetzen autoklaviert.

3.2.2 Elektro-Transformation

Zur Transformation wurden kompetente Bakterien benutzt, die die Fähigkeit haben, lineare oder zirkuläre (z.B. Plasmide), doppelsträngige DNA aufzunehmen. Alle Schritte der Elektroporation bis zur Pulsgabe wurden auf Eis durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in einem Eppendorf-Cup verdünnt, so dass 1 ng/µl nach der Verdünnung im Cup vorlagen. 1 µl der DNA-Lösung wurde zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Der Transformationsansatz (70 µl) wurde in eine Elektroporationsküvette (d = 0,2 cm) überführt. Dabei sollte die Suspension an die Aluminiumelektrode pipettiert werden und möglichst vollständig, ohne Luftblasen, am Küvettenboden vorliegen. Anschließend wurde die Küvette in das Elektroporationsgerät (BioRad) gestellt.

Einstellungen des Pulse-Generators / Capacitors für die Pulsgabe: 25 µF; 2,5 kV; 200 Ω parallel zur Probe.

Da die Überlebensrate der Zellen während der ersten Sekunden nach Pulsgabe drastisch sinkt, wurden sofort nach der Elektroporation bei RT 500 µl SOC-Medium zum

Transformationsansatz hinzupipettiert und gemischt. Anschließend wurde die Suspension in ein E-Cup überführt und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 µl der Zellsuspension auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformationsansatz

Kompetente XL 1 Zellen (s.o.)	70 µl
präpariertes Plasmid (s. 3.2.3)	1 ng

Ampicillin-Agarplatten

500 ml LB-Medium (s.o.), dem 6,25 g Bactoagar zugegeben worden war, wurde autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C wurden 200 µl Ampicillin-Stammlösung (Endkonzentration 40 µg/ml) hinzu pipettiert, vermischt und je 10 ml in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Schalen ca. 6 h auf dem Kopf stehend bei 37°C getrocknet. Die fertigen Schalen wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	100 mg

wurde in H_2O gelöst; mit HCl wurde ein pH-Wert von 7,0 eingestellt; 500 µl Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

3.2.3 Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA (Maxipräparation)

Die nach Transformation mit einem Plasmid auf einer Ampicillin-Agarplatte gewachsenen Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 5 ml ampicillinhaltigem (40 µg/ml) LB-Medium vermehrt, um anschließend zu überprüfen, ob es sich um mit dem "richtigen“ Plasmid transformierte Bakterien handelt. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide trugen alle das Ampicillin-Resistenzgen. Nach ca. 8 h Inkubationszeit bei 37°C im Schüttler wurden 200-1000 µl der 5 ml Zellsuspension in 200 ml ampicillinhaltigem (40 µg/µl) LB-Medium aufgenommen und über Nacht bei 37°C im Schüttler weiter vermehrt. Aus der 200 ml Kultur der gepickten Kolonie wurde die Plasmid-DNA in einer sogenannten Maxipräparation isoliert.

Maxipräparation

Das Prinzip der Reinigung der Plasmid-DNA über die Silikat-Säulen besteht darin, dass die nach der Präzipitation eines großen Teils der Bakterienproteine und der genomischen DNA und dem Abbau der RNA durch RNasen noch verbliebenen Bestandteile des Zelllysats sukzessiv eluiert werden. Die Säulen enthalten Kieselerdepartikel (ungefähre Größe 100 µm), die kovalent mit einer hydrophilen Substanz beschichtet sind. Durch die hohe Ladungsdichte auf der Oberfläche der Partikel entsteht ein weites Separationsspektrum; durch Veränderung des pH-Wertes und der Ionenstärke der Puffer werden nacheinander Proteine, Metabolite, Polysaccharide, dNTP, dann RNA und einzelsträngige DNA und schließlich doppelsträngige Plasmid-DNA eluiert (Produktinformation).

Die Präparation der für die Transfektion benötigten Plasmid-DNA wurde mit dem JETstar Plasmid Maxipräp Kit der Firma Genomed entsprechend den Herstellervorschriften durchgeführt.

Über Nacht wurden die transformierten E. coli-DH5α-Bakterien in 200 ml LB-Medium bis zu einer Dichte von ungefähr 10^9 Zellen pro ml (OD_{600} 1-1,5) vermehrt. Die Bakterien wurden durch 30 min Zentrifugation bei 5.860 *g* (6.000 rpm, GSA-Rotor) geerntet. Das Sediment wurde mit 10 ml Puffer E1, dem 100 µg/ml RNase zugesetzt wurden, resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 10 ml Puffer E2 (mit NaOH und SDS zur Lyse der Bakterien) hinzugefügt. Anschließend wurde der Behälter 4-6 mal vorsichtig umgedreht, um das Auftreten von Scherkräften zu vermeiden, die die genomische DNA zerstören könnten. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT (auf keinen Fall länger, da es sonst zur Bildung von denaturierten supercoiled Formen der DNA kommt), während der die Zellen weiter lysiert werden, wurden 10 ml Puffer E3 zugegeben, wieder durch vorsichtiges Umdrehen des Behälters gemischt, wodurch der pH-Wert neutralisiert wurde, Proteine ausfielen und sich Präzipitate aus großer genomischer DNA bildeten. Diese Lösung wurde dann 10 min bei 20°C und 16.300 *g* (10.000 rpm, GSA-Rotor) zentrifugiert und der Überstand durch doppelt gelegte Gaze auf eine mit 30 ml Puffer E4 äquilibrierte Kieselerde-Säule (Länge 13 cm, ∅ 2,6 cm) gegeben. Nachdem der gesamte Überstand die Säule durchlaufen hatte, wurde einmal mit 60 ml Puffer E5 gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer E6 eluiert. Das Eluat wurde mit 10,5 ml Isopropanol (bei RT, um die Salzpräzipitation zu minimieren) gemischt, 30 min bei 27.000 *g* und 4°C (15.000 rpm, SS34-Rotor) zentrifugiert. Danach wurde das DNA-Sediment mit 70% Ethanol gewaschen, um präzipitierte Salze zu entfernen, unter Vakuum 3 min getrocknet und in einem angemessenen Volumen H_2O (zwischen 150 und 300 µl) aufgenommen.

Um die DNA- und Proteinkonzentration festzustellen, wurde die OD bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein) gemessen. 1 $OD_{260} \approx 50$ µg DNA/ml. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte idealerweise bei 2 liegen.

Die präparierten Plasmide wurden auf richtige Größe und den Anteil an linearisierter DNA einmal unbehandelt und einmal nach einem Restriktionsverdau überprüft.

Puffer E1	50 mM Tris	pH 8,0 mit HCl eingestellt
	10 mM EDTA	E1 mit RNase A wurde bei 4°C aufbewahrt
	100 µg/ ml RNase A	
Puffer E2	200 mM NaOH	
	1% SDS	
Puffer E3	3,1 M Kaliumacetat	pH 5,5 mit Essigsäure eingestellt
Puffer E4	600 mM NaCl	pH 5,0 mit Essigsäure eingestellt
	100 mM Natriumacetat	
	0,15% Triton X-100	
Puffer E5	800 mM NaCl	pH 5,0 mit Essigsäure eingestellt
	100 mM Natriumacetat	
Puffer E6	1,25 M NaCl	pH 8,5 mit HCl eingestellt
	100 mM Tris	

(Herstellerangabe)

Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA

Plasmid-DNA	5 - 10 µl
10 × Puffer (enzymspezifisch)	2 µl
Restriktionsenzym (10 U/µl)	0,5 µl
H_2O	ad 20 µl

Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann mit 3 µl Probenpuffer gemischt und auf einem 1%igen Agarosegel einer Elektrophorese unterworfen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein DNA-Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 45-60 min mit 5 Volt/cm durchgeführt (kürzeste Distanz zwischen beiden Elektroden). Die negativ geladene DNA läuft von der Kathode (-) zur Anode (+). Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Ethidiumbromid

versetzt, das in den DNA-Doppelstrang interkaliert und mit der DNA einen im UV-Licht fluoreszierenden Komplex bildet.

Zur Herstellung des 1%igen Gels wurden 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer aufgekocht bis die Agarose gelöst war. Nach Abkühlen der Lösung unter gelegentlichem Schwenken auf 60°C wurden 2 µl Ethidiumbromid dazu pipettiert und das Gel in die vorbereitete Kammer mit einer Größe von 8 cm x 5 cm x 0,4 cm gegossen. Im vorderen Teil der Kammer war ein Kamm angebracht, durch den die Taschen zum Auftragen der Proben entstanden. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1 x TAE-Puffer gefüllt, so dass das Gel bedeckt war. Die Proben aus dem Restriktionsverdau wurden in die Taschen pipettiert und die Spannung angelegt. Nach ca. 1 h war die Elektrophorese beendet und das Gel konnte auf einem UV-Schirm ausgewertet werden.

Stellte sich nach Analyse des Agarosegels heraus, dass nach dem Restriktionsverdau DNA-Fragmente der richtigen Größe entstanden waren, wurde eine Glycerolkultur der transformierten Bakterien angelegt, die bei -70°C gelagert wurde und mehrere Jahre haltbar ist. Für eine Glycerolkultur werden 500 µl steriles Glycerol mit 500 µl Bakteriensuspension vorsichtig gemischt.

Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid	10 mg/ml

vor Licht geschützt bei 4°C aufbewahrt.

10 × Tris/Acetat/EDTA (TAE)-Puffer

		Endkonzentration
Tris	6,1 g/100 ml	0,5 M
Natriumacetat	1,6 g/100 ml	0,2 M
EDTA	0,7 g/100 ml	0,02 M

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,4 eingestellt und der Puffer autoklaviert.

Probenpuffer

		Endkonzentration
Bromphenolblau	0,01 g/100 ml	0,01%
Glycerol	40 ml/100 ml	40%
10 x TAE-Puffer	10 ml/100 ml	1 x

Der Puffer wurde autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

3.2.4 Transfektion von Hepatozyten mit der Calcium-Phospat-Technik

Viele Protokolle für die Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode zur Transfektion, auch das in dieser Arbeit verwendete, sind eine Modifikation des Protokolls von Graham und Van Der Eb von 1973. Änderungen wurden meistens bei der Kultur der Zellen oder dem Zeitpunkt und der Dauer der Transfektion vorgenommen (Parker und Stark 1979; Chen C und Okayama 1987; Chen C und Okayama 1988; Ginot et al. 1989; Pasco und Fagan 1989; Rippe et al. 1990). Allen liegt zugrunde, dass die in Form von feinkörnigen Calcium-Phosphat-Präzipitaten vorliegende DNA auf die Zellen aufgebracht und von diesen durch Endocytose aufgenommen wird. Das Präzipitat erhält man durch Mischung einer DNA/Calciumchlorid-Lösung mit einer phosphathaltigen Lösung.

Transfektionsansatz für eine Kulturschale (60 mm)

		Endkonzentration
Plasmid-DNA bei Hepatozyten	2,5 µg	
H_2O	ad 67,5 µl	
$CaCl_2$ 2,5 M	7,5 µl	125 mM
2 x Hepes	75 µl	

Der Transfektionsansatz wurde in Polystyrolröhrchen angesetzt, um eine Anheftung der DNA an das Röhrchen zu vermeiden. Nach dem Zusammenpipettieren wurden die Lösungen durch leichtes Schwenken vermischt und dann für 5-10 min bei RT stehengelassen. In dieser Zeit bildete sich das DNA-Calcium-Phosphat-Präzipitat, was durch eine leichte Trübung des Puffers zu beobachten war. Nach der Präzipitatbildung wurde das Gemisch von 150 µl auf 1,5 ml frisch ausplattierte Hepatozytensuspension in 60 mm ∅ Schalen aufgetropft, durch leichtes Schwenken gemischt und im Brutschrank unter 16% O_2 inkubiert.

Bei transfizierten Hepatozyten wurde 5 h nach der Transfektion sowie nach 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt.

2 x Hepes

		Endkonzentration
Hepes	1,192 g/100 ml	50 mM
$NaCl_2$	1,636 g/100 ml	280 mM
Na_2HPO_4	0,267 g /100 ml	1,5 mM

Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH auf 7,05 eingestellt. 10 ml Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt.

Calciumchlorid 2,5 M

		Endkonzentration
$CaCl_2$	36,75 g/100 ml	2,5 M

Die Lösung wurde autoklaviert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

3.2.5 Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Die Bestimmung der mRNA-Menge im Northern Blot erfolgte durch Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden und anschließender Farbreaktion.

Zur Präparation der markierten Sonde musste von dem cDNA-Insert in dem Transkriptionsvektor pSK nach Linearisierung des Vektors und Isolierung des linearisierten Vektors RNA synthetisiert werden. Hierbei wurde das Insert durch den Einbau von Digoxigenin-markiertem Uridininmonophosphat (DIG-UMP) markiert. Nach Isolierung der markierten Transkripte konnten diese für Hybridisierungen eingesetzt werden.

Das Insert in pSKPAI53 wurde von den Promotoren für die T3- und die T7-RNA-Polymerase flankiert. Da die Orientierung des Inserts bekannt war, konnte durch Linearisierung des Plasmids mit dem entsprechenden Restriktionsenzym und anschließender Synthese von RNA ausgehend vom Promotor die antisense Sonde hergestellt werden. Nach der Herstellung der Digoxigenin-markierten Transkripte wurde eine direkte Detektion durchgeführt, um die Markierungseffizienz zu bestimmen.

RNA-Sonde	Größe	Plasmid	RE/RNA-Pol
PAI-1 as	320 bp	pSK/PAI53	*BamH I/T3*

3.2.6 RNA-Isolierung aus primär kultivierten Rattenhepatozyten

Die Isolierung der Gesamt-RNA, die in den Northern Blot eingesetzt werden sollte, erfolgte nach der von Chomczynski und Sacchi 1987 beschriebenen Methode. Nach einer kombinierten Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wurde die RNA aus der wässrigen Phase isoliert und durch wiederholtes Waschen und Präzipitieren in Alkohol gereinigt.

Es wurden 3×10^6 Zellen aus Gewebekulturschalen (∅ = 100 mm) verwendet. Auf die gefrorenen Zellen in den Kulturschalen (3.1.3) wurden 500 µl Guanidiniumthiocyanat-Aufschlusspuffer gegeben. Die Zellen wurden mit einem Gummispatel abgeschabt und mehrfach resuspendiert. Das Homogenat wurde in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt. Es wurden nun nacheinander 50 µl 2 M Natriumacetat (pH 4,1), 500 µl H_2O-gesättigtes

Phenol und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 49:1) hinzugegeben, wobei nach jeder Zugabe gründlich gemischt wurde. Am Ende wurde der Ansatz erneut gemischt (10 s), 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 8.000 *g* und 4°C im SS34 Rotor zentrifugiert. Die wässrige Oberphase, die die RNA enthielt, wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Cup überführt und mit 1 ml Isopropanol versetzt. Die RNA wurde 1 h bei -20°C gefällt. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 8.000 *g* und 4°C im SS34 Rotor wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag in 300 µl Guanidiniumthiocyanat-Aufschlusspuffer gelöst. Es wurden 300 µl Isopropanol hinzupipettiert und die RNA erneut 1 h bei -20°C gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 8.000 *g* im SS34-Rotor wurde der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde einmal in 300 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) resuspendiert, wobei er sich nicht vollständig löste. Er wurde durch 10 min Zentrifugation wiedergewonnen. Danach wurde die RNA im Niederschlag in 300 µl DEPC-H_2O gelöst und durch Zugabe von 600 µl absoluten Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Durch erneute 10 min Zentrifugation bei 8.000 *g* im SS34-Rotor wurde der Niederschlag wiedergewonnen und einmal mit 200 µl 80% Ethanol gewaschen, wobei die RNA durch 10 min Zentrifugation bei 8.000 *g* im SS34-Rotor zurückerhalten wurde. Die gereinigte RNA wurde in der Vakuumzentrifuge bei 37°C 3 min getrocknet, anschließend in 40 µl 0,1% SDS aufgenommen und 10 min bei 65°C gelöst. Nach Konzentrationsbestimmung und elektrophoretischer Kontrolle wurde die RNA bei -20°C gelagert.

Um die Reinheit der RNA zu bestimmen, wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht 40 µg RNA/ml. Der Quotient aus der OD bei 260 nm und bei 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der RNA. Bei einer proteinfreien RNA-Lösung ist der Quotient 2. Mögliche Verunreinigungen durch Proteine verkleinern den Quotienten. In der Regel lag er über 1,7.

Lösungen für die RNA-Isolierung

Alle Lösungen für RNA-Versuche wurden mit DEPC-H_2O angesetzt. Zu Millipore-Wasser wurde DEPC hinzugegeben und über Nacht stehengelassen. Dadurch erfolgte die Inaktivierung von RNasen. Anschließend wurde das Wasser autoklaviert.

Phenol (H_2O gesättigt)

2/3 Volumen Phenol wurden in der Wärme mit 1/3 Volumen H_2O vermischt. Nach der Phasentrennung wurde die Lösung bei 4°C in einem lichtgeschützten Gefäß aufbewahrt.

Aufschlusspuffer

		Endkonzentration
Guanidiniumthiocyanat	47,3 g	4 M
Na-Citrat	2,5 ml einer 1 M Lsg.	25 mM
N-Lauroylsarcosin	0,5 g	17 mM
2-Mercaptoethanol	0,7 ml	0,1 M
30%iges Antifoam A	0,33 ml	0,1%
DEPC-H_2O	ad 100 ml	

Die Lösung wurde für 30 min auf 65°C erwärmt. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt. 2-Mercaptoethanol wurde zum Schluss hinzupipettiert.

3.2.7 Quantifizierung von mRNA durch Northern-Blot-Analyse

Dieses Verfahren dient zur Analyse von RNA. Die RNA wird in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, anschließend durch Kapillartransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Vakuumblot) und durch UV-Crosslinking fixiert. Durch die darauffolgende Hybridisierung mit spezifischen Sonden wird die RNA von Interesse identifiziert (Abb. 8).

Bei diesem Verfahren ist darauf zu achten, dass nur autoklavierte Lösungen verwendet wurden, und dass die Elektrophorese- und Blotkammern vorher mit 3%igem H_2O_2 behandelt wurden, um RNasen zu inaktivieren.

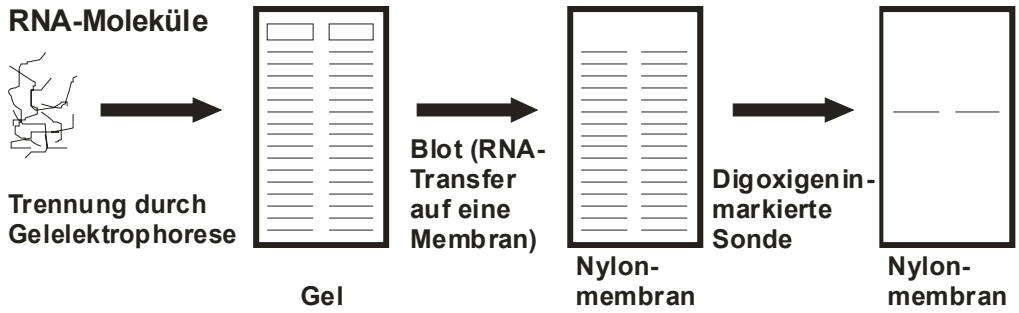

Abb. 8: **Prinzip des Northern Blots.** Nachdem die RNA-Fragmente durch denaturierende Agarosegelelektrophorese getrennt worden sind, werden die verschiedenen vorhandenen RNA-Moleküle auf eine Nylonmembran übertragen. Durch Hybridisierung der RNA-Moleküle auf der Nylonmembran mit Digoxigenin-markierten, spezifischen Sonden, anschließender Lumineszenzreaktion und Auflegen eines Films werden die Banden der RNA von Interesse nachgewiesen.

Denaturierung der RNA

Der Standardansatz enthielt in der Regel 15-40 µg RNA. Danach wurde 16,5 µl Ladungs-Puffer hinzu pipettiert und die Probe bei 68°C für 30 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben 2 min auf Eis inkubiert und mit 5 µl Proben-Puffer für RNA versetzt.

Ladungs-Puffer

		Endkonzentration
Formamid	15 ml	66,6%
14,3 x MOPS	2,1 ml	26,7 mM
37%ig Formaldehyd	5,4 ml	8,9%

Der Puffer wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

MOPS 14,3x

		Endkonzentration
MOPS	5,93 g	286 mM
NaAc	0,58 g	7,1 mM
EDTA	0,5 g	1,3 mM
DEPC-H_2O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

Proben-Puffer

		Endkonzentration
Glycerin	5 ml	50%
0,5 M EDTA	20 µl	1 mM
Bromphenolblau	10 mg	0,1%
DEPC-H_2O	ad 10 ml	

Der Puffer wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Elektrophoresebedingungen

Das denaturierende Agarosegel wurde in der Gelkammer mit 1x MOPS-Puffer überschichtet (ca. 900 ml). Nachdem die Proben in die Geltaschen pipettiert waren, wurde eine Spannung von 100 Volt für 2 h angelegt.

Um die RNA zu denaturieren, wurde dem Gel Formaldehyd zugesetzt (Lehrach et al. 1977). Zur Herstellung eines 1,5%igen Gels wurden 0,9 g Agarose in 49 ml DEPC-H_2O

erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurden 6 ml 10x MOPS und 5 ml Formaldehyd hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurde das Gel in den vorbereiteten Gelträger gegossen. Der Gelträger (Größe: 10 x 14 cm) mit den Taschenformern für die Geltaschen (Größe einer Geltasche: 4 mm; Anzahl der Taschen: 16) wurde vorher für mindestens 1 h in der Kammer mit 3%iger H_2O_2-Lösung RNase-frei gemacht.

MOPS 10x

		Endkonzentration
MOPS	41,9 g	200 mM
NaAc	4,1 g	50 mM
EDTA	3,7 g	10 mM
DEPC-H_2O	ad 1 l	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

Visualisierung der RNA mit Ethidiumbromid

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für 20 min in 150 ml einer 1%igen Glycinlösung geschwenkt, um das Formaldehyd auszuwaschen. 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (s. 3.1.3) wurden zugesetzt und für 5 min inkubiert. Ethidiumbromid bildet mit RNA Komplexe. Im UV-Licht (254 nm) fluoresziert das Ethidiumbromid, wodurch die RNA im Gel sichtbar gemacht wurde. Es werden zwei Hauptbanden sichtbar, die die 28S- und 18S-ribosomale RNA darstellen. Das Gel wurde mit Hilfe einer Video-Kamera fotografiert. Anschließend wurde das Gel zur alkalischen Hydrolyse der RNA 1 h in 50 mM NaOH/10 mM NaCl geschwenkt.

Transfer der RNA auf Nylonmembran

Die im Gel aufgetrennte RNA wurde nun durch Vakuumblotten auf eine Nylonmembran übertragen. Hierzu wurde eine Nylonmembran (10 x 15 cm) mit 2x SSC befeuchtet. Die Transferapparatur wurde folgendermaßen aufgebaut (Abb. 9). Ein mit Transferpuffer (20x SSC) gesättigtes 3 mm starkes Filterpapier, auf dem sich die Nylonmembran befand, wurde auf die Vakuumkammer gelegt. Darüber wurde eine Gummimatte mit entsprechender Aussparung so gelegt, dass sich kein Freiraum zwischen Membran und Gummimatte ergab.

Der Transferpuffer wurde in die Kammer gegeben, das Gel luftblasenfrei aufgelegt und an die Kammer ein Vakuum angelegt. Durch die nach unten gerichteten Kapillarkräfte wurde die RNA auf die Nylonmembran übertragen. Der Transfer wurde 1-2 h durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die RNA durch 2 min UV-Crosslinking auf der Nylonmembran fixiert. Zur Kontrolle, ob die RNA vollständig transferiert war, wurde das Gel nach dem Transfer erneut unter UV-Licht betrachtet.

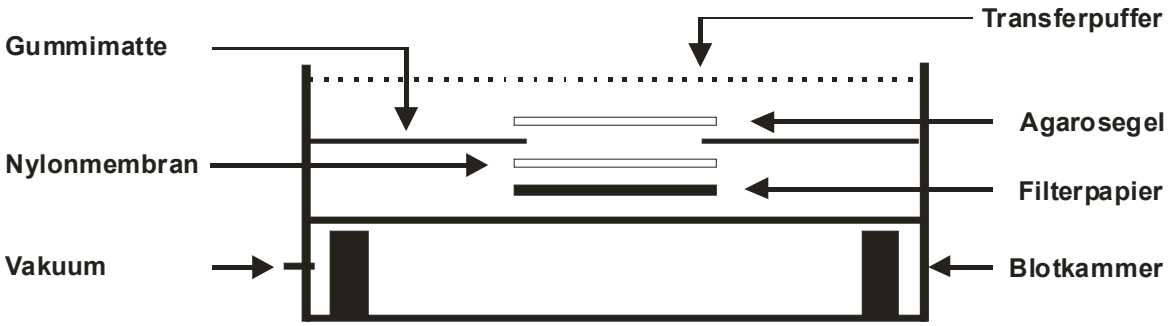

Abb. 9: **Aufbau eines Vakuum Northern Blots.**

Hybridisierung der RNA mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Mit Hilfe spezifischer Sonden kann die gewünschte RNA identifiziert werden. Es wurden Digoxigenin-markierte Antisense-RNA-Sonden verwendet.

Die Nylonmembran wurde zur Vorhybridisierung, die der Sättigung unspezifischer Bindungsstellen diente, in ein Hybridisierungsröhrchen überführt. Die Vorhybridisierung erfolgte für 1 h mit 10 ml Vorhybridisierungslösung bei 68°C im Hybridisierungsofen. Anschließend wurde die Lösung gegen 6 ml Hybridisierungslösung ausgetauscht, die 100 ng Sonde (Digoxigenin-markierte Antisense-RNA) enthielt, und über Nacht bei 68°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Die darauffolgenden Waschschritte erfolgten unter stringenten Bedingungen, um die nichthybridisierte Sonde zu entfernen und instabile Hybride zu schmelzen. Es wurden nacheinander 2 x 5 min in 2x SSC/0,1% SDS und 2 x 15 min in 0,1x SSC/0,1% SDS bei 65°C gewaschen (Posthybridisierung).

Vorhybridisierungs- bzw. Hybridisierungslösung

		Endkonzentration
Deionisiertes Formamid	12,5 ml	50%
10% Blockingreagenz	6 ml	2,5%
20% SDS	25 µl	0,02%
10% N-Lauroylsarcosin	250 µl	0,1%
20x SSC	6,25 ml	5 x

Die Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

Detektion und Quantifizierung

Die Detektion der Digoxigenin-markierten Hybride erfolgte über die Bindung eines Antikörpers gegen Digoxigenin, an den die alkalische Phosphatase gekoppelt war (Enzym-Immunoassay). Bei der nachfolgenden Dephosphorylierung von Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2-(5´-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)-phenylphosphat (CSPD) durch alkalische Phosphatase entstand eine metastabile Verbindung, welche beim Zerfall Licht einer Wellenlänge von 477 nm emittierte. Durch Auflegen eines Films konnte dieses Lumineszenz-Lichtsignal sichtbar gemacht werden. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch.

Die Detektion und Anfärbung wurde mit dem DIG-Nucleic-Acid Detection Kit der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Zunächst wurde die Nylonmembran kurz (1 min) in 1x Maleinsäurepuffer geschwenkt. Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde sie für 30 min in 100 ml 1% Blockingreagenz (10% Blockingreagenz mit 1x Maleinsäurepuffer auf 1% verdünnt) inkubiert. Anschließend wurde die Nylonmembran für 30 min in 20-30 ml verdünnter Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugat in 1% Blockingreagenz auf 75 mU/ml = 1:10.000 verdünnen = 2-3 µl Antikörper-Lösung in 20-30 ml 1% Blockingreagenz) bei RT inkubiert. Ungebundenes Antikörperkonjugat wurde anschließend durch 2 x 15 min Waschen in Maleinsäurepuffer entfernt. Nach 2 min Äquilibrierung in Puffer 3 wurde die Nylonmembran in Frischhaltefolie gelegt und 5 min mit verdünnter CSPD-Lösung (CSPD in Puffer 3 auf 25 mM = 1:100 = 10 µl CSPD in 1 ml Puffer 3) inkubiert. Die Flüssigkeit wurde mit Hilfe eines Glasstabs entfernt, die Membran eingeschweißt und zur Erhöhung der Lumineszenzreaktion für 10 min bei 37°C in einer Filmkassette inkubiert. Danach wurde für 1-1,5 h ein Film aufgelegt, der densitometrisch ausgewertet werden konnte.

Zur Quantifizierung der RNA-Banden auf der Nylonmembran diente das Videodensitometer der Firma Biotec-Fischer.

Puffer 1 (Maleinsäurepuffer) 1x

		Endkonzentration
Maleinsäure	11,61 g	0,1 M
NaCl	8,78 g	0,15 M
H_2O	ad 1 l	

Der pH-Wert von 7,5 wurde mit fester NaOH eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

Puffer 3

		Endkonzentration
Tris	12,11g	0,1 M
NaCl	5,84 g	0,1 M
$MgCl_2$	10,17 g	50 mM
H_2O	ad 1 l	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 9,5 eingestellt.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe wurde 1 µl des Mediums (s. 3.1.3) in den Ansatz von 1,1 ml eingesetzt. Für den Leerwert wurden 100 µl H_2O + 1000 µl Reagenz verwendet. Nach der Zugabe des Bradford-Reagenzes wurde der Ansatz ohne Schäumen gut gemischt. Nach 10 bis höchstens 60 min bei RT wurde die OD bei 595 nm gemessen; mit dem Leerwert wurde gegen Null abgeglichen.

Mit Rinderserumalbumin wurde eine Eichgerade von 0 bis 6 µg Protein erstellt. Die Eichgerade war bis 6 µg Protein linear.

Ansatz für die Proteinbestimmung :

Medium M 199 von den Inkubationsplatten	1 µl
oder Stammlösung BSA (1 µg/µl)	1; 2; 4; 6 µl
H_2O	ad 100 µl
Bradford-Reagenz	1 ml

Bradford-Reagenz:

Serva Blau (No. 35050)	100 mg
Ethanol (95%)	50 ml
Phosphorsäure (85%)	100 ml

ad 1 l mit H_2O.

3.3.2 Western-Blot-Analyse

Im Western Immuno Blot werden auf einen NC-Filter geblottete Proteine direkt über Antikörper-Bindung nachgewiesen. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper folgt eine Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, der den Primärantikörper erkennt. Die Bindung der Antikörper an die Proteine wird dann durch die Peroxidase-Reaktion sichtbar gemacht.

Vorbereitung der Proteine für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

50 µg Protein wurde auf ein Volumen von 10 µl eingedampft, mit 7 µl Probenpuffer für 5 min bei 95°C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt.

Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen

In der eindimensionalen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen, also in der Gegenwart von SDS, wandern Proteine umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte durch die Polyacrylamid-Matrix zur Anode. Das negativ geladene SDS lagert sich bevorzugt an die positiv geladenen Aminosäurereste in den Proteinen an, aber auch an die hydrophoben Seitenketten, so dass nach SDS-Behandlung alle Proteine negativ geladen sind. Um die Proteine mit SDS zu umhüllen, werden sie vor dem Auftrag auf das Gel mit SDS gekocht. Zusätzlich wird Mercaptoethanol zugegeben, wodurch Disulfidbrücken reduziert werden und die Untereinheiten der Proteine sich voneinander trennen. Eine besonders gute Auftrennung der Proteine mit klar abgegrenzten Banden bekommt man mit der diskontinuierlichen Elektrophorese. Dabei werden Proteine erst in einem Sammelgel konzentriert, ehe sie im Trenngel aufgetrennt werden. Die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel kommt durch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Cl^--Ionen des Sammelgels und der Glycinat-Ionen des Laufpuffers zustande. Legt man eine Spannung an, so entsteht zwischen der Wanderungsfront der schnellen Cl^--Ionen und der langsamen Glycinat-Ionen eine Ionenverdünnte Zone mit geringerer Leitfähigkeit, was zum Ansteigen der Feldstärke führt. Der Anstieg der Feldstärke führt zu einer beschleunigten Wanderung der Glycinat-Ionen. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei dem die geringere Glycinat-Ionenbeweglichkeit durch die damit verbundene höhere Feldstärke kompensiert wird. Die Proteine im Sammelgel haben eine Wanderungsgeschwindigkeit, die zwischen der der Glycinat- und Cl^--Ionen liegt; sie werden deswegen im Bereich der hohen Feldstärke sehr scharf konzentriert. Durch den pH-Sprung zwischen Trenn- und Sammelgel (pH 6,8-8,8) wird die Konzentrierung aufgehoben, da die Glycinat-Ionen bei pH 8,8 die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit haben wie die Cl^--Ionen. Im Trenngel werden die Proteine

dann umgekehrt proportional zu ihrer Größe aufgetrennt, da die Poren des Gels für größere Proteine einen größeren Bewegungswiderstand darstellen.

Sammelgelpuffer

	Endkonzentration
7,2 g Tris/100 ml, pH 6,8	0,6 M

Trenngelpuffer

	Endkonzentration
22,7 g Tris/100 ml, pH 8,8	1,875 M

Nach dem Ansetzen wurden die Puffer sterilfiltriert.

Laufpuffer

	Endkonzentration
6 g Tris/l	50 mM
29 g Glycin/l	384 mM
10 ml 10% SDS/l	0,1%

Probenpuffer

	Endkonzentration
1 ml 0,6 M Tris, pH 6,8/10 ml	4%
4 ml 10% SDS/10 ml	1%
1 ml Glycerol	10%
1 Tropfen Bromphenolblau	≈ 1%

Vor Gebrauch wurde 5% Mercaptoethanol zugegeben.

SDS-Minigel (85 mm x 90 mm x 0,8 mm)

	Trenngel (10%iges Gel)	Sammelgel (5%iges Gel)
Acryl-/ Bisacrylamid	2,33 ml	0,3 ml
Trenngelpuffer	1,462 ml	-
Sammelgelpuffer	-	0,18 ml
H_2O	3,05 ml	1,293 ml
SDS	69 µl 10% Stlsg.	18 µl
TEMED	2,2 µl	1,8 µl
APS	34,5 µl 10% Stlsg.	9 µl

Nach der Zugabe von TEMED und APS muss das Gel kurz gerührt werden, damit die Polymerisation gleichmäßig verläuft.

Präparation eines SDS-Minigels und Durchführung der Elektrophorese:

Zuerst wurde auf die Glasplatte mit den Abstandhaltern (”Spacer”) die Gummidichtung und dann die Ohrenplatte gelegt; beides wurde mit 2 Klammern zusammengeklemmt und hingestellt. Das Trenngel wurde gleich nach Zugabe von TEMED und APS zwischen die Platten gegossen und vorsichtig mit H_2O überschichtet, damit das Gel nicht austrocknet und ein gerader Rand entsteht. Das Polymerisieren dauerte etwa 45 min bei RT. Danach wurde das H_2O abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. In das Sammelgel wurde sofort nach dem Gießen ein Kamm gesteckt, dessen Zähne die Taschen zum späteren Auftragen der Proben bildeten. Nachdem auch das Sammelgel fest war, wurden die Klammern und die Gummidichtung entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingebaut. Der Laufpuffer wurde in die Kammer eingefüllt und die Proben aufgetragen. Während der ersten 15 min, in denen die Proteine im Sammelgel konzentriert wurden, lief die Elektrophorese bei 10 mA. Danach wurden die Proteine noch 1 h bei 20 mA nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach Ende des Laufs wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, das Sammelgel abgetrennt und verworfen.

Blotten der Proteine auf Nitrocellulose (NC)

Das Übertragen der Proteine aus dem Gel auf NC erfolgte durch Elektrotransfer. Hierfür wurde das Gel für 20 min in Kathodenpuffer geschwenkt und die auf passende Größe zurechtgeschnittene NC kurz in H_2O und dann für 10 min in Anodenpuffer 2 inkubiert. Whatmanpapier wurde auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Das Papier wurde in Kathodenpuffer, Anodenpuffer 1 oder 2 getränkt. Danach wurde der Western Blot aufgebaut (Abb. 10). Kathode und Anode der Apparatur bestehen aus zwei

plastikumhüllten Graphitplatten. Der Gesamtaufbau wurde mit einem Gewicht (1 kg) beschwert und der Transfer schließlich mit 1 mA/cm^2 Filterfläche durchgeführt. Nach einer Transferzeit von 50-70 min waren die Proteine zum größten Teil aus dem Gel auf die Nitrocellulose gewandert. (Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen, wurde das Gel nach dem Blot mit Coomassie-Blue angefärbt. Meistens waren von den Proteinen noch geringfügige Reste im Gel geblieben). Die Proteine auf der NC wurden mit Ponceau S angefärbt, dann wurde eine Fotokopie des Blots angefertigt und die NC durch kurzes Schwenken in TBS wieder entfärbt. Nach dem Entfärben wurde der Blot 1-3 h in Blockierungspuffer inkubiert.

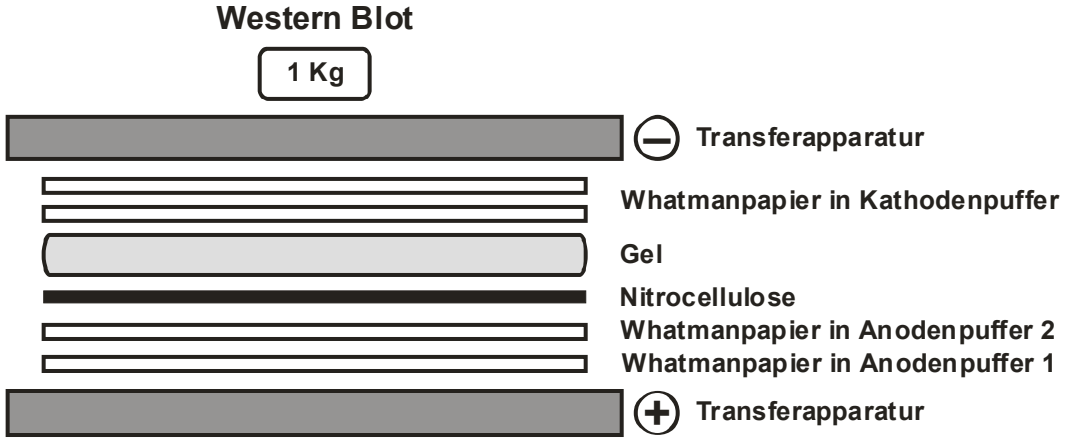

Abb. 10: **Schematischer Aufbau eines Western Blots.**

		Endkonzentration
Anodenpuffer 1	18,2 g Tris/500 ml, pH 11,3 (mit 2 M Borat)	300 mM
	100 ml Methanol/500 ml	20%
Anodenpuffer 2	1,5 g Tris/ 500 ml, pH 10,6	25 mM
	100 ml Methanol/500 ml	20%
Kathodenpuffer	1,5 g Tris/ 500 ml, pH 9	25 mM
	100 ml Methanol/500 ml	20%

<u>Ponceau S</u>

		Endkonzentration
Ponceau S (Sigma P-3504)	1,25 g/500 ml	
Methanol	200 ml/500 ml	40%
Essigsäure (konz.)	75 ml/500 ml	15%

Entfärber (TBS)

		Endkonzentration
Tris	3,6 g/l, pH 7,8	30 mM
NaCl	17,5 g/l	300 mM

Coomassie-Färbelösung

		Endkonzentration
Coomassie Blue G250	2,5 ml/l	0,25% (v/v)
Methanol	400 ml/l	40% (v/v)
Essigsäure (konz.)	100 ml/l	10% (v/v)
Glycerin	20 ml/l	2% (v/v)

Inkubation des "Blots" mit Antikörpern

Die Blockierungsreaktion erfolgte bei 37°C für 30 min. Danach erfolgte die Bindungsreaktion mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Der eingesetzte primäre Kaninchen-IgG-Antikörper gegen Ratten-PAI-1 wurde auf 1:100 (1 µl/ml) mit der Blockierungslösung verdünnt. Die Antikörper-Lösung wurde nach der Reaktion bei -20°C aufbewahrt und bis zu 3 mal wieder benutzt. Der NC-Filter wurde nach dieser ersten Inkubation 6 mal für 5 min mit dem Blockierungspuffer (ohne Milchpulver) gewaschen. Dann erfolgte für 1 h die Inkubation bei 37°C mit dem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (1:2000 verdünnt). Der eingesetzte Sekundärantikörper war ein Anti-Kaninchen-Immunglobulin-G. Abschließend wurde der Filter, wie nach dem Primärantikörper, noch 6 mal gewaschen.

Blockierungspuffer

		Endkonzentration
1 M Tris, pH 7,5	1 ml /100 ml	10 mM
5 M NaCl	2 ml/100 ml	100 mM
Tween 20	0,3 ml/100ml	0,1%
Milchpulver	10 g/100 ml	10%

Das Milchpulver soll unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Proteine abblocken.

Nachweis der gebundenen Antikörper durch die Peroxidase-Reaktion

Der gebundene Zweit-Antikörper war Peroxidase-gekoppelt. Die Peroxidase-Reaktion wurde mit dem ECL (Enhanced Chemiluminescence) Kit der Firma Amersham durchgeführt. Das Substrat war in diesem Fall Luminol, das in Gegenwart von H_2O_2 durch die Peroxidase oxidiert wurde. Durch die Oxidation befand sich das Luminol in einem angeregten Zustand, durch Emission von Licht wurde nach einer gewissen Zeit wieder der Grundzustand erreicht.

Nach dem letzten Waschen wurde 1 ml der 1:1 gemischten Reagenzien des Kits auf den auf einer Frischhaltefolie liegenden Filter (ca. 50 cm^2) gegeben. Der überstehende Rest der Folie wurde jetzt möglichst faltenfrei auf den benetzten Filter gelegt, wodurch sich die Flüssigkeit gleichmäßig verteilt. Nach 1 min wurde überschüssige Flüssigkeit durch Rollern mit einer Glaspipette entfernt und sofort ein Film aufgelegt. Der Film wurde nach 2,5 bis 7 min Exposition entwickelt.

3.3.3 Luciferase-Nachweis

Grundlage des Luciferase-Tests ist die enzymkatalysierte Chemilumineszenz.

Der verwendete Luciferase Assay Kit der Firma Berthold (Pforzheim) ermöglicht den Nachweis von Luciferase aus der nordamerikanischen Feuerfliege (Photinus pyralis) in transfizierten Zellen. Dabei wird Luciferin in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Magnesiumionen durch die Luciferaseeinwirkung oxidiert. Diese Reaktion liefert Licht der Wellenlänge von 562 nm. Die Lichtintensität kann mit einem Luminometer gemessen werden.

20 µl des Überstandes aus den transfizierten Zellen wurden im Luminometer automatisch mit 100 µl Luciferase Assay Reagenz injiziert, welches unmittelbar vor der Messung zu gleichen Teilen aus Substanz A und B - auf Raumtemperatur erwärmt - gemischt wurde. Die Reaktion wurde 10 x 2 s gemessen. Die Lichtintensität ist über 20 s nahezu konstant und nimmt dann mit einer Halbwertszeit von 5 min ab. Vom Hersteller wurden keine Angaben über die Zusammensetzung der Substanzen gemacht.

3.4 Sicherheitsmaßnahmen

Die Arbeiten mit genetisch veränderten Organismen und Plasmid-DNA wurden gemäß dem Gentechnikgesetz von 1990 und den Richtlinien der Gentechnik-Sicherheitsverordnung von 1990 durchgeführt. Mit Bakterien kontaminierte Gegenstände wurden mit Wasserstoffperoxid und Seifenlauge behandelt und anschließend sterilisiert.

Die Chemikalien Formaldehyd, DEPC, Phenol und Ethidiumbromid gelten als karzinogen und wurden dementsprechend vorsichtig gehandhabt und entsorgt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Modulation der PAI-1-Genexpression durch Insulin und pO_2 in primären Rattenhepatozyten

In kultivierten primären Rattenhepatozyten wurde der Einfluss von Insulin auf die PAI-1-mRNA-Expression unter arteriellem pO_2 (16% O_2) und venösem pO_2 (8% O_2) mittels Northern Blot und die Expression des PAI-1-Proteins mittels Western-Blot-Analysen untersucht.

4.1.1 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Insulin unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten

Der Einfluss von Insulin auf die PAI-1-mRNA-Expression wurde untersucht, nachdem in 24 h kultivierten primären Rattenhepatozyten unter 16% O_2 nach einem Mediumwechsel die Insulinkonzentration auf 5 nM erhöht wurde. Die Zellen wurden anschließend für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h unter 16% O_2 weiter kultiviert. Nach Ernte der Zellen und RNA-Isolierung wurde diese im Northern Blot mit DIG-markierten Antisense-RNA-Sonden (PAI-1 und β-Actin) analysiert.

Die PAI-1-mRNA-Expression wurde nach 2 h Inkubation mit 5 nM Insulin auf das 2,5-fache im Vergleich zu der Kontrolle ohne Insulin erhöht. Nach einer Inkubation von 4 h konnte eine weitere Steigerung der Expression auf das 4,5-fache im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Nach 6 h Inkubation sank die PAI-1-mRNA-Expression auf das 4-fache, nach weiteren 2 h auf das 3-fache ab. Nach 24 h Inkubationsdauer unter 16% O_2 und 5 nM Insulin war keine signifikante Induktion der PAI-1-mRNA im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten (Abb. 11).

4.1.2 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Insulin unter venösem pO_2 (8% O_2) in primären Rattenhepatozyten

Der Einfluss von Insulin und venösem pO_2 (8% O_2) auf die PAI-1-mRNA-Expression wurde untersucht, indem bei 24 h kultivierten primären Rattenhepatozyten unter 16% O_2 nach einem Mediumwechsel die Insulinkonzentration auf 5 nM erhöht wurde. Die Zellen wurden anschließend für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h unter 8% O_2 weiter kultiviert. Nach Ernte der Zellen und RNA-Isolierung wurde diese im Northern Blot mit DIG-markierten Antisense-RNA-Sonden (PAI-1 und β-Actin) analysiert.

Die PAI-1-mRNA-Expression in den Zellen ohne Hormonzusatz wurde durch 8% O_2 nach 2 h auf das 3-fache erhöht. Insulin erhöhte die PAI-1-mRNA-Expression nach 2 h Inkubationszeit mit 5 nM Insulin unter 8% O_2 auf das 5,5-fache im Vergleich zu der

Kontrolle ohne Insulin unter 16% O_2. Nach einer Inkubationszeit von 4 h konnte eine weitere Steigerung der Expression auf das 7-fache festgestellt werden. Die Induktion der PAI-1-mRNA-Expression sank wieder auf das 6- bzw. 5-fache nach einer Inkubationsdauer von 6 h und 8 h. Nach 24 h Inkubationsdauer konnte keine signifikante Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Insulin festgestellt werden (Abb. 11).

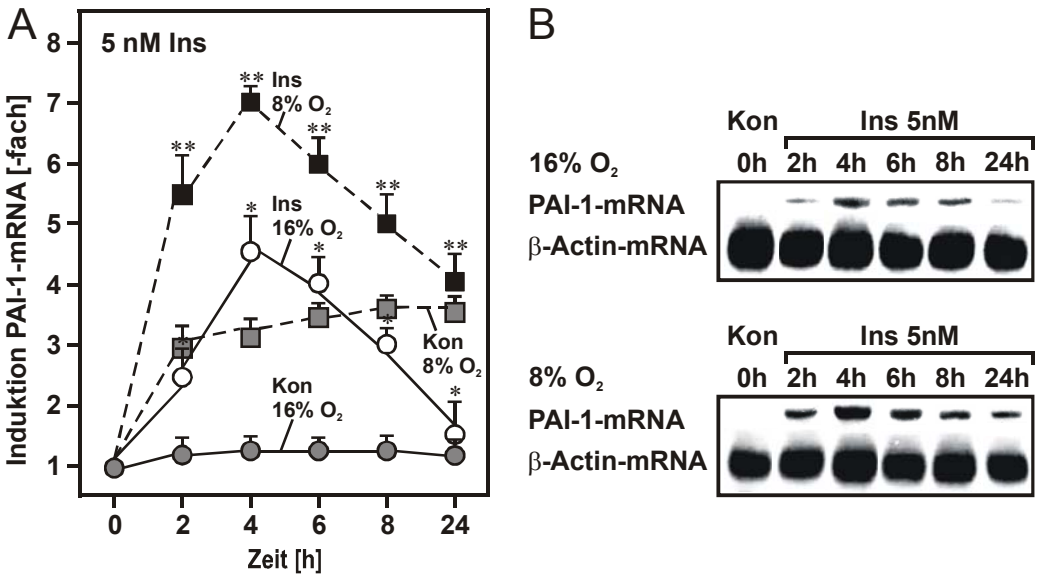

Abb. 11: **Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Insulin in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2.** Primäre Rattenhepatozyten wurden für 24 h unter arteriellem pO_2 (16% O_2) kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h in Gegenwart von 5 nM Insulin unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 weiter kultiviert. (A) In jedem Experiment wurde die im Northern Blot gemessene mRNA-Menge unter 16% O_2 ohne Insulin 100% gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student´s t-Test für gepaarte Werte, $p \leq 0{,}05$; * signifikante Differenz 16% O_2 (Kontrolle) vs. 16% O_2 + Insulin; ** signifikante Differenz 16% O_2 (Kontrolle) vs. 8% O_2 + Insulin, $p \leq 0{,}05$. (B) Northern Blot. Bei der Northern-Blot-Analyse wurden 40 µg Gesamt-RNA kultivierter Rattenhepatozyten mit DIG-markierter Antisense-PAI-1-RNA-Sonde oder Antisense-β-Actin-RNA-Sonde hybridisiert. Die Chemilumineszenz-Signale wurden mittels Videodensitometrie quantifiziert. Ins: Insulin; Kon: Kontrolle.

4.1.3 Induktion des PAI-1-Proteins durch Insulin in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2

Zur Untersuchung der Induktion des PAI-1-Proteins durch Insulin und O_2 wurden kultivierte Rattenhepatozyten mit 5 nM Insulin stimuliert und für 24 h unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 inkubiert. Proteinspiegel wurden im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen das PAI-1-Protein der Ratte gemessen.

Nach 24 h Inkubation unter 8% O_2 war die PAI-1-Proteinmenge 3-fach höher als bei den Kontrollen unter 16% O_2. Insulin steigerte die PAI-1-Proteinexpression unter 16% O_2 auf das 4-fache während unter 8% O_2 eine Expressionsinduktion auf das 5-fache beobachtet

werden konnte. Diese Ergebnisse auf Proteinebene stehen im Einklang mit der Induktion der PAI-1-mRNA durch Insulin sowohl bei 16% als auch 8% O_2 (Abb. 12).

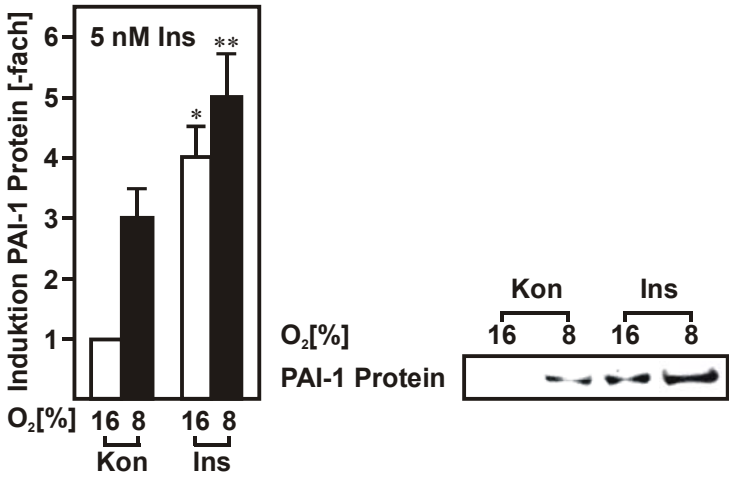

Abb. 12: **Induktion der PAI-1-Proteinexpression durch Insulin in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2.** Primäre Rattenhepatozyten wurden für 24 h unter arteriellem (16% O_2) pO_2 kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 h in Gegenwart von 5 nM Insulin unter arteriellem (16% O_2) und venösem pO_2 (8% O_2) weiter kultiviert. Von den Zellkulturen wurde 1 ml Medium für die Proteinbestimmung gewonnen und 50 μg im Western Blot mit einem Antikörper aus Kaninchen gegen Ratten-PAI-1-Protein (American Diagnostics, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). Die für PAI-1 spezifischen Banden liegen bei 49 kDa (Hauptbande) und 46 kDa; ∗ signifikante Differenz Kontrolle 16% O_2 vs. 16% O_2 + Insulin; ∗∗ signifikante Differenz Kontrolle 8% O_2 vs. 8% O_2 + Insulin, $p \leq 0{,}05$. Ins: Insulin; Kon: Kontrolle.

4.2 Modulation der PAI-1-Genexpression durch Glucagon und pO_2 in primären Rattenhepatozyten

In kultivierten primären Rattenhepatozyten wurde der Einfluss von Glucagon auf die PAI-1-mRNA-Expression unter arteriellem pO_2 (16% O_2) und venösem pO_2 (8% O_2) mittels Northern Blot und die Expression des PAI-1-Proteins mittels Western-Blot-Analysen untersucht.

4.2.1 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Glucagon unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten

Der Einfluss von Glucagon auf die PAI-1-mRNA-Expression unter arteriellem pO_2 (16% O_2) wurde in 24 h kultivierten primären Rattenhepatozyten untersucht, nachdem die Zellen mit 5 nM Glucagon stimuliert wurden. Die Zellen wurden anschließend für 2 h, 4 h und 6 h unter 16% O_2 weiter kultiviert. Nach Ernte der Zellen und RNA-Isolierung wurde diese im Northern Blot mit DIG-markierten Antisense-RNA-Sonden (PAI-1 und β-Actin) analysiert.

Die PAI-1-mRNA-Expression wurde nach 2 h Inkubation mit 5 nM Glucagon unter arteriellem pO_2 (16% O_2) auf das 4-fache im Vergleich zu der Kontrolle ohne Glucagon erhöht. Nach einer Inkubation von 4 h konnte eine weitere Steigerung der Expression auf das 5-fache festgestellt werden. Die Induktion der PAI-1-mRNA-Expression war transient und sank wieder auf das 4-fache nach einer Inkubationsdauer von 6 h mit 5 nM Glucagon im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 13).

4.2.2 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Glucagon unter venösem pO_2 (8% O_2) in primären Rattenhepatozyten

Der Einfluss von Glucagon auf die PAI-1-mRNA-Expression unter venösem pO_2 (8% O_2) wurde in 24 h kultivierten primären Rattenhepatozyten untersucht nachdem die Zellen mit 5 nM Glucagon stimuliert wurden. Die Zellen wurden anschließend für 2 h, 4 h und 6 h unter venösem pO_2 (8% O_2) weiter kultiviert. Nach Ernte der Zellen und RNA-Isolierung wurde diese im Northern Blot mit DIG-markierten Antisense-RNA-Sonden (PAI-1 und β-Actin) analysiert.

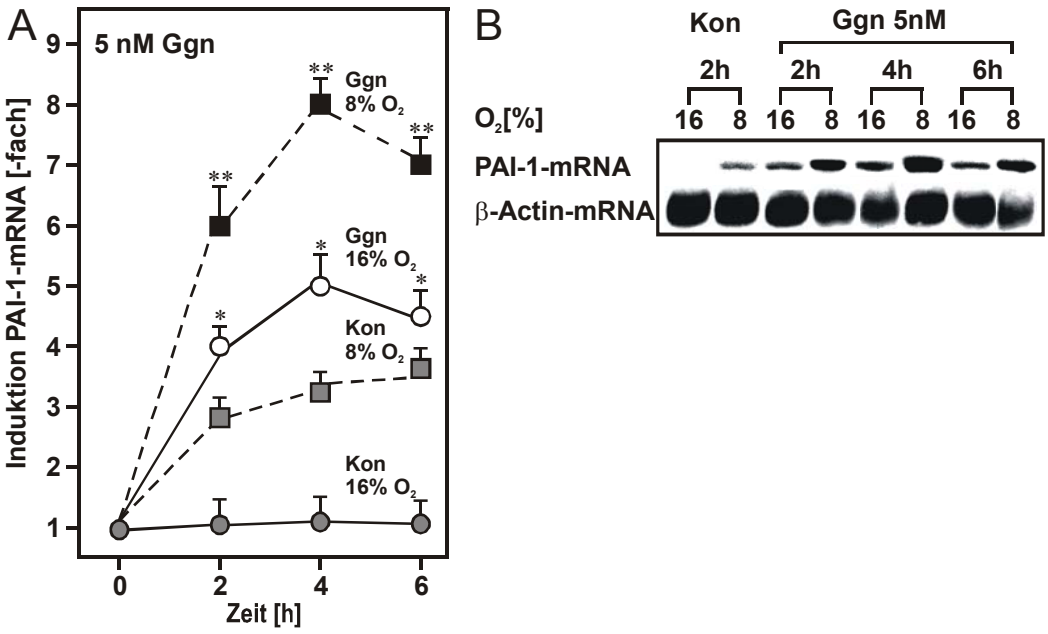

Abb. 13: **Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch Glucagon in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2.** Primäre Rattenhepatozyten wurden für 24 h unter arteriellem pO_2 (16% O_2) kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 2 h, 4 h und 6 h in Gegenwart von 5 nM Glucagon unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 weiter kultiviert. (A) In jedem Experiment wurde die im Northern Blot gemessene mRNA-Menge unter 16% O_2 ohne Glucagon 100% gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student´s t-Test für gepaarte Werte, $p \leq 0{,}05$; * signifikante Differenz Kontrolle 16% O_2 vs. 16% O_2 + Glucagon; ** signifikante Differenz Kontrolle 8% O_2 vs. 8% O_2 + Glucagon, $p \leq 0{,}05$. (B) Northern Blot. Bei der Northern-Blot-Analyse wurden 40 µg Gesamt-RNA kultivierter Rattenhepatozyten mit DIG-markierter Antisense-PAI-1-RNA-Sonde oder Antisense-β-Actin-RNA-Sonde hybridisiert. Die Chemilumineszenz-Signale wurden mittels Videodensitometrie quantifiziert. Ggn: Glucagon; Kon: Kontrolle.

Die PAI-1-mRNA-Expression war bei den 2h Kontrollen ohne Glucagon unter 8% O_2 auf das 3-fache gegenüber den Kontrollen unter 16% O_2 erhöht. Nach 2 h Inkubation unter 8% O_2 mit 5 nM Glucagon war die PAI-1-mRNA-Expression auf das 6-fache im Vergleich zu der Kontrolle ohne Glucagon und unter 16% O_2 erhöht. Nach einer Inkubation von 4 h konnte eine weitere Steigerung der Expression auf das 8-fache im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Die Induktion der PAI-1-mRNA-Expression sank wieder auf das 7-fache nach einer Inkubationsdauer von 6 h mit 5 nM Glucagon im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 13).

4.2.3 Induktion des PAI-1-Proteins durch Glucagon in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2

Zur Untersuchung der Induktion des PAI-1-Proteins durch Glucagon und pO_2 wurden 24 h kultivierte primäre Rattenhepatozyten nach einem Mediumwechsel mit 5 nM Glucagon stimuliert. Die Zellen wurden anschließend für 24 h unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 weiter kultiviert. Die Proteinspiegel wurden im Western Blot mit einem Antikörper gegen das PAI-1-Protein der Ratte gemessen.

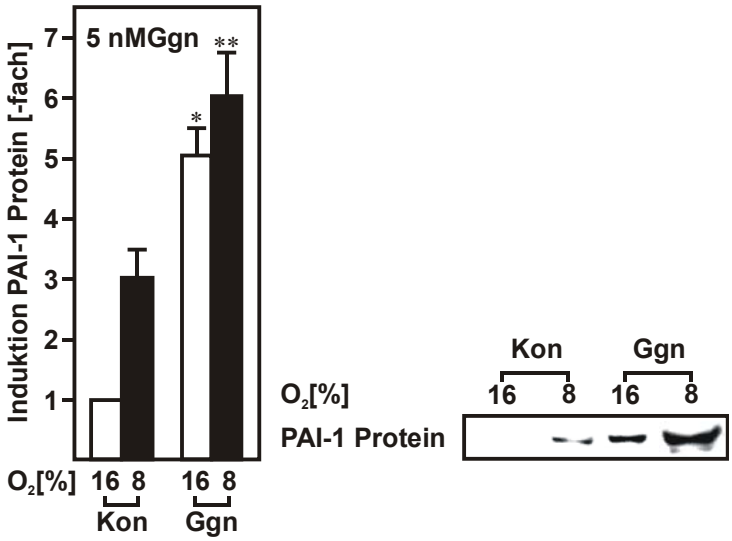

Abb. 14: **Induktion der PAI-1-Proteinexpression durch Glucagon in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2.** Primäre Rattenhepatozyten wurden für 24 h unter arteriellem pO_2 (16% O_2) kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 h in Gegenwart von 5 nM Glucagon unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 weiter kultiviert. Von den Zellkulturen wurde 1 ml Medium für die Proteinbestimmung gewonnen und 50 µg im Western Blot mit einem Antikörper aus Kaninchen gegen Ratten-PAI-1-Protein (American Diagnostics, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). Die für PAI-1 spezifischen Banden liegen bei 49 kDa (Hauptbande) und 46 kDa; * signifikante Differenz Kontrolle 16% O_2 vs. 16% O_2 + Glucagon; ** signifikante Differenz Kontrolle 8% O_2 vs. 8% O_2 + Glucagon, $p \leq 0{,}05$. Ggn: Glucagon; Kon: Kontrolle.

Nach 24 h Inkubation der Zellen unter 8% O_2 war die PAI-1-Proteinmenge im Medium 3-fach höher als bei den Kontrollen unter 16% O_2. Glucagon steigerte ebenfalls die PAI-1-Proteinspiegel unter 16% O_2 auf das 5-fache, während unter 8% O_2 eine Induktion auf das 6-fache beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse auf Proteinebene stehen im Einklang mit der Induktion der PAI-1-mRNA durch Glucagon sowohl bei 16% als auch 8% O_2 (Abb. 14).

4.3 Modulation der PAI-1-Genexpression durch Insulin und Glucagon in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten

In kultivierten primären Rattenhepatozyten wurde der Einfluss von Insulin und Glucagon in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration auf die PAI-1-mRNA-Expression unter arteriellem pO_2 (16% O_2) mittels Northern Blot und die Expression des PAI-1-Proteins mittels Western-Blot-Analysen untersucht.

4.3.1 Modulation der PAI-1-mRNA-Expression durch Insulin und Glucagon in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten

Insulin und Glucagon induzierten die PAI-1-mRNA-Expression bei einer Konzentration von 5 nM im Medium M199 nach 4 h Inkubationszeit unter 16% O_2 und 8% O_2 maximal. Nach 6 h Inkubationszeit wurde bereits eine geringere Induktion beobachtet. Somit wurden zur Untersuchung der Abhängigkeit der Expressionsinduktion von der Hormonkonzentration primäre Rattenhepatozyten mit unterschiedlichen Insulin- oder Glucagonkonzentrationen unter arteriellem pO_2 (16% O_2) für 4 h inkubiert. Dabei wurde die Insulin- oder Glucagonkonzentration nach einem Mediumwechsel bei 24 h kultivierten primären Rattenhepatozyten auf 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM oder 100 nM erhöht. Anschließend wurden die Hepatozyten unter arteriellem pO_2 (16% O_2) für 4 h weiter kultiviert. Nach Ernte der Zellen und RNA-Isolierung wurde diese im Northern Blot mit DIG-markierten Antisense-RNA-Sonden (PAI-1 und β-Actin) analysiert.

Bis zu einer Konzentration von 50 nM Insulin und Glucagon stieg die PAI-1-mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollen ohne Insulin und Glucagon an. Die PAI-1-mRNA-Expression war bei Insulinkonzentrationen von 1 nM auf das 2,5-fache, bei 5 nM auf das 4-fache, bei 10 nM auf das 4,5-fache und bei 50 nM auf das 5-fache erhöht. Im Vergleich zu der Induktion durch 50 nM Insulin kam es bei den Hepatozytenkulturen unter arteriellem pO_2 (16%O_2) und in Gegenwart von 100 nM Insulin im Medium nicht zu einem weiteren Anstieg der PAI-1-mRNA-Menge. Die PAI-1-mRNA-Expression bei 100 nM

Insulin war ebenfalls auf das 5-fache erhöht. Die PAI-1-mRNA-Expression war bei Glucagonkonzentrationen von 1 nM auf das 3,5-fache, bei 5 nM auf das 5-fache, bei 10 nM auf das 6-fache und bei 50 nM auf das 7-fache erhöht. Wie bei der Insulinkonzentrationserhöhung auf 100 nM kam es auch bei Glucagonkonzentrationen von 100 nM nicht zu einem weiteren PAI-1-mRNA-Anstieg. Die PAI-1-mRNA-Expression war bei 100 nM Glucagon ebenfalls auf das 7-fache erhöht (Abb. 15).

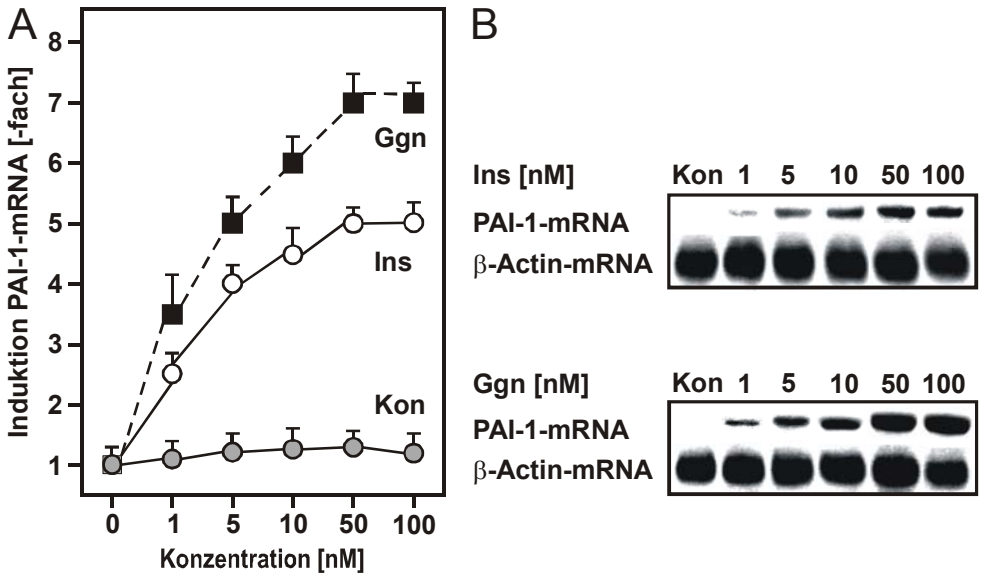

Abb. 15: **Induktion der PAI-1-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Insulin- und Glucagonkonzentration unter arteriellem (16% O_2) pO_2 in primären Rattenhepatozyten.** Primäre Rattenhepatozyten wurden für 24 h unter arteriellem pO_2 (16% O_2) kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 4 h in Gegenwart von 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM oder 100 nM Insulin bzw. Glucagon unter arteriellem (16% O_2) pO_2 weiter kultiviert. (A) In jedem Experiment wurde die im Northern Blot gemessene PAI-1-mRNA-Menge unter 16% O_2 ohne Insulin bzw Glucagon 100% gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. (B) Northern Blot. Bei der Northern-Blot-Analyse wurden 40 μg Gesamt-RNA kultivierter Rattenhepatozyten mit DIG-markierter Antisense-PAI-1-RNA-Sonde oder Antisense-β-Actin-RNA-Sonde hybridisiert. Die Chemilumineszenz-Signale wurden mittels Videodensitometrie quantifiziert. Ggn: Glucagon; Ins: Insulin; Kon: Kontrolle.

4.3.2 Modulation der PAI-1-Proteinexpression durch Insulin und Glucagon in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten

Da auf der Transkriptionsebene eine von der Insulin- und Glucagonkonzentration abhängige Induktion der PAI-1-mRNA-Expression beobachtet werden konnte, sollte dieser Effekt ebenfalls auf der Proteinebene untersucht werden.

Zur Untersuchung der PAI-1-Proteininduktion durch Insulin und Glucagon in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration wurden 24 h kultivierte primäre Rattenhepatozyten nach einem Mediumwechsel mit 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM bzw 100 nM Insulin- bzw. Glucagonkon stimuliert. Die Zellen wurden anschließend für weitere 24 h unter arteriellem

pO_2 (16% O_2) inkubiert. Die Proteinspiegel wurden im Western Blot mit einem Antikörper gegen das PAI-1-Protein der Ratte gemessen.

Bis zu einem Konzentrationsanstieg von Insulin und Glucagon auf 50 nM kam es zu steigender Proteininduktion im Vergleich zu den Kontrollen ohne Insulin und Glucagon bei gleicher Inkubationsdauer unter 16% O_2. Die Proteinexpression war bei Insulinkonzentrationen von 1 nM auf das 2,5-fache, bei 5 nM auf das 4-fache, bei 10 nM auf das 4,5-fache und bei 50 nM auf das 5-fache erhöht. Im Vergleich zu der Induktion durch 50 nM Insulin kam es bei den Hepatozytenkulturen unter arteriellem pO_2 (16% O_2) und in Gegenwart von 100 nM Insulin nicht zu einer weiteren Steigerung der PAI-1-Proteinmenge. Die PAI-1-Proteinexpression war bei 100 nM Insulin ebenfalls auf das 5-fache erhöht. Die Proteinexpression war bei Glucagonkonzentrationen von 1 nM auf das 3,5-fache, bei 5 nM auf das 5-fache, bei 10 nM auf das 6-fache und bei 50 nM auf das 7-fache erhöht. Wie bei der Insulinkonzentrationserhöhung auf 100 nM kam es auch bei Glucagonkonzentrationen von 100 nM nicht zu einer weitern Steigerung der PAI-1-Proteinmenge im Vergleich zu den Zellansätzen mit 50 nM Glucagon. Die PAI-1-Proteinexpression bei 100 nM Glucagon war ebenfalls auf das 7-fache erhöht. (Abb. 16).

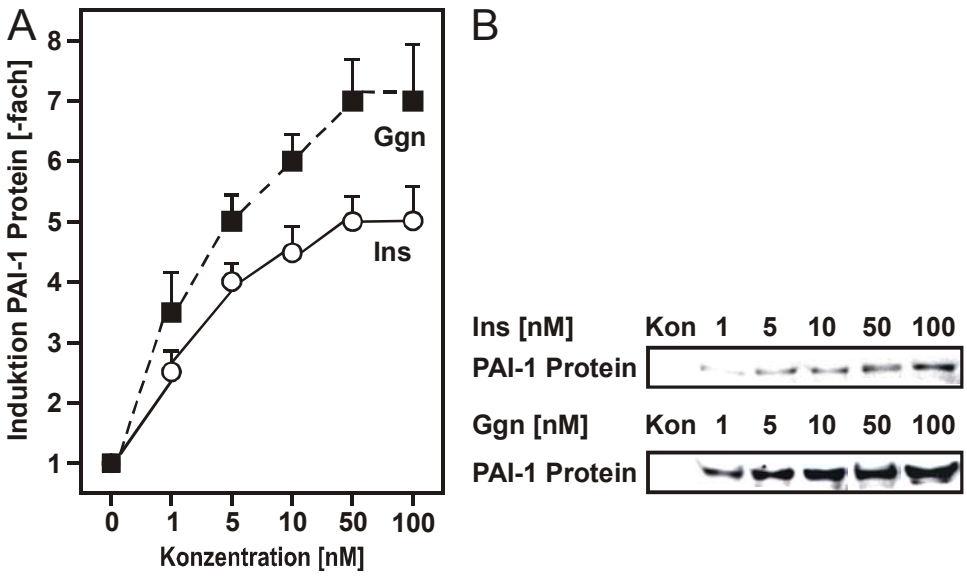

Abb. 16: **Induktion der PAI-1-Proteinexpression in Abhängigkeit von der Insulin- und Glucagonkonzentration unter arteriellem (16% O_2) pO_2 in primären Rattenhepatozyten.** Primäre Rattenhepatozyten wurden für 24 h unter arteriellem (16% O_2) pO_2 kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 h in Gegenwart von 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM oder 100 nM Insulin bzw. Glucagon unter arteriellem (16% O_2) pO_2 weiter kultiviert. Von den Zellkulturen wurde 1 ml Medium für die Proteinbestimmung gewonnen und 50 μg im Western Blot mit einem Antikörper aus Kaninchen gegen Ratten-PAI-1-Protein (American Diagnostics, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). Die für PAI-1 spezifischen Banden liegen bei 49 kDa (Hauptbande) und 46 kDa. Ggn: Glucagon; Ins: Insulin; Kon: Kontrolle.

4.4 Modulation der PAI-1-Genexpression durch cAMP und pO_2 in primären Rattenhepatozyten

Da es durch Glucagon zu einer Induktion der PAI-1-mRNA- und Proteinexpression gekommen ist, sollte in den folgenden Versuchen untersucht werden, ob die beobachtete Induktion durch Glucagon über eine Stimulation der Adenylatcyclase und Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen vermittelt wird. Hierfür wurde in kultivierten primären Rattenhepatozyten der Einfluss von cAMP auf die PAI-1-mRNA-Expression unter arteriellem pO_2 (16% O_2) und venösem pO_2 (8% O_2) mittels Northern Blot und der Einfluss auf die PAI-1-Proteinexpression mittels Western-Blot-Analysen untersucht.

4.4.1 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch cAMP unter arteriellem pO_2 (16% O_2) in primären Rattenhepatozyten

Der Einfluss von cAMP auf die PAI-1-mRNA-Expression wurde untersucht, indem 24 h kultivierte primäre Hepatozyten nach einem Mediumwechsel mit 500 μM cAMP unter 16% O_2 stimuliert wurden. Die Zellen wurden anschließend für 2 h, 4 h, 6 h und 8 h unter 16% O_2 weiter kultiviert. Nach Ernte der Zellen und RNA-Isolierung wurde diese im Northern Blot mit DIG-markierten Antisense-RNA-Sonden (PAI-1 und β-Actin) analysiert.

Die PAI-1-mRNA-Expression war nach 2 h Inkubation mit 500 μM cAMP unter 16% O_2 im Vergleich zu der Kontrolle ohne cAMP auf das 1,5-fache erhöht. Nach 4 h konnte eine deutliche Steigerung der Expression auf das 5-fache im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Die Induktion der PAI-1-mRNA-Expression war transient und sank wieder auf das 3,5-fache nach 6 h Inkubation mit 500 μM cAMP im Vergleich zu den Kontrollen. Nach 8 h Inkubation kam es zu einer weiteren Abnahme der PAI-1-mRNA-Induktion auf das 2,5-fache (Abb. 17).

4.4.2 Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch cAMP unter venösem pO_2 (8% O_2) in primären Rattenhepatozyten

Der Einfluss von cAMP auf die PAI-1-mRNA-Expression unter venösem pO_2 (8% O_2) wurde untersucht, nachdem 24 h kultivierte primäre Hepatozyten nach einem Mediumwechsel mit 500 μM cAMP stimuliert wurden. Die Zellen wurden anschließend für 4 h, 6 h und 8 h unter 8% O_2 weiter kultiviert. Nach Ernte der Zellen und RNA-Isolierung wurde diese im Northern Blot mit DIG-markierten Antisense-RNA-Sonden (PAI-1 und β-Actin) analysiert.

Die PAI-1-mRNA-Expression wurde nach 2 h Inkubation mit 500 μM cAMP unter 8% O_2 im Vergleich zu der 16% O_2 Kontrolle ohne cAMP und auf das 4-fache erhöht. Nach einer

Inkubation von 4 h konnte eine deutliche Steigerung der Expression auf das 7-fache festgestellt werden. Die Induktion der PAI-1-mRNA-Expression sank auf das 6-fache nach einer Inkubation von 6 h mit 500 μM cAMP und 8% O_2. Nach 8 h Inkubation war die PAI-1-mRNA-Induktion nur noch auf das 5-fache erhöht (Abb. 17).

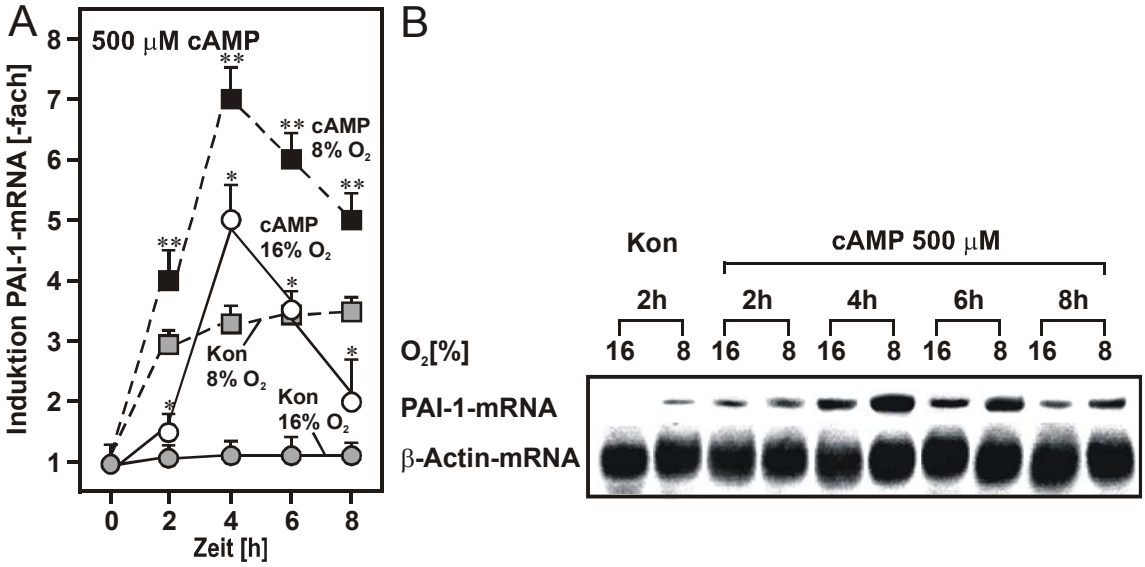

Abb. 17: **Induktion der PAI-1-mRNA-Expression durch cAMP in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2.** Primäre Rattenhepatozyten wurden für 24 h unter arteriellem pO_2 (16% O_2) kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 2 h, 4 h, 6 h und 8 h in Gegenwart von 500 μM cAMP unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 weiter inkubiert. (A) In jedem Experiment wurde die im Northern Blot gemessene mRNA-Menge unter 16% O_2 ohne cAMP 100% gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student´s t-Test für gepaarte Werte, $p \leq 0{,}05$; ∗ signifikante Differenz Kontrolle 16% O_2 vs. 16% O_2 + cAMP; ∗∗ signifikante Differenz Kontrolle 8% O_2 vs. 8% O_2 + cAMP, $p \leq 0{,}05$. (B) Northern Blot. Bei der Northern-Blot-Analyse wurden 40 μg Gesamt-RNA kultivierter Rattenhepatozyten mit DIG-markierter Antisense-PAI-1-RNA-Sonde oder Antisense-β-Actin-RNA-Sonde hybridisiert. Die Chemilumineszenz-Signale wurden mittels Videodensitometrie quantifiziert. Kon: Kontrolle.

4.4.3 Modulation der PAI-1-Proteinexpression durch cAMP unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 in primären Rattenhepatozyten

Zur Untersuchung der Induktion des PAI-1-Proteins durch cAMP wurden 24 h kultivierte primäre Rattenhepatozyten nach einem Mediumwechsel mit 500 μM cAMP stimuliert. Die Zellen wurden anschließend für 12 h unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 weiter kultiviert. Die Proteinspiegel wurden im Western Blot mit einem Antikörper gegen das PAI-1-Protein der Ratte gemessen.

Nach 12 h Inkubation der Zellen unter 8% O_2 war die PAI-1-Proteinmenge 3-fach höher als bei der Kontrolle unter 16% O_2. cAMP steigerte den PAI-1-Proteinspiegel unter 16% O_2 auf das 5-fache, während unter 8% O_2 eine Induktion auf das 7-fache beobachtet werden konnte (Abb. 18).

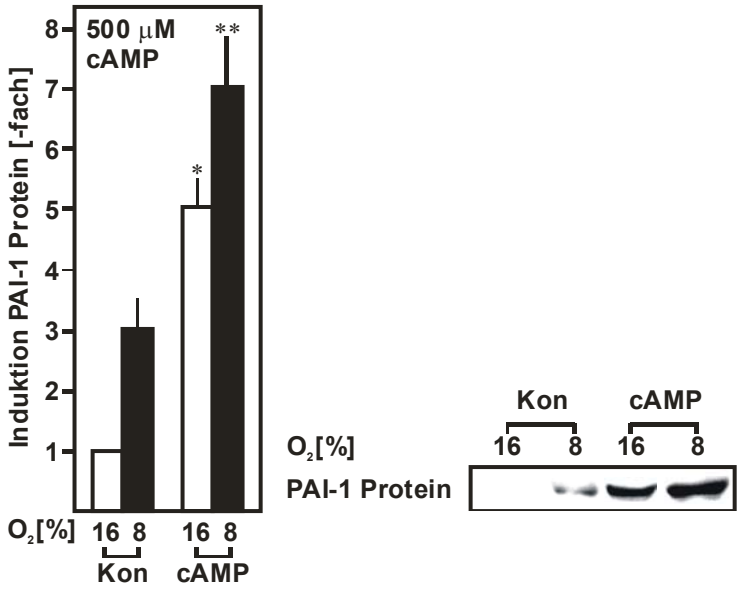

Abb. 18: **Induktion der PAI-1-Proteinexpression durch cAMP in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2.** Primäre Rattenhepatozyten wurden für 24 h unter arteriellem pO_2 (16% O_2) kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 12 h in Gegenwart von 500 µM cAMP unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 weiter kultiviert. Von den Zellkulturen wurde 1 ml Medium für die Proteinbestimmung gewonnen und 50 µg im Western Blot mit einem Antikörper aus Kaninchen gegen Ratten-PAI-1-Protein (American Diagnostics, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). Die für PAI-1 spezifischen Banden liegen bei 49 kDa (Hauptbande) und 46 kDa; ∗ signifikante Differenz Kontrolle 16% O_2 vs. 16% O_2 + cAMP; ∗∗ signifikante Differenz Kontrolle 8% O_2 vs. 8% O_2 + cAMP, $p \leq 0{,}05$. Kon: Kontrolle.

4.5 Modulation der Insulin-, Glucagon- und cAMP-induzierten PAI-1-Genexpression durch Wortmannin, H7 und Rp-cAMPS in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2

4.5.1 Modulation der Insulin-induzierten PAI-1-Genexpression durch Wortmannin in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2

Da die PAI-1-mRNA- und Protein-Expression durch Insulin unter 16% O_2 und 8% O_2 induziert wurde, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Hemmstoff Wortmannin einen Einfluss auf die Insulin-induzierte PAI-1-Expression hat.

Der Einfluss von Wortmannin auf die Induktion der PAI-1-mRNA durch Insulin wurde untersucht, indem mit dem Hemmstoff Wortmannin (10 nM) die Zellen für 1 h unter 16% O_2 und 8% O_2 weiter inkubiert wurden. Nach der Vorinkubationszeit mit dem Hemmstoff wurde die Insulinkonzentration im Medium bei einem Teil der Hepatozytenkulturen auf 5 nM erhöht. Die entsprechenden Hepatozytenkulturen ohne Hemmstoff oder Insulin, mit Wortmannin und ohne Insulin und die Inkubationsansätze mit Wortmannin und Insulin

wurden dann für 4 h unter 16% O_2 und 8% O_2 weiter kultiviert (Versuchsaufbau siehe Abb. 19). Nach Ernte der Zellen und RNA-Isolierung wurde diese im Northern Blot mit DIG-markierten Antisense-RNA-Sonden (PAI-1, PCK und β-Actin) analysiert.

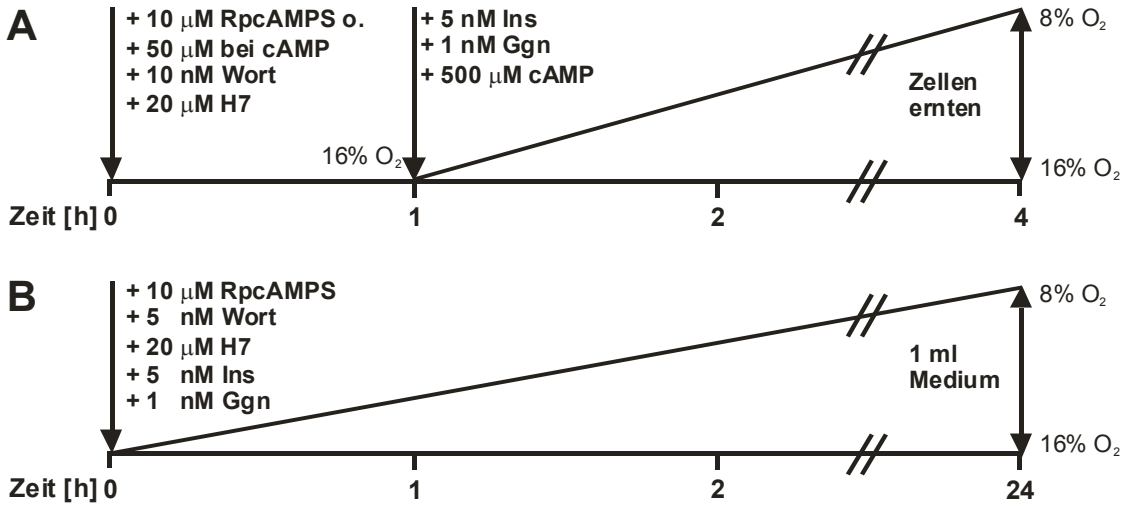

Abb. 19: **Versuchsaufbau zur Untersuchung der Hemmwirkung durch Wortmannin, H7 und Rp-cAMPS.** (A) Untersuchung auf mRNA-Ebene: Ein Teil der bei 16% O_2 für 24 h kultivierten primären Rattenhepatozytenkulturen wurde nach einem Mediumwechsel für 1 h unter arteriellem pO_2 (16% O_2) nach bzw. ohne Zugabe von entweder Wortmannin (10 nM), H7 (20 µM) oder Rp-cAMPS (10 µM bei den Kulturen für Ggn und 50 µM bei den Kulturen für cAMP) kultiviert. Anschließend wurde bei den entsprechenden Inkubationsansätzen die Insulinkonzentration auf 5 nM, die Glucagonkonzentration auf 1 nM und die cAMP-Konzentration auf 500 µM erhöht. Die Hepatozytenkulturen wurden für 4 h unter 8% O_2 bzw 16% O_2 weiter kultiviert. (B) Untersuchung auf Proteinebene: Für die Proteingewinnung wurden Zellkulturen für 24 h unter 16% und 8% O_2 nach Zugabe der Hormone und Hemmstoffe, in den in der Grafik angegebenen Konzentrationen, inkubiert. Ggn: Glucagon; Ins: Insulin; Wort: Wortmannin.

Zur Untersuchung der Hemmwirkung von Wortmannin auf die Insulin-induzierte PAI-1-Proteinexpression wurden die Zellen für weitere 24 h unter 16% und 8% O_2 inkubiert. PAI-1-Protein wurde aus 1 ml Medium mittels Western Blot mit einem Antikörper aus Kaninchen gegen PAI-1-Protein der Ratte gemessen.

Nach 4 h Inkubation konnte bei den Hepatozytenkulturen, die mit 5 nM Insulin unter 16 % O_2 kultiviert waren eine PAI-1-mRNA-Induktion auf das 4,5-fache im Vergleich zu den Kontrollen ohne Hemmstoff und ohne Hormon festgestellt werden. Bei den Hepatozytenkulturen, die unter 8% O_2 in Gegenwart von 5 nM Insulin inkubiert wurden, lag die PAI-1-mRNA-Induktion bei 6-fach. Bei den Inkubationsansätzen mit Wortmannin bzw. Wortmannin und Insulin unter 16% O_2 und unter 8% O_2 konnte eine effiziente Hemmung der Insulin-induzierten PAI-1-mRNA-Induktion beobachtet werden. Ferner war die durch Hypoxie-induzierte PAI-1-mRNA-Induktion in Gegenwart von Wortmannin ebenfalls reduziert.

Als Kontrolle wurde die PCK-mRNA-Expression gemessen, die durch Insulin hemmbar ist. Eine Aufhebung der Insulinwirkung durch Wortmannin sollte also dementsprechend zu einer Derepression der PCK-mRNA führen.

Die PCK-mRNA-Expression war bei den mit Insulin inkubierten Zellansätzen gegenüber der Kontrolle erwartungsgemäß reduziert. Wortmannin selber hatte keinen Einfluß auf die PCK-mRNA-Spiegel, jedoch konnte Wortmannin in Gegenwart von Insulin die Insulin-vermittelte Repression der PCK-mRNA aufheben (Abb. 20).

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Hemmwirkung von Wortmannin auf die Insulin-induzierte PAI-1-Proteinexpression korrespondierten mit den oben beschriebenen Ergebnissen auf der mRNA-Ebene (Abb. 20).

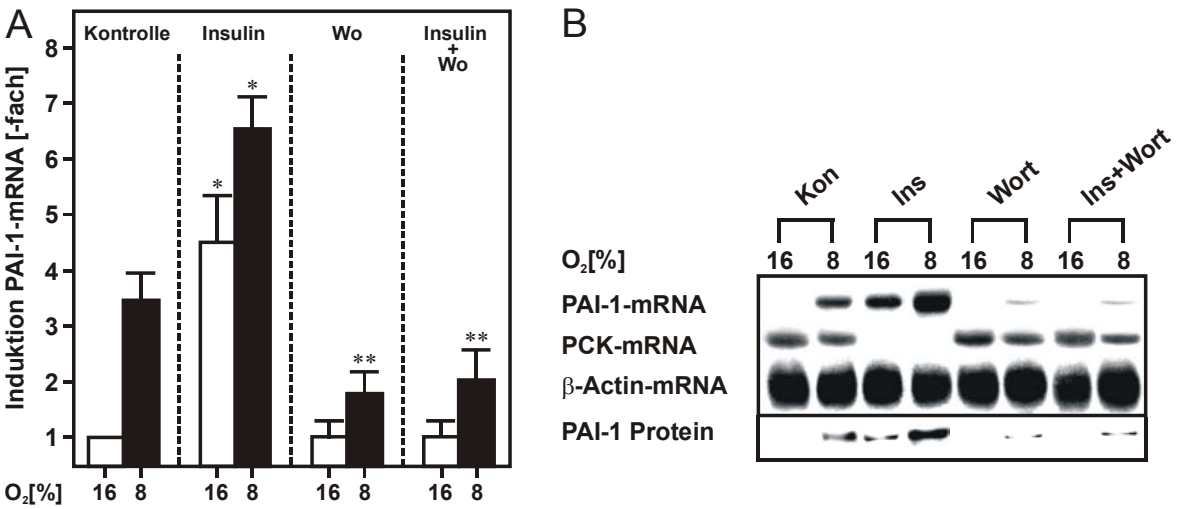

Abb. 20: **Hemmung der Insulin-abhängigen PAI-1-Genexpression durch Wortmannin in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2.** 24 h unter 16% O_2 kultivierte primäre Rattenhepatozyten wurden nach einem Mediumwechsel für 1 h mit Wortmannin (10 nM) inkubiert, bevor 5 nM Insulin hinzugegeben wurde und die Zellen unter arteriellem pO_2 (16% O_2) und venösem pO_2 (8% O_2) für 4 h kultiviert wurden. Für die Proteingewinnung wurden die Zellen nach 24 h unter 16% O_2 und 8% O_2 geerntet. (A) In jedem Experiment wurde die im Northern Blot gemessene mRNA-Menge unter 16% O_2 ohne Insulin oder Wortmannin 100% gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student´s t-Test für gepaarte Werte, $p \leq 0{,}05$. Signifikante Differenz $*$ Kontrollen vs. Insulin; signifikante Differenz $**$ Kontrolle 8% O_2 vs. 8% O_2 + Wortmannin. (B) Northern und Western Blot: Bei der Northern-Blot-Analyse wurden 40 μg Gesamt-RNA kultivierter Rattenhepatozyten mit DIG-markierter Antisense-PAI-1-RNA-Sonde, Antisense-β-Actin-RNA-Sonde und Antisense-PCK-RNA-Sonde hybridisiert. Die Chemilumineszenz-Signale wurden mittels Videodensitometrie quantifiziert. Western Blot: Aus den Zellkulturen wurde 1 ml Medium für die Proteinbestimmung gewonnen und 50 μg im Western Blot mit einem Antikörper aus Kaninchen gegen Ratten-PAI-1-Protein (American Diagnostics, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). Die für PAI-1 spezifischen Banden liegen bei 49 kDa (Hauptbande) und 46 kDa. Ins, Insulin; Kon, Kontrolle; Wort, Wortmannin.

4.5.2 Modulation der Glucagon-abhängigen PAI-1-mRNA-Expression durch H7 und Rp-cAMPS in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2

Da die PAI-1-mRNA- und Protein-Expression durch Glucagon induziert wurde, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob die Hemmstoffe Rp-cAMPS und H7 einen Einfluss auf die Glucagon-induzierte PAI-1-Induktion haben.

Der Einfluss von H7 und Rp-cAMPS auf die Induktion der PAI-1-mRNA durch Glucagon wurde untersucht, nachdem 24 h unter 16% O_2 kultivierte primäre Hepatozyten nach einem Mediumwechsel mit den Hemmstoffen H7 (20 μM) und Rp-cAMPS (10 μM) für 1 h unter 16% O_2 kultiviert wurden, bevor die Glucagonkonzentration im Medium bei einem Teil der Hepatozytenkulturen auf 1 nM erhöht wurde. Die entsprechenden Hepatozytenkulturen wurden ohne Hemmstoffe oder Glucagon, mit H7 oder Rp-cAMPS und ohne Glucagon und die Inkubationsansätze mit jeweils einem der Hemmstoffe und Glucagon für 4 h unter 16% O_2 und 8% O_2 weiter inkubiert (Versuchsaufbau siehe Abb. 17). Nach Ernte der Zellen und RNA-Isolierung wurde diese im Northern Blot mit DIG-markierten Antisense-RNA-Sonden (PAI-1, PCK und β-Actin) analysiert.

Zur Untersuchung der Hemmwirkung von H7 und Rp-cAMPS auf die Glucagon-induzierte PAI-1-Proteinexpression wurden die analog behandelten Zellen für 24 h unter 16% und 8% O_2 inkubiert und das PAI-1-Protein aus 1 ml Medium im Western Blot mit einem Antikörper aus Kaninchen gegen PAI-1-Protein der Ratte gemessen.

Nach 4 h Inkubation konnte bei den Hepatozytenkulturen, die mit 1 nM Glucagon unter 16 % O_2 kultiviert wurden, eine PAI-1-mRNA-Induktion auf das 3,5-fache im Vergleich zu den Kontrollen ohne Hemmstoff und Hormon festgestellt werden. Bei den Hepatozytenkulturen unter 8% O_2 war die PAI-1-mRNA-Induktion 6-fach. Bei den Inkubationsansätzen mit H7 oder Rp-cAMPS bzw. H7, Rp-cAMPS und Glucagon konnte sowohl unter 16% O_2 als auch unter 8% O_2 eine effiziente Hemmung der durch Glucagon induzierten PAI-1-mRNA-Expression beobachtet werden (Abb. 21).

Erwartungsgemäß war die PCK-mRNA-Expression nach Stimulation mit Glucagon deutlich erhöht. Eine Hemmung der Glucagon-induzierten PCK-Expression durch H7 und Rp-cAMPS konnte ebenfalls bei der PCK-mRNA-Expression beobachtet werden (Abb. 21).

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Hemmwirkung von H7 und Rp-cAMPS auf die durch Glucagon induzierte PAI-1-Proteinexpression korrespondierten mit den oben beschriebenen Ergebnissen auf mRNA-Ebene (Abb. 21).

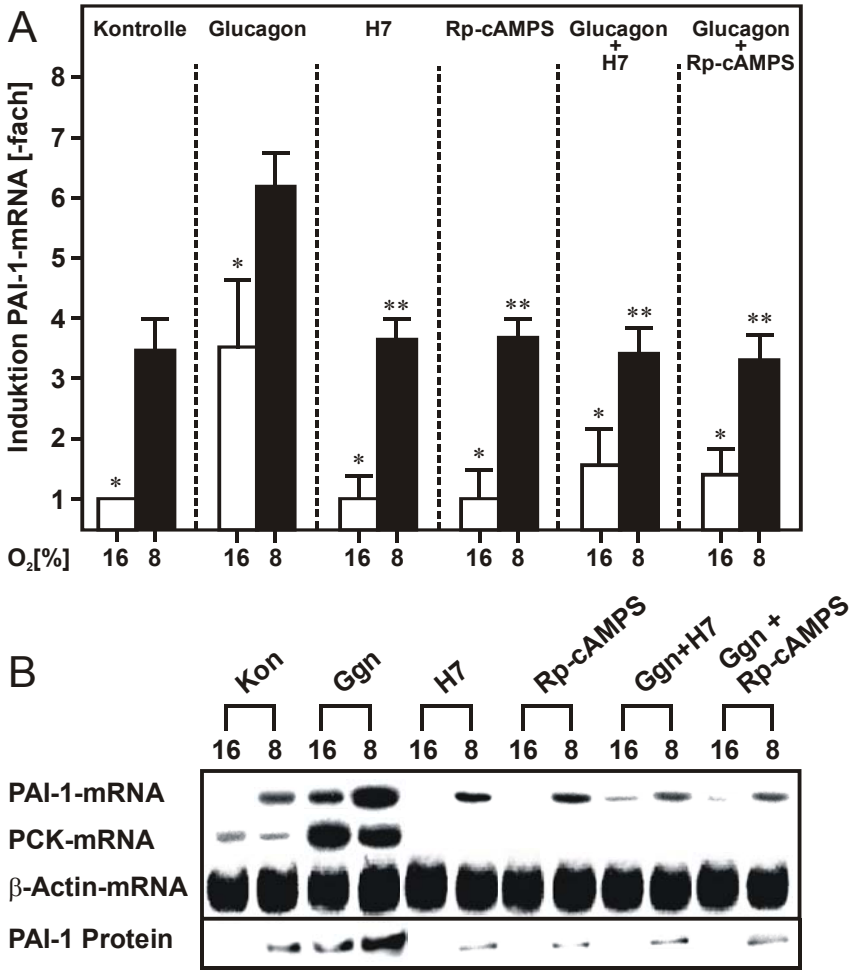

Abb. 21: **Hemmung der Glucagon-abhängigen PAI-1-Genexpression durch H7 und Rp-cAMPS in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2.** 24 h unter 16% O_2 kultivierte primäre Rattenhepatozyten wurden nach einem Mediumwechsel mit H7 (20 μM) oder Rp-cAMPS (10 μM) für 1 h inkubiert, bevor 1 nM Glucagon hinzugegeben wurde und die Hepatozytenkulturen für weitere 4 h unter 8% O_2 bzw 16% O_2 inkubiert wurden. Für die Proteingewinnung wurden die Zellen nach 24 h Kultur unter 16% O_2 und 8% O_2 geerntet. (A) In jedem Experiment wurde die im Northern Blot gemessene PAI-1-mRNA-Menge unter 16% O_2 ohne Glucagon, H7 oder Rp-cAMPS 100% gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student´s t-Test für gepaarte Werte, $p \leq 0{,}05$. Signifikante Differenz ∗ 16% O_2 vs. 8% O_2; ∗∗ Ggn vs. H7/Rp-cAMPS und Ggn + H7/Rp-cAMPS. (B) Northern und Western Blot: Bei der Northern-Blot-Analyse wurden 40 μg Gesamt-RNA kultivierter Rattenhepatozyten mit DIG-markierter Antisense-PAI-1-RNA-Sonde, Antisense-β-Actin-RNA-Sonde und Antisense-PCK-RNA-Sonde hybridisiert. Die Chemilumineszenz-Signale wurden mittels Videodensitometrie quantifiziert. Bei der Western-Blot-Analyse wurde von den Zellkulturen 1 ml Medium für die Proteinbestimmung gewonnen und 50 μg im Western Blot mit einem Antikörper aus Kaninchen gegen Ratten-PAI-1-Protein (American Diagnostics, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). Die für PAI-1 spezifischen Banden liegen bei 49 kDa (Hauptbande) und 46 kDa. Ggn: Glucagon; Kon: Kontrolle.

4.5.3 Modulation der durch cAMP induzierten PAI-1-mRNA-Expression durch Rp-cAMPS in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2

Da die PAI-1-mRNA- und Protein-Expression durch cAMP induziert wurde, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob der Hemmstoff Rp-cAMPS einen Einfluß auf die cAMP-induzierte PAI-1-Expression hat.

Der Einfluss von Rp-cAMPS auf die Induktion der PAI-1-mRNA durch cAMP wurde untersucht, nachdem bei 24 h kultivierten primären Hepatozytenkulturen nach einem Mediumwechsel die Zellkulturen mit dem Hemmstoff Rp-cAMPS (50 μM) für 1 h unter 16% O_2 kultiviert wurden, bevor die cAMP-Konzentration bei einem Teil der Hepatozytenkulturen auf 500 μM erhöht wurde. Die entsprechenden Hepatozytenkulturen ohne Hemmstoff oder cAMP, mit Rp-cAMPS und ohne cAMP und die Inkubationsansätze mit Rp-cAMPS und Glucagon wurden für 4 h unter 16% O_2 und 8% O_2 weiter inkubiert (Versuchsaufbau siehe Abb. 17). Nach Ernte der Zellen und RNA-Isolierung wurde diese im Northern Blot mit DIG-markierten Antisense-RNA-Sonden (PAI-1, PCK und β-Actin) analysiert.

Nach 4 h Inkubation konnte bei den Hepatozytenkulturen, die mit 500 μM cAMP unter 16 % O_2 kultiviert wurden, eine PAI-1-mRNA-Induktion auf das 5-fache im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Bei den Hepatozytenkulturen unter 8% O_2 war die PAI-mRNA-Induktion bei 7-fach. Bei den Inkubationsansätzen mit Rp-cAMPS oder Rp-cAMPS und cAMP konnte eine effiziente Hemmung der durch cAMP induzierten PAI-1-mRNA-Expression beobachtet werden (Abb. 22).

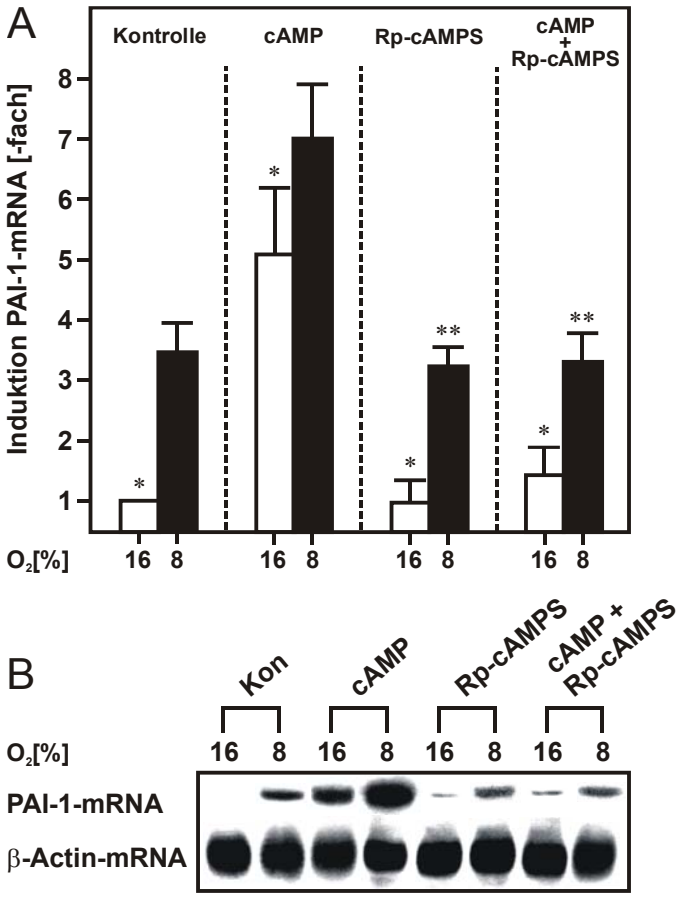

Abb. 22: **Hemmung der cAMP-abhängigen PAI-1-Genexpression durch Rp-cAMPS in primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2.** 24 h unter 16% O_2 kultivierte primäre Rattenhepatozytenkulturen wurden nach einem Mediumwechsel mit Rp-cAMPS (50 μM) für 1 h inkubiert, bevor 500 μM cAMP hinzugegeben wurde und die Zellkulturen für weitere 4 h unter 8% O_2 bzw 16% O_2 inkubiert wurden. (A) In jedem Experiment wurde die im Northern Blot gemessene mRNA-Menge unter 16% O_2 ohne cAMP oder Rp-cAMPS 100% gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistik: Student´s t-Test für gepaarte Werte, $p \leq 0{,}05$. ∗ signifikante Differenz 16% O_2 vs 8% O_2; ∗∗ signifikante Differenz cAMP vs. cAMP + Rp-cAMPS. (B) Northern Blot: Bei der Northern-Blot-Analyse wurden 40 μg Gesamt-RNA kultivierter Rattenhepatozyten mit DIG-markierter Antisense-PAI-1-RNA-Sonde, Antisense-β-Actin-RNA-Sonde und Antisense-PCK-RNA-Sonde hybridisiert. Die Chemilumineszenz-Signale wurden mittels Videodensitometrie quantifiziert. Kon, Kontrolle.

4.6 Modulation der Luciferase-Aktivität durch Insulin und Glucagon in mit PAI-1-Promotor-Genkonstrukten transfizierten primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2

Um zu untersuchen, ob die Insulin- und Glucagon-abhängige Induktion der PAI-1-Genexpression über eine bestimmte PAI-1-Promotorsequenz vermittelt wird, wurden primär kultivierte Rattenhepatozyten mit PAI-1-Promotor-Luciferase-Genkonstrukten transfiziert.

4.6.1 Modulation der Luciferase-Aktivität durch Insulin in mit PAI-1-Promotor-Genkonstrukten transfizierten primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2

Der PAI-1-Promotor enthält zwei Hypoxie-responsive Elemente (HRE-1, -175/-158; HRE-2 -165/-158) (vgl. Abb 7). Da Wortmannin sowohl die Hypoxie-abhängige, als auch die Insulin-vermittelte Steigerung der PAI-1-Expression hemmte, sollte untersucht werden, ob die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors (HIF-1) über den PI3K/PKB-Signalweg für die Insulin-abhängige Modulation der PAI-1-Genexpression verantwortlich ist. Dazu wurden Genkonstrukte, in denen das HRE-1 (pGL3PAI-766M1-Luc) oder das HRE-2 (pGL3PAI-766M2-Luc) in der PAI-1-Promotorregion mutiert sind und vor dem Luciferase-(Luc)-Gen fungieren, eingesetzt. Ferner wurde ein Konstrukt mit der Wildtyp-PAI-1-Promotorregion -766/+31 (pGL3PAI-766-Luc) eingesetzt.

Die Zellen wurden am Tag nach der Transfektion mit Insulin (20 nM) und Wortmannin (5 nM) behandelt und unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 für 24 h inkubiert.

In mit pGL3PAI-766-Luc transfizierten Hepatozyten induzierte Insulin die Luc-Aktivität 4-fach unter arteriellem pO_2 und 6,5-fach unter venösem pO_2. Durch Wortmannin wurde sowohl die durch Insulin als auch die durch Hypoxie induzierte Luc-Aktivität gehemmt. In mit pGL3PAI-766M1-Luc und pGL3PAI-766M2-Luc transfizierten Hepatozyten wurde die Luc-Aktivität weder durch Insulin noch durch Hypoxie beeinflusst (Abb. 23).

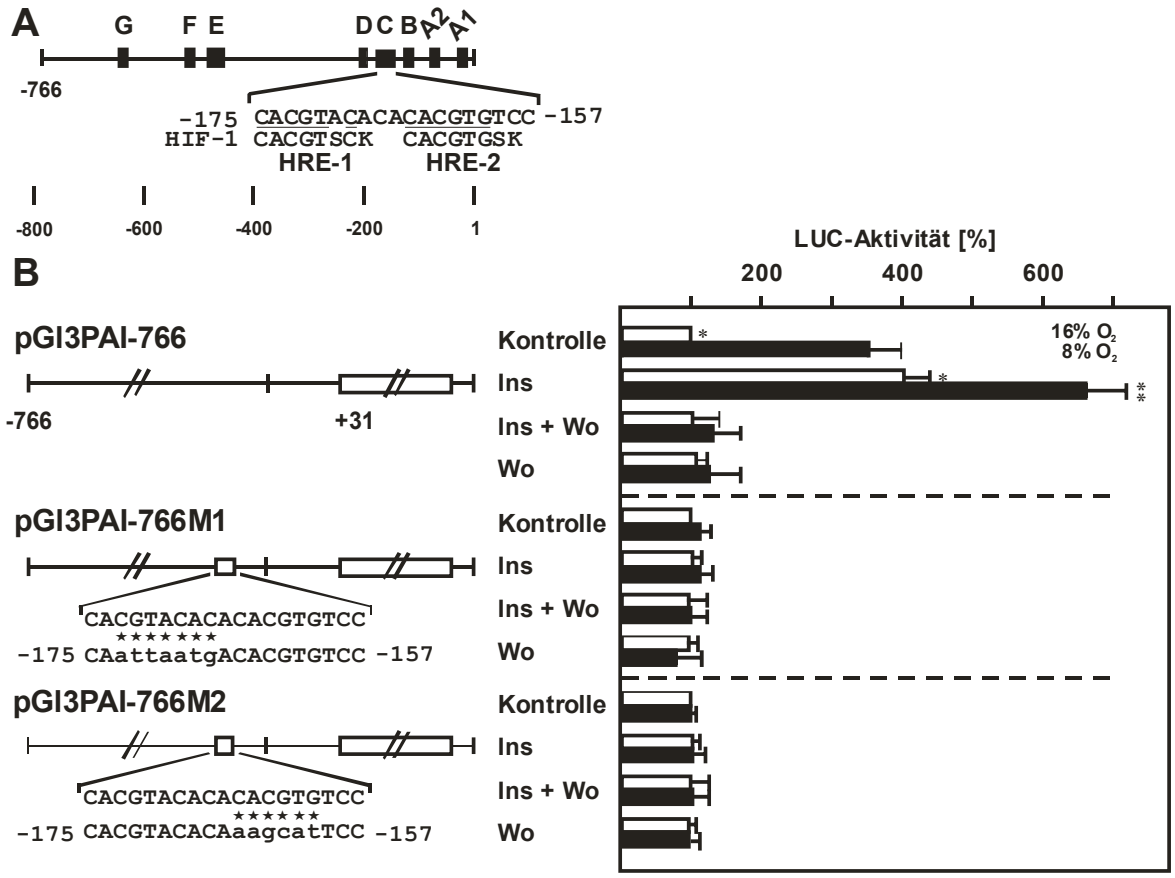

Abb. 23: **Modulation der Insulin-abhängigen Induktion der Luc-Aktivität in mit PAI-1-Promotor-Luciferase-Genkonstrukten transfizierten Hepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2.** (A) Der PAI-1-Promotor der Ratte mit seinen zwei Hypoxie-responsiven Elementen (HRE-1, -2) und die HIF-1 Consensus-Sequenz BACGTSSK (unterstrichen) (B=G/C/T; S=C/G; K=G/T) (Siehe Material 2.2.3). (B) Hepatozyten wurden mittels der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode unter arteriellem (16% O_2) pO_2 5 h mit pGL3PAI-766-Luc- sowie deren mutierten Formen pGL3PAI-766M1-Luc- und pGL3PAI-766M2-Luc-Genkonstrukten transfiziert und nach einem Mediumwechsel 24h unter arteriellem pO_2 kultiviert. Bei den Konstrukten pGL3PAI-766M1 und M2 ist die PAI-1-Promotor-Wildtyp-Sequenz auf dem oberen Strang dargestellt, der mutierte Strang darunter. Mutierte Basen in Kleinbuchstaben. Sterne zeigen die Mutation an. Danach erfolgte ein erneuter Mediumwechsel und die Insulinkonzentration wurde, wenn angegeben, auf 20 nM erhöht. Des Weiteren wurde Wortmannin zu bestimmten Zellansätzen in einer Konzentration von 5 nM hinzugegeben. Die Zellen wurden dann für weitere 24 h unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 kultiviert. In jedem Experiment wurde die Luc-Aktivität des jeweils transfizierten PAI-1-Promotor-Luc-Konstruktes unter 16% O_2 und ohne Insulin oder Wortmannin = 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4 unabhängigen Experimenten. Student´s t-Test für gepaarte Werte; $p \leq 0{,}05$. ∗ signifikante Differenz 16% O_2 vs 8% O_2; ∗∗ signifikante Differenz Kontrolle vs. Insulin. HIF-1: Hypoxie-induzierbarer Faktor 1; Ins, Insulin; Kon, Kontrolle; Wort, Wortmannin.

4.6.2 Modulation der Luciferase-Aktivität durch Glucagon in mit PAI-1-Promotor-Genkonstrukten transfizierten primären Rattenhepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2

Um herauszufinden, ob an der durch Glucagon vermittelten Induktion der PAI-1-Genexpression ebenfalls die zwei Hypoxie-responsiven Elemente (HRE-1, -175/-158; HRE-2, -165/-158) im PAI-1-Promotor beteiligt sind, wurden primär kultivierte Rattenhepatozyten mit Genkonstrukten, in denen das HRE-1 (pGL3PAI-766M1-Luc) oder das HRE-2 (pGL3PAI-766M2-Luc) in der PAI-1-Promotorregion mutiert sind und vor dem Luciferase-Gen fungieren, für die Transfektionen eingesetzt. Ferner wurde ein Konstrukt mit der Wildtyp-PAI-1-Promotorregion -766/+31 aus dem 5´-flankierenden Bereich (pGL3PAI-766-Luc) eingesetzt.

Die Zellen wurden am Tag nach der Transfektion mit Glucagon (10 nM) und H7 (10 μM) behandelt und unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 für 24 h inkubiert.

In mit pGL3PAI-766-Luc transfizierten Hepatozyten induzierte Glucagon die Luc-Activität 5-fach unter arteriellem pO_2 und 8-fach unter venösem pO_2. Durch H7 wurde die durch Glucagon induzierte Luc-Aktivität unter 16% O_2 und 8% O_2 gehemmt. In mit pGL3PAI-766M1-Luc und pGL3PAI-766M2-Luc transfizierten Hepatozyten wurde die Luc-Aktivität weder durch Glucagon noch durch Hypoxie beeinflusst (Abb. 24).

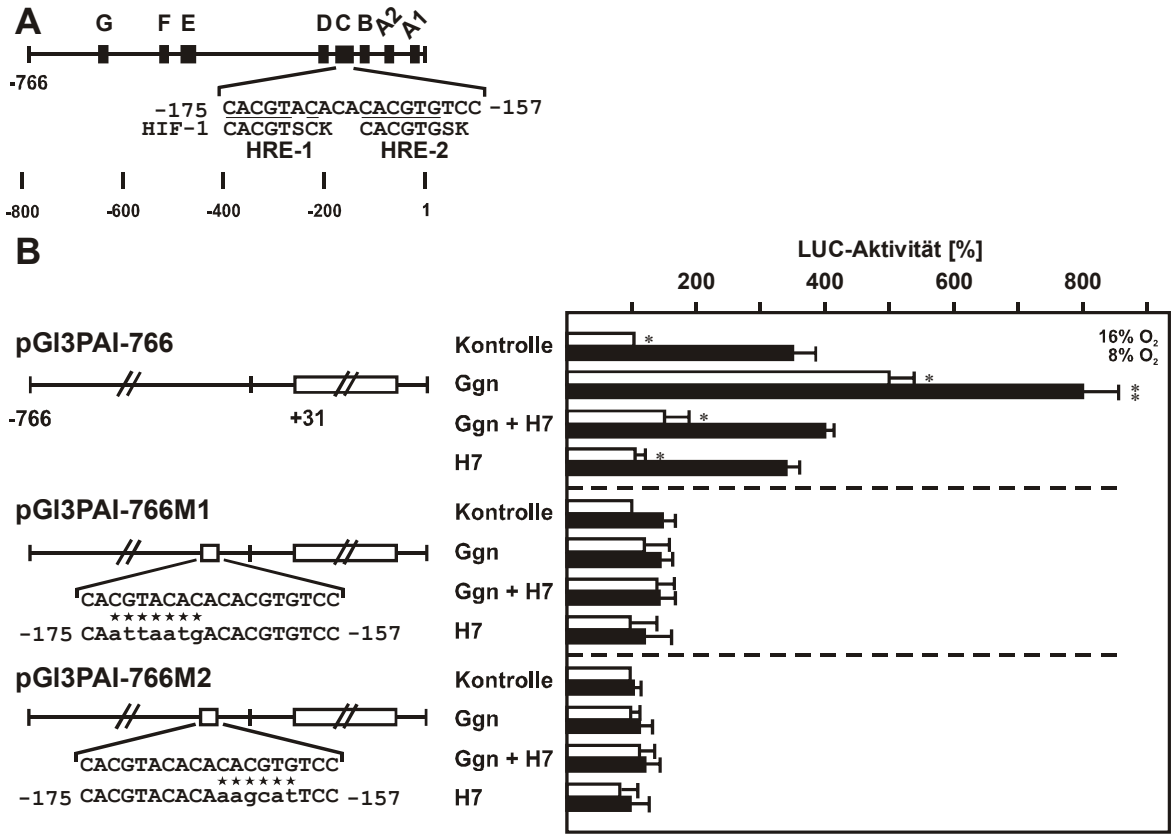

Abb. 24: **Modulation der Glucagon-abhängigen Induktion der Luc-Aktivität in mit PAI-1-Promotor-Luciferase-Genkonstrukten transfizierten Hepatozyten unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2.** (A) Der PAI-1-Promotor der Ratte mit seinen zwei Hypoxie-responsiven Elementen (HRE-1, -2) und die HIF-1 Consensus-Sequenz BACGTSSK (unterstrichen) (B=G/C/T; S=C/G; K=G/T) (Siehe Material 2.2.3). (B) Hepatozyten wurden mittels der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode unter arteriellem (16% O_2) pO_2 5 h mit pGL3PAI-766-Luc- sowie deren mutierten Formen pGL3PAI-766M1-Luc- und pGL3PAI-766M2-Luc-Genkonstrukten transfiziert und nach einem Mediumwechsel 24 h unter arteriellem pO_2 kultiviert. Bei den Konstrukten pGL3PAI-766M1 und M2 ist die PAI-1-Promotor-Wildtyp-Sequenz auf dem oberen Strang dargestellt, der mutierte Strang darunter. Mutierte Basen in Kleinbuchstaben. Sterne zeigen die Mutation an. Danach erfolgte ein erneuter Mediumwechsel und die Glucagonkonzentration wurde, wenn angegeben, auf 10 nM erhöht. Des Weiteren wurde H7 zu bestimmten Zellansätzen in einer Konzentration von 10 μM hinzugegeben. Die Zellen wurden dann für weitere 24 h unter arteriellem (16% O_2) und venösem (8% O_2) pO_2 kultiviert. In jedem Experiment wurde die Luc-Aktivität des jeweils transfizierten PAI-1-Promotor-Luc-Konstruktes unter 16% O_2 und ohne Glucagon oder H7 = 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4 unabhängigen Experimenten. Student´s t-Test für gepaarte Werte; $p \leq 0{,}05$. * Signifikante Differenz 16% O_2 vs. 8% O_2; ** signifikante Differenz Kontrolle vs. Glucagon. Ggn, Glucagon; HIF-1: Hypoxie-induzierbarer Faktor 1; Kon, Kontrolle.

5. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in primär kultivierten Rattenhepatozyten die Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1)-Genexpression durch Insulin und Glucagon positiv reguliert wird. Die Induktion konnte sowohl in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration als auch in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer auf der mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Durch Transfektion von primär kultivierten Rattenhepatozyten mit PAI-1-Promotor-Luc-Genkonstrukten wurde ebenfalls gezeigt, dass die Insulin- und Glucagon-abhängige Induktion der PAI-1-Genexpression innerhalb der ersten 766 bp des PAI-1-Promotors stattfindet und dass die zwei Hypoxie-responsiven Elemente innerhalb dieser Promotorregion an der Insulin- und Glucagon-abhängigen PAI-1-Genregulation beteiligt sein könnten.

5.1 Die Insulin-abhängige Induktion der Ratten-PAI-1-Genexpression wird über den Phosphatidylinositol-3-Kinase- und Proteinkinase-B-Signalweg vermittelt

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Insulin-abhängige Induktion der Ratten-PAI-1-Genexpression über den PI3K/PKB-Signalweg, möglicherweise durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 und seine Bindung an die Hypoxie-responsiven Elemente im PAI-1-Promotor, vermittelt wird.

5.1.1 Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1

HIF-1 ist ein Heterodimer, das aus zwei Untereinheiten, einer 120 kDa α- und einer 91-94 kDa β-Untereinheit, besteht (Wang GL et al. 1995; Wang GL und Semenza 1995). HIF-1 wurde als Zellkernprotein, das im Bereich der 3´-flankierenden Region des Erythropoetin-Gens bindet, entdeckt (Semenza und Wang 1992). Während die HIF-1α-Untereinheit als ein neues Protein erkannt wurde, war die HIF-1β-Untereinheit identisch mit dem bereits bekannten ARNT (aryl hydrocarbon receptor (AhR) nuclear translocator) Protein (Hoffman et al. 1991). Neben HIF-1α (Wang GL et al. 1995; Wang GL und Semenza 1995) wurden HIF-2α, das auch als HRF, HLF oder EPAS bekannt ist (Tian et al. 1997; Ema et al. 1997; Flamme et al. 1997; Hogenesch et al. 1997), und HIF-3α (Gu et al. 1998) als weitere Vertreter dieser Proteinfamilie nachgewiesen. Die Aminosäuresequenzen der für die Funktion von HIF-1α wichtigen Domänen (bHLH, PAS, ODDD (oxygen-dependent degradation domain), amino- und carboxyterminale Transaktivierungsdomäne) sind bei HIF-2α ebenfalls zu finden und weisen im Vergleich zu den Sequenzen der HIF-1α-

Domänen eine große Ähnichkeit auf (Tian et al. 1997; Wiesener et al. 1998; O´Rourke et al. 1999).

Die HIF-α-Untereinheiten und die ARNT-Proteine gehören zu einer strukturell verwandten Proteinfamilie. Das aminoterminale Ende der Untereinheiten besitzt eine basische Helix-Loop-Helix-Struktur (bHLH) und eine PAS-Domäne. PAS ist ein Akronym für die zuerst entdeckten Vertreter dieser Proteinfamilie PER-ARNT-SIM (Per, periodic; SIM, single minded) (Gu et al. 2000). Die bHLH-Domäne definiert eine große Familie von dimeren Transkriptionsfaktoren bei Eukaryoten, bei denen die HLH-Domäne die Dimerisierung und die basische Domäne die Bindung an die DNA vermittelt. Die bHLH-PAS-Proteine gehören zu einer relativ kleinen Transkriptionsfaktorenfamilie (Crews und Fan 1999), die zusätzlich die PAS-Domäne, zur Dimerisierung benutzen (Jiang et al. 1996). Die Transkriptionsfaktoren werden durch Untereinheiten zweier Proteinklassen gebildet, die miteinander Heterodimäre bilden können (Tab. 4). Zu den bHLH-PAS-Klasse I-Proteinen gehören die Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor-Untereinheiten. Alle Klasse I Untereinheiten, wie HIF-1α, -2α und -3α können potentiell mit den Klasse II Untereinheiten, ARNT (HIF-1β), ARNT2 oder ARNT3, Heterodimäre bilden.

Tab. 4: **bHLH-PAS-Proteine**

Klasse I	Klasse II
AhR[1]	ARNT (HIF-1β)[10]
CLOCK[2]	ARNT2[11]
HIF-1α[3]	ARNT3 (BMAL1/MOP3)[12]
HIF-2α (EPAS1/HLF/HRF/MOP2)[4]	
HIF-3α[5]	
NPAS1 (MOP5)[6]	
NPAS2 (MOP4)[7]	
SIM1[8]	
SIM2[9]	

(1) Burbach et al. 1992; (2) King et al. 1997; (3) Wang GL et al. 1995; (4) Ema et al. 1997; Flamme et al. 1997; Hogenesch et al. 1997; Tian et al. 1997; (5) Gu et al. 1998; (6) Hogenesch et al. 1997; Zhou et al. 1997; (7) Hogenesch et al. 1997; Zhou et al. 1997; (8) Fan et al. 1996; (9) Fan et al. 1996; (10) Hoffman et al. 1991; (11) Hirose et al. 1996; (12) Hogenesch et al. 1997; Ikeda M und Nomura 1997; Takahata et al. 1998.
AhR: aryl hydrocarbon receptor; bHLH: basische Helix-Loop-Helix-Struktur; BMAL: brain and muscle ARNT-like; EPAS: endothelial PAS domain protein; HIF-1: Hypoxie-induzierbarer Faktor 1; HLF: HIF-1α-like factor; HRF: HIF-1α-related factor; MOP: member of the PAS domain protein; NPAS: neuronal PAS domain protein; PAS: periodic (PER)-aryl hydrocarbon-nuclear-translocator (ARNT)-single minded (SIM).

HIF-1α- und ARNT (HIF-1β)-mRNA wird von vielen, wenn nicht sogar allen humanen und Nagetier-Gewebszellen, exprimiert (Wenger et al. 1996; Wiener et al. 1996). Im

Gegensatz dazu werden die anderen HIF-Untereinheiten in einigen wenigen spezialisierten Gewben gebildet, wie z.B. HIF-2α, das durch im Wachstum befindliche vaskuläre Endothelzellen, Lungenzellen des Foetus und durch Katecholamin-produzierende Zellen gebildet wird (Ema et al. 1997; Flamme et al. 1997; Hogenesch et al. 1997; Tian et al. 1997; Jain et al. 1998; Tian et al. 1998). Durch sein ubiquitäres Vorkommen scheint HIF-1α eine besonders wichtige Rolle bei der Hypoxie-vermittelten Signalübertragung auf die Transkriptionsaktivität zahlreicher Zelltypen zu spielen. Tierexperimente zeigen ebenfalls, dass HIF-1 eine zentrale Rolle bei der Anpassung des Organismus an Sauerstoffmangelsituationen, nicht nur auf zellulärer sondern auch auf systemischer Ebene, spielt (Iyer et al. 1998; Ryan et al. 1998; Kotch et al. 1999; Yu AY et al. 1999; Shimoda et al. 2001; Kline et al. 2002;).

5.1.2 Induktionswege des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors 1

Die Mechanismen, wie durch Hypoxie die Aktivierung von HIF-1 vermittelt wird, sind noch nicht detailiert bekannt. Mögliche Modelle zur Sauersoff-abhängigen Signaltransduktion gehen von sauerstoffbindenden Hämproteinen und der Bildung reaktiver Sauerstoffprodukte aus (Semenza 2000). Des Weiteren wurde eine Sauerstoff-abhängige Prolin- und Asparaginhydroxylierung (Ivan et al. 2001; Jaakkola et al. 2001; Lando et al. 2002 a; Lando et al. 2002 b) beschrieben. Der zuletzt genannte Mechanismus scheint besonders wichtig für die Stabilität der HIF-1α-Untereinheit und ihre Rekrutierung durch Coaktivatoren zu sein. Die Aktivität von HIF-1 wird in erster Linie durch die HIF-1α-Untereinheit limitiert; während unter O_2-Einfluß die HIF-1β-Untereinheit stabil bleibt, wird die HIF-1α-Untereinheit mit einer Halbwärtszeit von weniger als 5 min vergleichsweise schnell deaktiviert. Für die HIF-1α- und HIF-2α-Deaktivierung ist der Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System verantwortlich (Salceda und Caro 1997; Huang et al. 1998), was durch die Bindung des von-Hippel-Lindau-Tumorsupressor-Proteins (pVHL) als E3-Komponente des Ubiquitin-Proteasom-Systems an HIF-1α vermittelt wird (Iwai et al. 1999; Maxwell et al. 1999; Tanimoto et al. 2000). Das pVHL bindet jedoch erst dann an die HIF-1α-Untereinheit, wenn diese O_2-abhängig an den Prolinresten P402 und P564 hydroxyliert wurde (Bruick und McKnight 2001; Epstein et al. 2001; Ivan et al. 2001; Jaakkola et al. 2001; Masson et al. 2001; Yu F et al. 2001) (Abb. 25).

Die HIF-1-Transkriptionsaktivierung wird ebenfalls über die O_2-abhängige Hydroxylierung von HIF-1α und HIF-2α im Bereich der carboxyterminalen Transaktivierungsdomäne reguliert. Die Bindung der Transkriptionscoaktivatoren CBP/p300 an die HIF-1-carboxyterminale Transaktivierungsdomäne (TAD-C) ist für die Transkriptionsinduktion durch HIF-1 entscheidend (Arany et al. 1996; Ema et al. 1999). Diese Vorgänge werden

durch die O_2-abhängige Hydroxylierung von HIF-1α am Asparagin 803 im TAD-C Bereich durch FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) negativ beeinflusst (Lando et al. 2002 a, Lando et al. 2002 b) (Abb. 25).

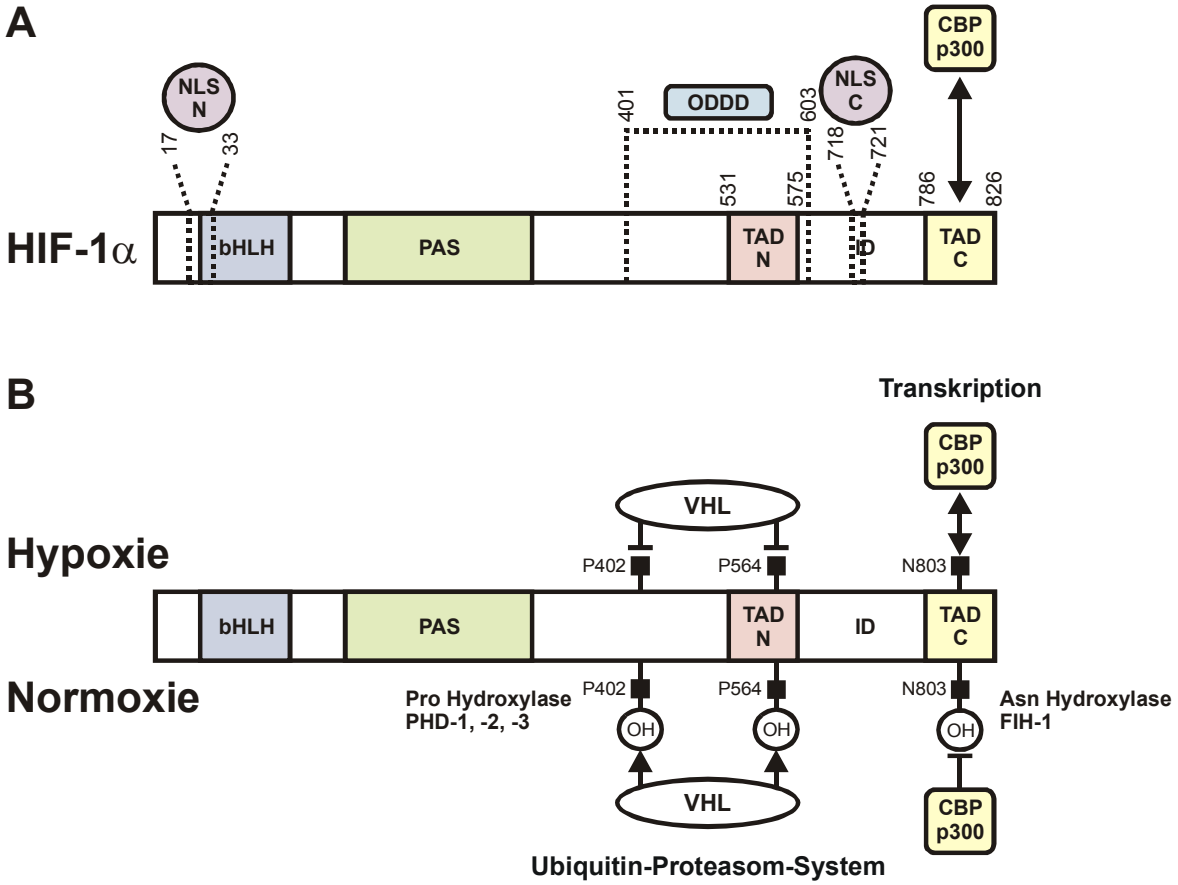

Abb. 25: **Struktur und die Sauerstoff-abhängige Regulation von HIF-1α.** (A) HIF-1α ist ein Polypeptid, das aus 826-Aminosäuren besteht. Die basische Helix-Loop-Helix (bHLH)-Domäne und die PAS-Domäne (periodic (PER)-aryl hydrocarbon-nuclear-translocator (ARNT)-single minded (SIM)) sind an der Heterodimerisierung der Untereinheiten beteiligt, was indirekt ebenso für die Bindung des HIF-1 an die DNA zuständig ist. Die regulatorischen Domänen von HIF-1α sind NLS-N (aminoterminal nuclear localisation signal), NLS-C (carboxyterminal nuclear localisation signal), die ODDD (oxygen-dependent degradation domain), die amino- und carboxyterminale-Transaktivierungsdomäne (TAD-N und TAD-C) sowie die transkriptionsinhibierende Domäne (ID) (Semenza, 2000) (B) Sauerstoff-abhängige Hydroxylierungsvorgänge, die die HIF-1α Stabilität und Transkriptionsaktivität regulieren. Unter O_2-Einfluss wird HIF-1α an Prolinresten 402 und 564 (P402 und P564) und am Asparaginrest 803 (N803), die im Bereich der carboxy- und aminoterminalen Transaktivierungsdomänen lokalisiert sind, hydroxyliert (OH). Die Hydroxylierung von P402 und P564 durch die Prolylhydroxylasen PHD-1, -2 oder -3 (ebenfalls als HIF-1α Prolylhydroxylasen-1, -2 oder -3 bekannt) ist für die Bindung des von-Hippel-Lindau-Tumorsupressor-Proteins (VHL) erforderlich, das seinerseits den E3-Ubiquitin-Proteinligase-Komlex (bestehend aus Elongin B, Elongin C, CUL2 und RBX1) rekrutiert und den Abbau von HIF-1α über das Ubiquitin-Proteasom-System initiiert. Die Hydroxylierung von N803 durch die Asparagin-Hydroxylase (Asn-Hydroxylase) FIH-1 (factor-inhibiting HIF-1) verhindert die Bindung der TAD-N von HIF-1α mit der TAZ-Domäne (transcriptional adapter zinc binding 1 domain) des Transkriptionscoaktivators p300 und CBP (CREB-binding protein), was eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsaktivierung durch HIF-1 von Hypoxie-responsiven Genen spielt (Semenza 2002).

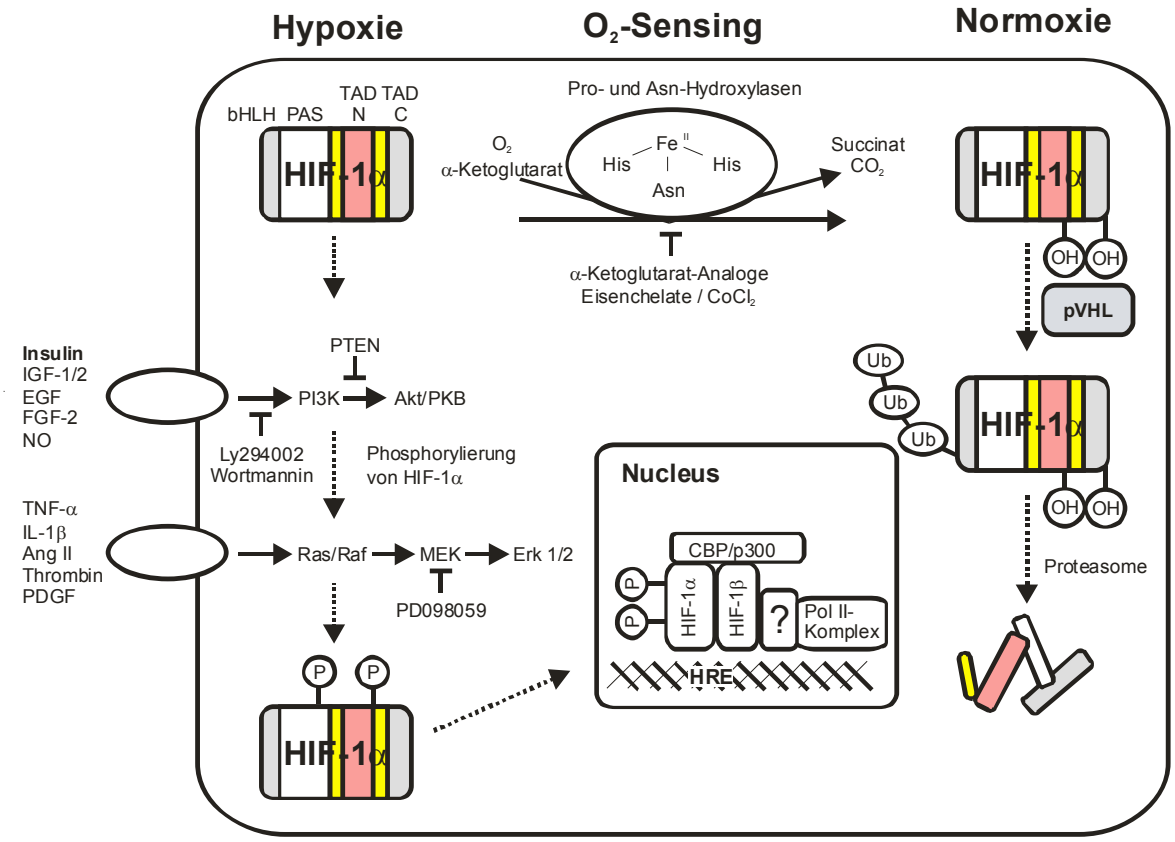

Abb. 26: **Modell der Regulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1.** Bei Hypoxie liegt HIF-1α in stabiler, nicht hydroxylierter Form vor und wird über den PI3K/PKB- oder MAP-Kinase-Kaskade-Signalweg modifiziert. Der in den Nucleus translozierte HIF-1 (HIF-1α/HIF-1β) rekrutiert Coaktivatoren und induziert die Transkription Hypoxie-responsiver Gene. Unter Sauerstoffeinfluss wird HIF-1α durch die Sauerstoff-abhängige Prolylhydroxylase hydroxyliert und dem Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System, was durch pVHL vermittelt wird, zugeführt. Des Weiteren führt die Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung von HIF-1α durch Asparagin-Hydroxylasen zur Hemmung der Bindung der Transkriptionscoaktivatoren CBP/p300 (Wenger 2002). Erklärung siehe auch Text. Ang II: Angiotensin II; Asn: Asparagin; bHLH: basische Helix-Loop-Helix-Struktur; EGF: epidermal growth faktor; Fe^{II}: Eisen2+; FGF-2: fibroblast growth factor-2; HIF-1α, -1β: Hypoxie-induzierbarer Faktor-1α, -1β; His: Histidin; HRE: Hypoxie-responsives Element; IGF-1/2: insulin-like growth factor 1/2; Erk 1/2: extracellular-ligand-regulated kinase 1/2; IL-1β: Interleukin-1β; MEK: mitogen-activated protein kinase kinase; PAS: (PER) periodic-(ARNT) aryl hydrocarbon receptor (AhR) nuclear translocator-(SIM) single minded; PDGF: platelet-derived growth factor; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PKB: Proteinkinase B; Pro: Prolin; PTEN: deletiertes Phosphatase-Tensin-Homolog von Chromosom 10 mit einer Phosphoinositid-Lipid-3-Phosphatase-Aktivität; pVHL: von-Hippel-Lindau-Tumorsupressor-Protein; TAD-N, -C: amino- und carboxyterminale Transaktivierungsdomäne; TNF-α: Tumornekrose-Faktor-α; Ub: Ubiquitin.

Die an der HIF-1α-Regulation beteiligten Prolylhydroxylasen sind die drei HIF-Prolylhydroxylasen (HPH)-1, -2 und -3 (Bruick und McKnight 2001; Epstein et al. 2001). In seiner aktiven Form enthalten die Enzyme im aktiven Zentrum Fe^{2+}, wo α-Ketoglutarat und O_2 schrittweise als Donor der benötigten Reduktionsäquivalente angelagert werden. Bei der anschließenden Hydroxylierung wird ein Atom des Sauerstoffmoleküls als Prolyl-OH-Gruppe eingebaut, das andere Atom zur Oxidation der nach Decarboxylierung von α-Ketoglutarat im entstehenden Succinatsemialdehyd vorhandenen Carbonylgruppe verwendet. Ein Modell der möglichen regulatorischen Mechanismen, die an der

Aktivierung bzw. Hemmung des Hypoxie-induzierbaren Faktors beteiligt sind, sind in Abb. 26 dargestellt.

In dieser Arbeit konnte in Transfektionsversuchen mit dem pGL3PAI-766-Luc-Genkonstrukt, der die zwei Hypoxie-responsiven Elemente (HRE-1, -175/-158; HRE-2, -165/-158) des PAI-1-Promotors enthält, eine Induktion der Luc-Aktivität unter arteriellem und venösem pO_2 durch Insulin beobachtet werden. Durch Wortmannin konnte die Insulin- und Hypoxie-induzierte Luc-Aktivität gehemmt werden. Diese Beobachtung kann dahingehend gewertet werden, dass sowohl bei der Insulin- als auch Hypoxie-abhängigen Induktion der PAI-1-Genexpression der PI3K/PKB-Signalweg, beteiligt sein könnte. In Transfektionsversuchen mit pGL3PAI-766M1-Luc und pGL3PAI-766M2-Luc, in denen das HRE-1 (pGL3PAI-766M1-Luc) oder das HRE-2 (pGL3PAI-766M2-Luc) in der PAI-1-Promotorregion mutiert sind und vor dem Luciferase-(Luc)-Gen fungieren, wurde die Luc-Aktivität weder durch Insulin noch durch Hypoxie beeinflusst. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass die zwei HRE-Promotorelemente an der PAI-1-Genregulation über den PI3K/PKB-Signalweg durch Insulin und Hypoxie mit dem Transkriptionsfaktor HIF-1 an der Regulation beteiligt sein könnten. Experimente mit humanen Prostatakarzinomzellen zeigten ebenfalls, dass der PI3K-Hemmstoff Wortmannin und der Hemmstoff LY294002 die Induktion von HIF-1α durch Insulin und EGF (epidermal growth faktor) aufheben kann (Jiang et al. 2001).

Es ist bekannt, dass Gene, deren Expression durch Hypoxie positiv reguliert wird und die eine wichtige Rolle beim Glukose- und Energiemetabolismus spielen (Granner und Pilkis 1990; Loike et al. 1992; Taha et al. 1999) wie Erythropoetin (Masuda et al. 1997) und VEGF (Sato K et al. 1995), ebenfalls durch Insulin induziert werden. Das führte zu der Annahme, dass die Hypoxie- und Insulin-Signalwege Gemeinsamkeiten aufweisen könnten (Pilkis und Granner 1992; Bunn und Poyton 1996).

In mit Insulin stimulierten humanen embryonalen Nierenzellen 293 und der humanen Hepatomzelllinie HepG2 konnte eine Steigerung der HIF-1α-Proteinmenge beobachtet werden (Feldser et al. 1999; Stiehl et al. 2002). In EMSA-Experimenten mit Zellkernextrakten aus HepG2 Zellen und L8 Rattenskeletmuskelmyoblasten, die mit Insulin stimuliert wurden, konnte durch Einsatz von Oligonukleotiden, die mit HRE-Sequenzen des EPO-Gens korrespondierten, eine Induktion von aktiven HIF-1-Komplexen gezeigt werden (Zelzer et al. 1998). Des Weiteren konnte durch Insulin die Induktion eines Luc-Reporter-Genkonstrukts mit fünf Kopien des EPO-HRE als Enhancerelement beobachtet werden (Zelzer et al. 1998).

Neben Insulin, konnte durch andere Hormone, Wachstums- und Gerinnungsfaktoren wie IGF (insulin-like growth factor) (Zelzer et al. 1998; Feldser et al. 1999), Thrombin (Gorlach

et al. 2001), Angiotensin II (Richard et al. 2000) und TNF-α (Tumornekrose-Faktor-α) (Hellwig-Burgel et al. 1999) eine Induktion der HIF-1α-Proteinmenge und Aktivität unabhängig von der Sauerstoffkonzentration gezeigt werden. Die genauen Mechanismen und Signalwege dieser Beobachtungen sind noch nicht hinreichend bekannt, so dass sowohl unterschiedliche MAPKs sowie der PI3K/PKB-Induktionsweg als mögliche Aktivierungsmechanismen in Frage kommen.

5.1.3 Die Rolle des PI3K/PKB-Signalwegs in der Aktivierung der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Genexpression

Die Befunde dieser Arbeit, dass PI3K an der Induktion der PAI-1-Genexpression beteiligt sein könnte, wird weiterhin durch die Beobachtung gestützt, dass die durch den nerve-growth-factor induzierte PAI-1-mRNA-Expression durch Wortmannin in Rattenphäochromozytomzellen PC12 gehemmt werden konnte (Takahashi et al. 2000) und dass die Insulin-induzierte PAI-1-Proteinexpression in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 durch den Hemmstoff LY294002 ebenfalls aufgehoben werden konnte (Banfi et al. 2001). Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen wurde in einer anderen Arbeit, die den Signaltransduktionsweg der Insulin-vermittelten Aktivierung der PAI-1-Genexpression untersuchte, gezeigt, dass durch die PI3K eine Proteinkinase-C- und schließlich MAP-Kinase-Aktivierung stattfindet (Banfi et al. 2001). Folglich scheint in humanen Zellreihen unterhalb der PI3K mehr als nur ein Signalweg an der durch Insulin vermittelten PAI-1-Genregulation beteiligt zu sein.

Der Transkriptionsfaktor, der die Expressionsaktivierung des humanen PAI-1 über den PKC/MAPK-Signalweg in HepG2 Zellen vermittelt sowie die Position des Insulin-responsiven Elements innerhalb des humanen PAI-1-Promotors wurden bisher noch nicht identifiziert. In EMSA- und Cotransfektionsversuchen wurde gezeigt, dass drei Regionen innerhalb des humanen PAI-1-Promotors, -777/-741, -157/-128 und -93/-62 für die PAI-1-Genaktivierung verantwortlich sein könnten (Banfi et al. 2001). Hypoxie-responsive Elemente im Bereich des humanen PAI-1-Promotors, entsprechend denen des Ratten-PAI-1-Pomotors, sind an Position -158/-151 und -194/-187 lokalisiert (Fink et al. 2002). Die partielle Übereinstimmung der HRE-Sequenz -158/-151 mit einer der putativen Insulin-responsiven Sequenzen -157/-128 lässt erneut die Annahme zu, dass HIF-1 auch an der Insulin-vermittelten Aktivierung des humanen PAI-1-Promotors beteiligt sein könnte.

Des Weiteren wird angenommen, dass MAP-Kinasen die Transkriptionsaktivität von HIF-1 über die Phosphorylierung ihrer regulatorischen Domänen regulieren (Richard et al. 1999; Zundel et al. 2000). Für den PI3K/PKB-Signalweg wird angenommen, dass die Regulierung der Aktivität von HIF-1 in erster Linie über die Stabilisierung der HIF-1α-

Untereinheit vermittelt wird (Zundel et al. 2000; Sodhi et al. 2001). Es wurde ebenfalls beschrieben, dass der PI3K/PKB-Signalweg an der NO-abhängigen (Sandau et al. 2000), Thrombin-abhängigen (Gorlach et al. 2001), Heregulin-abhängigen (Laughner et al. 2001) und Insulin-abhängigen (Treins et al. 2002) HIF-1-Aktivierung unter normalen Sauerstoffkonzentrationen verantwortlich ist.

5.1.4 Insulin- und HIF-abhängige PAI-1-Genexpression unter physiologischen und pathophysiologischen Gesichtspunkten

Die Induktion der PAI-1-Expression durch Insulin über HIF-1 kann eine Rolle in der Genese kardiovaskulärer Erkrankungen spielen. HIF-1 scheint an der Neovaskularisation von ischämisch geschädigtem Myokard über eine VEGF-Aktivierung beteiligt zu sein (Forsythe et al. 1996; Lee SH et al. 2000). Die PAI-1-Plasmakonzentration ist ebenfalls bei Hyperinsulinämie, Hypertriglyceridämie, arterieller Hypertonie, Adipositas und Diabetes mellitus Typ II erhöht. Bei diesen Erkrankungen liegt ein gesteigertes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen vor, was mit den erhöhten PAI-1-Konzentrationen im kausalen Zusammenhang stehen könnte (Bastard et al. 2000; Kohler und Grant 2000). Die Hemmung der Fibrinolyse durch die PAI-1-Überexpression wird als ein möglicher Mechanismus beschrieben, der an der Genese von kardiovaskulären Erkrankungen insbesondere bei Hyperinsulinämie beteiligt ist (Wiman 1995). Daten hinsichtlich der Expressionsinduktion des humanen PAI-1 durch Insulin *in vivo* sind zum Teil wiedersprüchlich. Manche in-vivo-Studien zu der Wirkung von Insulin auf die PAI-1-Expression fanden durch Insulininfusionen keinen Effekt auf die PAI-1-Konzentration im Blut der Probanden oder sogar eine Reduktion der PAI-1-Konzentration (Grant et al. 1990; Landin et al. 1991; Vuorinen-Markkola et al. 1992). Im Gegensatz dazu konnte eine Induktion der PAI-1-Expression lokal durch Insulininfusionen beobachtet werden (Carmassi et al. 1999). Des Weiteren wurde bei Hyperinsulinämie in Kombination mit Hypertriglyceridämie und Hyperglycämie eine erhöhte PAI-1-Konzentration im Blutplasma festgestellt (Calles-Escandon et al. 1998).

Weiterführende Experimente zur vollständigen Aufklärung der physiologischen Rolle der PAI-1-Induktion durch Insulin und der daran beteiligten molekularen Mechanismen sind vor allem für das Verständnis der Pathogenese von cerebro- und kardiovaskulären Erkrankungen von besonderer Bedeutung.

5.2 Die Glucagon-abhängige Induktion der Ratten-PAI-1-Genexpression wird über den zweiten Boten zyklisches Adenosin-3´,5´-monophosphat (cAMP) vermittelt

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Glucagon-abhängige Induktion der Ratten-PAI-1-Genexpression über den second messenger cAMP vermittelt wird. Durch den spezifischen kompetitiven cAMP-Hemmstoff RpcAMPS wurde die Glucagon- und cAMP-abhängige Induktion der PAI-1-Expression aufgehoben. Da in den durchgeführten Tranfektionsversuchen mit den HRE-mutierten-PAI-1-Promotor-Genkonstrukten die Glucagon-abhängige Induktion nicht mehr nachgewiesen werden konnte, könnte in den Signalweg, über den möglicherweise die Induktion der PAI-1-Expression durch cAMP stattfindet, ebenfalls eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 und seine Bindung an die Hypoxie-responsiven Elemente im PAI-1-Promotor involviert sein.

5.2.1 Zellspezifische Regulation der PAI-1-Genexpression durch cAMP

In vielen Zellreihen, wie humanen Adipozyten, Thrombozyten und auch primär kultivierten Hepatozyten konnte eine Regulation der PAI-1-Genexpression durch zyklische Nukleotide oder Signalstoffe, die zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führen, gezeigt werden. Dabei wurde kein einheitlicher Regulationseffekt durch cAMP, sondern sowohl eine hemmende als auch aktivierende Wirkung in den unterschiedlichen Zellsystemen beobachtet.

In Untersuchungen mit vaskulären Endothelzellen von Mensch, Ratte und Rind wurden durch Forskolin, cAMP-Analoge-Substanzen oder IBMX (Isobutylmethylxanthin) die PAI-1-mRNA-Konzentration (Konkle et al. 1990; Sugano et al. 2001), die PAI-1-Synthese (Slivka und Loskutoff 1991; Zidovetzki et al. 1999) und die PAI-1-Proteinkonzentration im Medium (Santell und Levin 1988; Rydholm et al. 1995) vermindert. Ähnliche Ergebnisse erbrachten Experimente mit z.B. humanen Fibroblasten (Georg et al. 1990; Bergonzelli et al. 1992; DiBattista et al. 1994), Epithelzellen der Lunge (Nerz) (Thalacker und Nilsen-Hamilton 1992), glatten Muskelzellen (Ratte und Pawian) (Ren et al. 1997; Lau und Ho 2002), Sertolizellen (Ratte und Affe) (Liu et al. 1995; Le Magueresse-Battistoni et al. 1998), Osteoblasten (Fukumoto et al. 1992), Astrozyten (Tranque et al. 1992) und Myoidzellen der Ratte (Nargolwalla et al. 1990).

Eine durch Prolactin und LH (luteotropes Hormon) induzierte PAI-1-Expression wurde in Granulosazellen der Ratte beobachtet (Liu et al. 1998). Bei Keratinozyten, die mit Dibutyryl-cAMP inkubiert wurden, konnte eine PAI-1-mRNA-Induktion beobachtet werden, wobei eine PAI-1-Proteinkonzentrationserhöhung nicht nachgewiesen werden konnte (Bator et al. 1998).

Auch die Regulationsmechanismen der PAI-1-Expression in Fettgewebszellen durch cAMP sind nicht genau bekannt. Bei Adipositas wurden im Plasma der Probanden erhöhte PAI-1-Konzentrationen festgestellt, so dass das Fettgewebe als Quelle der Überproduktion angenommen wurde (Juhan-Vague et al. 2000; Lijnen und Juhan-Vague 2002). Die Inkubation von ausdifferenzierten Adipozyten mit IBMX führte zu einer erhöhten Expression von PAI-1-Protein, während Glucagon keinen nennenswerten Effekt auf die PAI-1-Expression hatte (Seki et al. 2001). Experimente mit humanen Fettgewebsexplantaten und primär kultivierten humanen Adipozyten zeigten durch cAMP eine Reduktion der PAI-1-mRNA-Konzentration (Halleux et al. 1999; Gottschling-Zeller et al. 2000).

Die Regulation der PAI-1-Expression durch cAMP in Hepatozyten und Leberzelllinien ist ebenfalls nicht einheitlich. Die basale PAI-1-Expression der Rattenleber *in vivo* und bei primär kultiviertern Rattenhepatozyten ist gering. Durch Inkubation von Hepatozyten mit cAMP oder Substanzen, die zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration führen, wird die PAI-1-Genexpression, was auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, induziert (Heaton et al. 1989; Uno et al. 1997). Im Gegensatz dazu kommt es in Hepatomzellreihen oder proliferierenden Hepatozytenkulturen, die eine erhöhte basale PAI-1-Expressionsaktivität aufweisen, zu einer Hemmung der PAI-1-Bildung durch cAMP (Heaton und Gelehrter 1990; Uno et al. 1998).

Im Gegensatz zu dieser Arbeit mit primären Hepatozyten zeigen Untersuchungen mit der Rattenhepatomzellreihe HTC zu den Regulationsmechanismen der PAI-1-Expression durch cAMP, dass diese durch eine posttranskriptionelle Regulation des PAI-1-mRNA-Abbaus stattfinden könnte (Heaton et al. 2003). An diesen Vorgängen ist ein Bereich von ca. 134 Nucleotiden in der 3´-untranslantierten Region der PAI-1-mRNA beteiligt (Heaton et al. 1998). Im Bereich dieser PAI-1-cAMP-responsiven Sequenz (PAI-CRS) wurden Adenin- und Uracil-reiche Regionen gefunden, wobei in erster Linie die A-reiche Region für die Stabilität der PAI-1-mRNA verantwortlich zu sein scheint (Tillmann-Bogush et al. 1999) (Abb. 27). Des Weiteren konnte eine Interaktion dieser Region mit einem neu entdeckten Protein, das als PAI-RNA-bindendes Protein 1 (PAI-RBP1) benannt wurde, nachgewiesen werden, das an der Regulation der PAI-1-mRNA-Stabilität durch zyklische Nukleotide beteiligt zu sein scheint (Heaton et al. 2001). Die genauen Regulationsmechanismen der PAI-1-Expression über eine posttranskriptionelle Modifikation der PAI-1-mRNA sind derzeit nicht genau bekannt. Ebenso ist unklar, ob dieser Weg auch in anderen Zellsystemen an der Regulation der PAI-1-Expression durch zyklische Nukleotide beteiligt ist und warum in den oben erwähnten Zellreihen, wie auch in dieser Arbeit, durch cAMP eine Induktion der PAI-1-Expression stattfindet.

In einer weiteren Arbeit, die die Regulation der PAI-1-Expression durch cAMP und Proteinkinase C untersucht, reduzierte Forskolin, die durch PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) induzierte PAI-1-mRNA-Expression in humanen MCF7 Brustkarzinomzellen. Transfektionsversuche zeigten aber, dass beide Effekte über PAI-1-Promotorsequenzen im 5´-flankierenden Bereich vermittelt werden, was, wie die vorliegende Arbeit, für einen Regulationsmechanismus auf der Transkriptionsebene spechen würde (Knudsen et al. 1994).

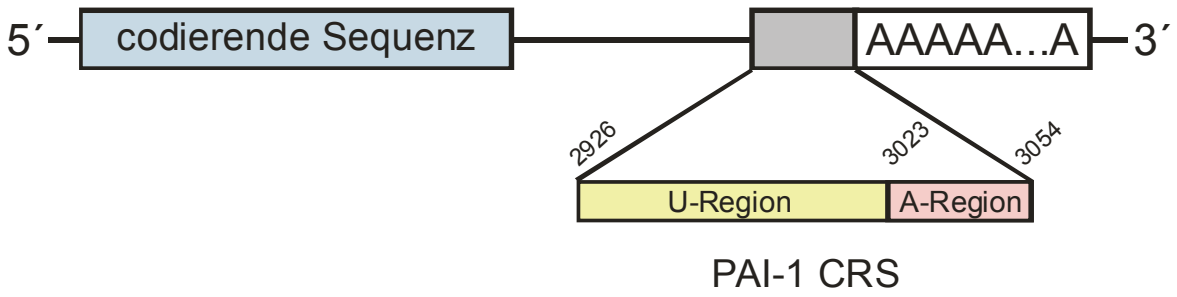

Abb. 27: **Die cAMP-responsive Region in der PAI-1-mRNA.** Erklärung siehe Text. A: Adenin; U: Uracil; PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1; CRS: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-cAMP-responsive Sequenz.

5.2.2 Alternative Signaltransduktionswege des second messengers cAMP

Die Glucagonwirkung wird über einen Glucagonrezeptor vermittelt, der aufgrund seiner Struktur zur Gruppe der R7G- oder 7TMD-Rezeptoren gehört (Jelinek et al.1993; Mayo et al. 2003). An der Signaltransduktion des Glucagonrezeptors sind G-Proteine beteiligt: $G_s\alpha$, das zur Aktivierung der Adenylatzyklase, cAMP-Bildung und Proteinkinase-A-Aktivierung führt und G_q, das die Phospholipase C aktiviert, was zur Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat und intrazellulärer Calziumkonzentrationserhöhung führt. Neben Glucagon wird auch die Signaltransduktion weiterer Hormone, wie z.B. der Hypophysenhormone ACTH (adrenocorticotropes Hormon), FSH (Follikel stimulierendes Hormon), LH (luteotropes Hormon) oder TSH (Thyreoidea stimulierendes Hormon) über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt.

Der second messenger cAMP (zyklisches Adenosin-3´,5´-monophosphat) wurde erstmals 1968 mit cAMP-abhängigen Proteinkinasen als deren Aktivator in Verbindung gebracht (Langan 1968; Walsh et al. 1968; Kuo und Greengard 1969), wodurch ein Prototyp für die Signalübertragung vieler Hormone und anderer Stimulie wie Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter etabliert wurde. Bis heute wurde dieses Modell über die Entdeckung einer Vielzahl von Isoformen der Adenylatzyklase (Sunahara et al. 1996; Hanoune et al. 1997), Phosphodiesterasen (Conti 2000) und Proteinkinasen A (PKA) (Jahnsen et al.

1986) sowie von PKA-Ankerproteinen (Scott und McCartney 1994; Pawson und Scott 1997; Carr et al. 1999) erweitert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass einige der cAMP-Effekte über den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP-responsive-element-binding protein) (Gonzalez und Montminy 1989; Habener et al. 1995; Shaywitz und Greenberg 1999) und die Coaktivatoren CBP/p300 (CREB-binding protein) (Arias et al. 1994; Kwok et al. 1994) vermittelt werden. CREB ist jedoch nicht der einzige Transkriptionsfaktor, der durch die intrazelluläre Konzentrationserhöhung von cAMP aktiviert wird. In Ovarien werden beispielsweise durch eine cAMP-Erhöhung Sp1 (stimulatory protein 1), USF (upstream stimulatory factor) und die Östrogenrezeptoren α/β aktiviert (Morris und Richards 1996; Alliston et al. 1997; Clemens et al. 1998; Sharma et al. 1999; Chen S et al. 2000). Die Rekrutierung weiterer Faktoren wie Egr-1 (early growth response protein 1), der AP-1-Komponenten Fra2 und JunD sowie C/EBPβ wurde durch cAMP ebenfalls induziert (Sirois und Richards 1993; Sharma und Richards 2000). CREB seinerseits kann nicht nur durch die PKA, sondern auch durch z.B. Calmodulinkinase IV und RSKB (ribosomale S6 Kinase B) phosphoryliert werden (Habener et al. 1995; Pierrat et al. 1998; Shaywitz und Greenberg 1999). Der Coaktivator CBP/p300 bindet ebenfalls nicht nur an CREB, sondern an eine Vielzahl anderer Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFκB (nuclear factorκB) (Gerritsen et al. 1997), an Vertreter der Kernrezeptorfamilie (Kurokawa et al. 1998), HIF-1 (Arany et al. 1996; Ema et al. 1999) und andere (Kawasaki et al. 1998 a; Yuan et al. 1999). Für die Funktion der PKA konnte gezeigt werden, dass sie an der Hemmung und auch Aktivierung anderer Signalkaskaden wie z.B. der MAP-Kinase-Kaskade in zellspezifischer Weise beteiligt ist (Vossler et al. 1997; Maizels et al. 1998; Gonzalez-Robayna et al. 2000; Qiu et al. 2000). Auch die G-Protein-Untereinheiten β und γ weisen neben der Steuerung der Aktivität von Gαs und AC-Aktivierung weitere regulierende Funktionen auf (Stephens et al. 1997; Metjian et al. 1999; Murga et al. 2000; Ueda et al. 2000). In spezialisierten Zellen, wie denen des olfaktorischen Systems, wurden durch zyklische Nukleotide regulierte Ionenkanäle gefunden, die durch cAMP direkt aktiviert werden können (Dhallan et al. 1990; Goulding et al. 1994). Dieses sind nur einige Beispiele der Vielzahl an Signalmechanismen, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und cAMP als second messenger vermittelt werden können. Sie führen jedoch zu der Annahme, dass das lineare Modell der PKA-Aktivierung durch cAMP lediglich einen Teil von möglichen Interaktionen der intrazellulären Signaltransduktionswege über cAMP darstellt (Bhalla und Iyengar 1999).

Beobachtungen, dass nicht alle der über TSH vermittelten Effekte durch Stimulation von Thyreoidzellen mit PKA erzielt werden können, führten zu der Annahme, dass weitere cAMP-abhängige jedoch PKA-unabhängige Signalmechanismen existieren müssen, die durch TSH vermittelt werden. PKA alleine konnte die Zellproliferation oder die

Thyreoglobulin-Expression nicht induzieren, obwohl die Thyreoperoxidase-Expression durch PKA alleine induziert wurde (Dremier et al. 1997). In Anlehnung an diese Ergebnisse wurden auch in anderen Zellsystemen cAMP-vermittelte jedoch PKA-unabhängige Signaltransduktionsmechanismen angenommen, wie z.B. bei der MAPK-Aktivierung in Melanozyten (Busca et al. 2000), der durch FSH induzierten Zelldifferenzierung in Granulosazellen (Gonzalez-Robayna et al. 2000), bei der Expressionsinduktion des fibrilären sauren Proteins in Gliazellen (Anciaux et al. 1997), der Actindepolarisation in Skelettmuskelzellen (Hirshman et al. 2001) sowie bei Hemmung der Interleukin-5-Freisetzung durch humane T-Lymphozyten (Staples et al. 2001). Die Annahme, dass diese zellspezifischen cAMP-abhängigen Vorgänge nicht über die PKA vermittelt werden basierten in erster Linie auf der Beobachtung, dass durch den PKA-spezifischen Hemmstoff H89 keine Hemmung dieser Effekte erzielt werden konnte. In Zusammenschau dieser Ergebnisse wurde die Existenz und ebenso eine wichtige Bedeutung von PKA-unabhängigen Mechanismen angenommen, die an der Signaltransduktion von cAMP beteilgt sind und gleichzeitig die PKA als Hauptvermittler der cAMP-Wirkung in Frage gestellt.

1998 wurden in zwei Publikationen neue Gene beschrieben, deren Proteinprodukte cAMP mit ähnlicher Affinität binden können, wie die regulatorischen Untereinheiten der Typ I PKA (de Rooij et al. 1998; Kawasaki et al. 1998 b). Des Weiteren wurde durch die beiden Arbeitsgruppen gezeigt, dass die neuen cAMP-bindenden Proteine Regionen aufwiesen, deren Struktur und Funktion denen von GEFs (Guanine nucleotide exchange factors) entsprach, die Ras-ähnliche GTP-asen durch den Austausch von GDP gegen GTP aktivieren können. In Anlehnung an diese Ergebnisse wurden die neuen Proteine als cAMP-GEF I und II bzw. Epac I und II (Exchange proteins activated by cAMP) benannt. Während Epac I, wie die PKA, in vielen unterschiedlichen Zelltypen gleichermaßen exprimiert wird, findet man die Epac-II-Bildung nur in Gehirn- und Nebennierenzellen (Kawasaki et al. 1998 b).

Rap1 war die erste GTP-ase, für die eine Aktivierung durch Epac beschrieben wurde (de Rooij et al. 1998; Kawasaki et al. 1998 b). Die Struktur der GTP-ase weist eine mehr als 50%ige Homologie zu der von Ras auf (Pizon et al. 1988; de Rooij et al. 1998; Kawasaki et al. 1998 b) und sowohl die GTP- als auch die putative katalytische Domäne von Rap1 und Ras sind identisch, so dass eine mögliche Regulation der gleichen Substrate durch Ras und Rap1 angenommen wird (Bos 1998). Weitere Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass Rap2 (Nancy et al. 1999; de Rooij et al. 2000) und möglicherweise auch Ras (Pham et al. 2000) durch die cAMP-GEFs aktiviert werden können.

Eine weitere strukturelle Besonderheit von Epac I und II ist deren DEP (Dishevelled, Egl-10, Plecstrin)-Domäne, die für die Translokation der Enzyme an die Plasmamembran

verantwortlich ist (de Rooij et al. 2000) (Abb. 8). Diese Positionierung bringt die cAMP-GEFs in die Nähe weiterer an der Plasmamembran lokalisierter Enzyme, wie PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), PDK1 (Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1) und PKB (Proteinkinase B) (Kandel und Hay 1999). Für die Translokation der cAMP-GEFs in die Mitochondrien scheint jedoch eine Struktursequenz im N-terminalen Bereich verantwortlich zu sein (Qiao et al. 2002). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation der Epacs vom Stadium des Zellzyklus, in dem sich die Zellen befinden, abhängig ist; während in der Metaphase Epacs in erster Linie im Bereich der Mitosespindel und der Zentriolen zu finden sind, sind sie in der Interphase und zum Ende des Zellzyklus perinukleär lokalisiert (Qiao et al. 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass Epacs eine wichtige Rolle bei mitotischen Vorgängen spielen könnten. Für die unterschiedliche cAMP-Wirkung auf die PAI-1-Expression in den verschiedenen Zelltypen könnten diese Ergebnisse ebenfalls eine Rolle spielen, denn die beobachtete Hemmung bzw. Induktion der PAI-1-Expression durch cAMP scheint in den untersuchten Zellreihen ebenfalls von deren Wachstumsstadium abhängig zu sein (Heaton et al. 1989; Heaton und Gelehrter 1990; Uno et al. 1997; Uno et al. 1998)

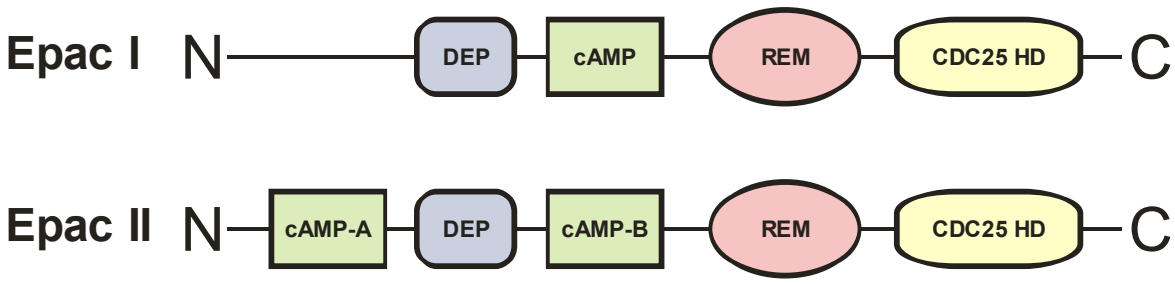

Abb. 28: **Struktur von Epac I und II.** Im C-terminalen Bereich gehören zur katalytische Region die CDC25-Homologie-Domäne und REM (Ras exchange motif), die für den Nucleotidaustausch zuständig sind. Obwohl die CDC25-Homologie-Domäne alleine die katalytischen Vorgänge vermitteln kann, was bei der GTP-ase Sos nachgewiesen werden konnte, (Coccetti et al. 1995; Lenzen et al. 1998) wird für REM eine die katalytische Aktivität modulierende Funktion angenommen (Margarit et al. 2003). Im N-terminalen regulatorischen Bereich befinden sich die cAMP-bindende Domäne und die DEP (Dishevelled, Egl-10, Plecstrin)-Domäne. Die DEP-Domäne vermittelt die Lokalisation von Epac im Bereich der Plasmamembran und ist nicht an den regulatorischen Vorgängen beteiligt. Die cAMP-bindende Domäne hemmt die katalytische Funktion von Epac in Abwesenheit von cAMP. Die Hemmung wird durch Bindung von cAMP aufgehoben. Epac II besitzt eine zweite cAMP-bindende Domäne im N-terminalen Bereich (cAMP-B). Diese scheint zur Aufrechterhaltung der inaktiven Form von Epac II jedoch nicht notwendig zu sein (de Rooij et al. 2000).

Die Entdeckung von Epac wirft eine Vielzahl von Fragen in Bezug auf die molekularen Mechanismen der cAMP-vermittelten Signaltransduktion auf. Beide cAMP-regulierten Proteine, sowohl PKA als auch Epac, werden gleichermassen in vielen unterschiedlichen Zelltypen exprimiert (de Rooij et al. 1998; Kawasaki et al. 1998 b), so dass eine intrazelluläre Konzentrationserhöhung von cAMP auch zur Aktivierung beider Enzyme und möglicherweise zur Aktivierung weiterer Zielproteine führt. Es ist denkbar, dass während

PKA zur Aktivierung der bekannten Signalwege führt, durch Epac eine Verbindung bzw. die Aktivierung anderer Tranduktionswege stattfindet.

Die Mechanismen, die zu den unterschiedlichen zellspezifischen Effekten von cAMP führen, sind noch unklar, wobei die durch cAMP aktivierten Epacs als alternativer Signaltransduktionsweg des cAMP für das Verständnis der unterschiedlichen durch cAMP-vermittelten Effekte von besonderer Bedeutung zu sein scheinen. Es wird angenommen, dass die wachstumshemmende Wirkung von cAMP zum Teil über die Hemmung des Ras/MAPK-Signalwegs durch PKA vermittelt wird (Qiu et al. 2000). Es wurde jedoch auch eine Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade durch cAMP beobachtet (Frodin et al. 1994; Vossler et al. 1997; Klinger et al. 2002).

Zu einem Modell, wie die MAP-Kinase-Kaskade durch cAMP aktiviert werden kann, führten folgende Beobachtungen. Als Antwort auf die intrazelluläre Erhöhung der cAMP-Konzentration wurde eine erhöhte Epac-Aktivität beobachtet (Altschuler et al. 1995; Vossler et al. 1997; Bos et al. 2001), die dann Rap1 aktivieren (de Rooij et al. 1998; Kawasaki et al. 1998 b). Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* B-Raf (Raf1) ein Substrat der GTPase Rap1 ist und durch diese aktiviert werden kann (Ohtsuka et al. 1996). Aufgrund dieser Beobachtungen sieht das Modell, wie der MAPK-Signalweg durch cAMP aktiviert wird wie folgt aus: G-Protein-gekoppelter Rezeptor / Adenylatzylatzyklase / cAMP / Epac / Rap1 / Raf1 (Ohtsuka et al. 1996; Vossler et al. 1997; de Rooij et al. 1998; Kawasaki et al. 1998 b).

Rap1 kann jedoch zelltypspezifisch auch durch Diacylglycerol, Phospholipase C und Calzium aktiviert werden (Franke B et al. 1997; McLeod et al. 1998; Zwartkruis et al. 1998;), so dass vielleicht auch noch weitere Wege existieren, die zur Aktivierung von Rap1 führen (M´Rabet et al. 1998). Rap1 kann auch durch die PKA in seinem C-terminalen Bereich phosphoryliert werden (Quilliam et al. 1991), was zu der Annahme führte, dass Rap1 durch diese Phosphorylierung aktiviert wird (Vossler et al. 1997). Die Rap1S180-Mutante, in der die PKA-Phosphorylierungsstelle fehlt, kann jedoch durch Epac als Antwort auf erhöhte cAMP-Konzentrationen weiterhin aktiviert werden (de Rooij et al. 1998). Darüberhinaus wird die biologische Funktion von Drosophila-Rap1 durch die Mutation der PKA-Phosphorylierungsstelle nicht beeinträchtigt (Asha et al. 1999). Welchen Stellenwert diese Prozesse *in vivo* einnehmen, ist jedoch noch unklar.

5.2.3 Alternative Aktivierungswege der Proteinkinase B

Entsprechend der zahlreichen durch cAMP regulierten Vorgänge beeinflusst cAMP die MAP-Kinase-Kaskade (Burgering et al. 1993; Wu et al. 1993; Graves et al. 1993; Cook und McCormick 1993; Frodin et al. 1994), den IP3-, Ca^{2+}-abhängigen (DeBernardi und

Brooker 1996; Rogue et al. 1998), den Jak/STAT- (David et al. 1996) oder auch den PI3K/PKB-Signalweg (Monfar et al. 1995; Du und Montminy 1998). Der PI3K/PKB-Transduktionsweg spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Zellproliferation und Apoptose (Rameh und Cantley 1999; Datta et al. 1999). Interessanterweise sind die cAMP-Effekte auf den PI3K/PKB-Signalweg zelltypspezifisch, wahrscheinlich PKA-unabhängig und seine Aktivierung korreliert mit den mitogenen Effekten von cAMP (Cass et al. 1999). Welche Rolle Epacs bei diesen Beobachtungen spielen, ist noch unklar. Angenommen wird ein Modell, bei dem PKA und Epac eine antagonistische Wirkung auf die PKB-Aktivität haben. Dabei führt Epac zur PI3K-abhängigen Aktivierung der PKB durch die Rap1-Aktivierung, während PKA die PKB-Aktivität hemmt (Mei et al. 2002) (Abb. 29).

Für die Modulation des PKB-Weges durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren scheinen die $\beta\gamma$-Untereinheiten der G-Proteine eine PI3K-abhängige Aktivierung der PKB zu vermitteln. Die $\beta\gamma$-Untereinheiten können die p110γ-Isoform der PI3-K aktivieren und schaffen damit erneut eine Beziehung zwischen den zwei Signaltransduktionsmechanismen, dem PI3K / PDK1 / PKB-Weg und dem der, wie der Glucagon-Signalweg, über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt wird (Stephens et al. 1997; Metjian et al. 1999; Murga et al. 2000; Ueda et al. 2000).

In weiteren Arbeiten wurde eine PI3K-unabhängige Aktivierung der PKB durch PKA beobachtet (Sable et al. 1997; Filippa et al. 1999). Es wird angenommen, dass PKB nicht durch eine direkte Phosphorylierung durch die PKA aktiviert wird, da die Mutation der einzigen für PKA möglichen Phosphorylierungsstelle bei PKB, Serin (Ser)422, die Aktivierung der PKB durch PKA nicht beeinträchtgt (Filippa et al. 1999). Ferner konnte der PI3K-spezifische Hemmstoff Wortmannin die durch Forskolin induzierte PKB-Aktivierung nicht aufheben (Sable et al. 1997). Es wurde gezeigt, dass PKB durch die Phosphorylierung an Threonin (Thr)308 aktiviert wird, während das Vorhandensein der Phosphorylierungsstelle Serin (Ser)473 der PKB, für die Aktivierung der Kinase, nach Stimulierung mit Forskolin, nicht notwendig zu sein scheint (Filippa et al. 1999). Bei der PKB-Aktivierung durch die CaM-K-Kinase (Ca^{2+}- und Calmodulin-abhängige Proteinkinase Kinase) konnte ebenfalls eine PI3K-unabhängige Phosphorylierung an Threonin (Thr)308 nachgewiesen werden (Yano et al. 1998). Auch für die PKB-Aktivierung durch PDGF scheint die Phosphorylierung an Serin (Ser)473 nicht notwendig zu sein (Bellacosa et al. 1998). Neben cAMP wurde auch durch Stressfaktoren, wie Hitze und Hyperosmolarität, eine PI3K-unabhängige Aktivierung der PKB beschrieben (Konishi et al. 1997).

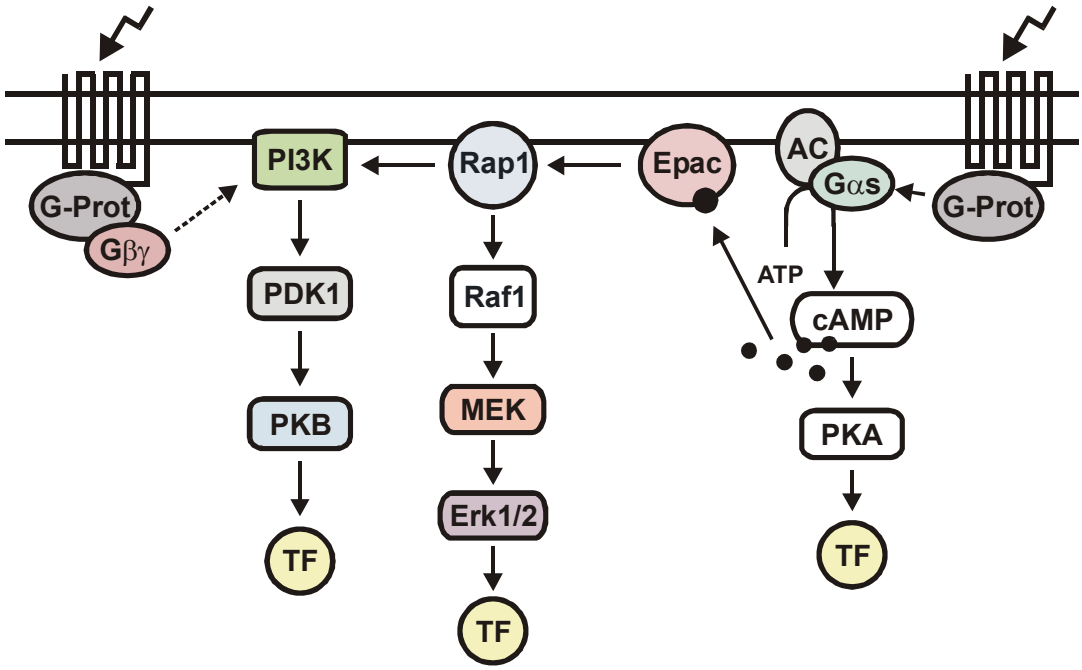

Abb. 29: **Modell der PI3K/PKB- und MAP-Kinase-Kaskade-Aktivierung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und cAMP.** Erklärung siehe Text. AC: Adenylatzyklase; cAMP: zyklisches Adenosin-3´,5´-monophosphat; Epac: Exchange proteins activated by cAMP; Erk1/2: extracellular-ligand-regulated kinase; Gαs, Gβγ und G-Prot: G-Proteine; MEK: mitogen-activated protein kinase kinase; PDK1: Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PKA: Proteinkinase A; PKB: Proteinkinase B; TF: Transkriptionsfaktor.

Die hier genannten möglichen Interaktionswege der Signaltransduktionsmechanismen zeigen, dass über den second messenger cAMP viele zelluläre Prozesse und Signalkaskaden beeinflusst werden können. Einige davon sind sicherlich zellspezifisch und die genaue Formulierung der bisher möglichen Modelle und ihre Relevanz für die PAI-1-Expression in unterschiedlichen Zellsystemen sind von großer Bedeutung.

5.2.4 An der Glucagon-abhängigen Induktion der PAI-1-Expression kann die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 über den PKB- und/oder MAP-Kinase-Weg beteiligt sein

Welcher der oben beschriebenen Wege über cAMP als second messenger an der Induktion der PAI-1-Expression beteiligt ist, ist noch unklar. In den hier durchgeführten Transfektionsversuchen mit pGL3PAI-766-Luc-Genkonstrukten, der die zwei Hypoxie-responsiven Elemente (HRE-1, -175/-158; HRE-2 -165/-158) des PAI-1-Promotors enthält, wurde eine Induktion der Luc-Aktivität unter arteriellem und venösem pO_2 durch Glucagon beobachtet. Da in mit pGL3PAI-766M1-Luc und pGL3PAI-766M2-Luc, in denen das HRE-1 (pGL3PAI-766M1-Luc) oder das HRE-2 (pGL3PAI-766M2-Luc) in der PAI-1-Promotorregion mutiert sind und vor dem Luciferase-(Luc)-Gen fungieren, transfizierten Hepatozyten die Luc-Aktivität weder durch Glucagon noch durch Hypoxie beeinflusst

werden konnte, darf angenommen werden, dass an der Glucagon-abhängigen Induktion der PAI-1-Expression diese Promotorelemente ebenfalls eine wichtige Rolle spielen.

Durch cAMP konnte in Transfektionsversuchen in HeLa Zellen mit Reportergenkonstrukten, wo drei HRE-Kopien des Erythropoetingens als Enhancerelement eingesetzt wurden, eine Induktion der Expression durch cAMP, jedoch nur bei Hypoxie, nachgewiesen werden (Kvietikova et al. 1997). Da in der vorliegenden Arbeit unabhängig vom pO_2 eine Induktion der PAI-1-Expression beobachtet werden konnte, ist das Vorhandensein weiterer PAI-1-Promotorelemente in enger Nachbarschaft zu den zwei HRE, die eine cAMP-abhängige Induktion der PAI-1-Expression vermitteln, denkbar. Eine Interdependence zwischen cAMP- und Hypoxie-responsiven Promotorelementen konnte ebenfalls für die Laktatdehydrogenase A nachgewiesen werden (Firth et al. 1995).

Durch Rp-cAMPS konnte in dieser Arbeit keine Hemmung der Hypoxie-induzierten PAI-1-Expression beobachtet werden, was im Einklang mit den Ergebnissen der Transfektionsversuche mit Erythropoetin-HRE-Konstrukten in HeLa Zellen steht (Kvietikova et al. 1997). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass cAMP kein Botenstoff der Hypoxie-abhängigen Expressionsinduktion ist und die HIF-1-Aktivität durch andere Signaltransduktionsmechanismen, wie den PI3K/PKB-Signalweg, induziert wird. Dafür spricht, dass eine Hemmung der Hypoxie-abhängigen Expressionsinduktion durch den PI3K-Hemmstoff Wortmannin beobachtet wurde (Takahashi et al. 2000; Jiang et al. 2001).

Ebenso ist die Bindung der Transkriptionscoaktivatoren CBP/p300, die durch cAMP aktiviert werden können, an HIF-1 für die transkriptionsinduzierende Funktion des Faktors entscheidend (Arany et al. 1996; Ema et al. 1999). Da aber die Bindung dieser Coaktivatoren durch O_2-abhängige Hydroxylierung von HIF-1α am Asparagin 803 (Lando et al. 2002 a, Lando et al. 2002 b) negativ beeinflusst wird, kann dieser Mechanismus nicht alleine an der cAMP-abhängigen PAI-1-Induktion unter Sauerstoffeinfluss beteiligt sein.

Obwohl HIF-1α initial als Hypoxie-sensitiver Transkriptionsfaktor identifiziert wurde konnte durch Hormone, Wachstumsfaktoren und Gerinnungsfaktoren wie Insulin, IGF (Zelzer et al. 1998; Feldser et al. 1999), PDGF (Richard et al. 2000), Angiotensin II (Richard et al. 2000), Thrombin und TGF-β (Gorlach et al. 2001) oder Zytokine (Hellwig-Burgel et al. 1999) eine Induktion der HIF-1α-Aktivität unabhängig von der Sauerstoffkonzentration nachgewiesen werden. Diese Faktoren können ebenfalls eine Induktion der PAI-1-Expression vermitteln. Zahlreiche Untersuchungen sprechen für eine Beteiligung des PI3K/PKB-Signalwegs und der MAP-Kinase-Kaskade an der O_2-abhängigen PAI-1-

Expression durch den Transkriptionsfaktor HIF-1. Sie zeigen ebenfalls, dass die Induktion der PAI-1-Expression durch HIF-1 über eine Aktivierung dieser Signalwege durch unterschiedliche Faktoren, sogar bei normalen Sauerstoffkonzentrationen, vermittelt werden kann (Takahashi et al. 2000; Banfi et al. 2001; Kietzmann et al. 2003). Durch die Entdeckung der oben beschriebenen möglichen Aktivierungswege der PI3K/PKB- und MAP-Kinase-Kaskade über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und cAMP darf deren Bedeutung auch bei der hier nachgewiesenen Induktion der PAI-1-Expression durch Glucagon und cAMP vermutet werden.

An der Glucagon-abhängigen PAI-1-Induktion scheint aber dennoch auch die PKA beteiligt zu sein, da durch den Hemmstoff H7 die Glucagonwirkung aufgehoben werden konnte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu den Studien an primär kultivierten Hepatozyten in denen mit dem Hemmstoff H89 eine Hemmung der Dibutyryl-cAMP-induzierten PAI-1-Expression beobachtet werden konnte (Uno et al. 1997).

5.3 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte in primär kultivierten Rattenhepatozyten eine positive Regulation der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)-Genexpression durch Insulin und Glucagon nachgewiesen werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Glucagon-abhängige Induktion der PAI-1-Genexpression über den second messenger cAMP vermittelt wird.

In Transfektionsversuchen mit PAI-1-Genkonstrukten, konnte erstmals gezeigt werden, dass an der Insulin- und Glucagon-vermittelten PAI-1-Induktion die zwei Hypoxie-responsiven Elemente (HRE-1 und -2) des PAI-1-Promotors unabhängig vom pO_2 beteiligt sind.

Ferner konnte gezeigt werden, dass wahrscheinlich sowohl an der Insulin- als auch Hypoxie-abhängigen Induktion der PAI-1-Genexpression der PI3K/PKB-Signalweg über die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1, beteiligt ist. Dagegen konnte für cAMP keine Beteiligung an der Hypoxie-abhängigen Expressionsinduktion von PAI-1 nachgewiesen werden.

Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse ist das Vorhandensein weiterer PAI-1-Promotorelemente in enger Nachbarschaft zu den zwei HRE, die eine cAMP-abhängige Induktion der PAI-1-Expression vermitteln, denkbar. Ebenso können bei der hier nachgewiesenen Induktion der PAI-1-Expression durch Glucagon und cAMP die neueren Untersuchungen zu weiteren möglichen Aktivierungswegen der PI3K/PKB- und MAP-Kinase-Kaskade über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und cAMP von besonderer Bedeutung sein. An der Glucagon-abhängigen PAI-1-Induktion scheint auch die PKA, als klassisches Zielprotein des cAMP, beteiligt zu sein.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Serinproteaseinhibitoren, wie der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1), sind an vielen wichtigen biologischen Prozessen, wie Blutgerinnung, Fibrinolyse oder Umbauprozessen der Extrazellularmatrix, regulatorisch beteiligt. Eine besondere Rolle spielt PAI-1 bei der Regulation der endogenen Fibrinolyse, indem es die Aktivität der Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA hemmt. Erhöhte PAI-1-Konzentrationen sind mit thromboembolischen, kardio- und cerebrovaskulären Erkrankungen assoziiert. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Hyperinsulinämie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II, insbesondere bei Adipositas und arterieller Hypertonie, zu erhöhten PAI-1-Konzentrationen im Blut führte. Ferner induzierte Insulin die PAI-1-Expression *in vitro* in unterschiedlichen Zelltypen wie primär kultivierten humanen Hepatozyten, der humanen Hepatomzellreihe HepG2 oder arteriellen Endothel- und glatten Muskelzellen der Gefäße.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob Insulin in primären Rattenhepatozyten die PAI-1-Genexpression über den PI3K/PKB-Signalweg induziert. Da Glucagon der klassische Insulinantagonist ist, sollte untersucht werden, ob Glucagon die PAI-1-Genexpression in primären Rattenhepatozyten supprimiert. Ferner sollte untersucht werden, ob der mögliche Glucagoneffekt auf die PAI-1-Genregulation über den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg vermittelt wird. Mittels Transfektion von Ratten-PAI-1-Promotor-Luc-Genkonstrukten sollten ebenfalls mögliche Insulin- oder Glucagon-responsive PAI-1-Genelemente identifiziert werden.

Positive Regulation der PAI-1-Genexpression durch Insulin und Glucagon

In primär kultivierten Rattenhepatozyten wurde eine positive Regulation der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)-Genexpression durch Insulin und Glucagon festgestellt. Die Induktion konnte in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration und Inkubationsdauer auf der mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Ebenso induzierte cAMP, als zweiter Bote der Glucagon-Signaltransduktion, die PAI-1-Expression konzentrations- und zeitabhängig auf der mRNA- und Proteinebene, was dafür spricht, dass die durch Glucagon vermittelte Induktion der PAI-1-Expression über diesen Mechanismus stattfindet.

An der Insulin-abhängigen PAI-1-Induktion ist der PI3K/PKB-Signalweg über die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF-1) beteiligt

Durch den PI3K-Hemmstoff Wortmannin konnte die Insulin- und Hypoxie-induzierte PAI-1-mRNA- und Protein-Expression gehemmt werden. Analog konnte in den Transfektionversuchen mit der Wildtyp-PAI-1-Promotorregion -766/+31 (pGL3PAI-766-Luc) die Insulin- und Hypoxie-induzierte Luc-Aktivität gehemmt werden. Diese

Beobachtung kann dahingehend gewertet werden, dass sowohl an der Insulin- als auch Hypoxie-abhängigen Induktion der PAI-1-Genexpression der PI3K/PKB-Signalweg beteiligt ist. Des weiteren zeigten Transfektionsversuche mit pGL3PAI-766M1-Luc und pGL3PAI-766M2-Luc, in denen die Hypoxie-responsiven Elemente, das HRE-1 (pGL3PAI-766M1-Luc) oder das HRE-2 (pGL3PAI-766M2-Luc), in der PAI-1-Promotorregion mutiert sind, dass die Luc-Aktivität weder durch Insulin noch durch Hypoxie induzierbar ist.

Diese Beobachtungen zeigen, dass an der PAI-1-Genregulation durch Insulin und Hypoxie der PI3K/PKB-Signalweg und der an die zwei HRE-Promotorelemente-bindende Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1) beteiligt ist.

Die Glucagon-abhängige PAI-1-Expression erfolgt über cAMP und den Hypoxie-induzierbaren Faktor

Da durch den spezifischen kompetitiven cAMP-Hemmstoff RpcAMPS die Glucagon- und cAMP-abhängige Induktion der PAI-1-mRNA- und Protein-Expression aufgehoben wurde, kann angenommen werden, dass in primären Hepatozyten die Glucagon-abhängige Induktion der Ratten-PAI-1-Genexpression über den second messenger cAMP vermittelt wird. In Transfektionsversuchen mit pGL3PAI-766-Luc-Genkonstrukten konnte gezeigt werden, dass eine Induktion der Luc-Aktivität unabhängig vom pO_2 durch Glucagon erfolgt. Interessanterweise verläuft die Induktion nicht über ein CRE, sondern über die HIF-bindenden HRE, da in mit pGL3PAI-766M1-Luc und pGL3PAI-766M2-Luc, in denen das HRE-1 oder das HRE-2 in der PAI-1-Promotorregion mutiert ist, transfizierten Hepatozyten die Luc-Aktivität weder durch Glucagon noch durch Hypoxie beeinflusst war.

Durch Rp-cAMPS konnte in dieser Arbeit keine Hemmung der Hypoxie-induzierten PAI-1-Expression beobachtet werden. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass cAMP kein Botenstoff der Hypoxie-abhängigen PAI-1-Induktion ist.

Insgesamt zeigen die hier vorgestellten Befunde, dass in primären Hepatozyten die Induktion der PAI-1-Expression durch Insulin, Glucagon und cAMP nicht antagonistisch ist, sondern über klassische und alternative Aktivierungswege der PI3K/PKB-Kinase-Kaskade den Transkriptionsfaktor HIF-1 aktivieren kann, der dann die Induktion der PAI-1-Expression bedingt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

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

Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougal CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M (1997): 3 phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. Curr Biol 7: 776-789

Alessi MC, Juhan-Vague I, Kooistra T, Declerck PJ, Collen D (1988): Insulin stimulates the synthesis of plasminogen activator inhibitor 1 by the human hepatocellular cell line Hep G2. Thromb Haemost 60: 491-494

Alliston TN, Maiyar AC, Buse P, Firestone GL, Richards JS (1997): Follicle stimulating hormone-regulated expression of serum/glucocorticoid-inducible kinase in rat ovarian granulosa cells: a functional role for the Sp1 family in promoter activity. Mol Endocrinol 11: 1934-1949

Altschuler DL, Peterson SN, Ostrowski MC, Lapetina EG (1995): Cyclic AMP-dependent activation of Rap1b. J Biol Chem 270: 10373-10376

Anciaux K, Van Dommelen K, Nicolai S, Van Mechelen E, Slegers H (1997): Cyclic AMP-mediated induction of the glial fibrillary acidic protein is independent of protein kinase A activation in rat C6 glioma. J Neurosci Res 48: 324-333

Anfosso F, Chomiki N, Alessi MC, Vague P, Juhan-Vague I (1993): Plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in the human hepatoma cell line Hep G2. Metformin inhibits the stimulating effect of insulin. J Clin Invest 91: 2185-2193

Angel P, Karin M (1991): The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta 1072: 129-157

Aoki K, Nishino N, Baba S, Urano T, Takada A (1994): Postoperative changes in plasma tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor. Surg Today 24: 1039-1043

Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM (1996): An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 12969-12973

Arias J, Alberts AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy M (1994): Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. Nature 370: 226-229

Aronheim A, Engelberg D, Li N, al-Alawi N, Schlessinger J, Karin M (1994): Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. Cell 78: 949-961

Arts J, Grimbergen J, Toet K, Kooistra T (1999): On the role of c-Jun in the induction of PAI-1 gene expression by phorbol ester, serum, and IL-1alpha in HepG2 cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 39-46

Asha H, de Ruiter ND, Wang MG, Hariharan IK (1999): The Rap1 GTPase functions as a regulator of morphogenesis in vivo. EMBO J 18: 605-615

Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenau B (1990): Insulin activates 6-phosphofructo-2-kinase and pyruvate kinase in the liver. Indirect evidence for an action via a phosphatase. J Biol Chem 265: 7202-7206

Banfi C, Eriksson P, Giandomenico G, Mussoni L, Sironi L, Hamsten A, Tremoli E (2001): Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene by insulin: insights into the signaling pathway. Diabetes 50: 1522-1530

Barthel A, Okino ST, Liao J, Nakatani K, Li J, Whitlock JP J, Roth RA (1999): Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. J Biol Chem 274: 20281-20286

Bastard JP, Pieroni L, Hainque B (2000): Relationship between plasma plasminogen activator inhibitor 1 and insulin resistance. Diabetes Metab Res Rev 16: 192-201

Bator JM, Cohen RL, Chambers DA (1998): Hydrocortisone regulates the dynamics of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor expression in cultured murine keratinocytes. Exp Cell Res 242: 110-119

Beitner-Johnson D, Blakesley VA, Shen-Orr Z, Jimenez M, Stannard B, Wang LM, Pierce J, LeRoith D (1996): The proto-oncogene product c-Crk associates with insulin receptor substrate-1 and 4PS. Modulation by insulin growth factor-I (IGF) and enhanced IGF-I signaling. J Biol Chem 271: 9287-9290

Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J, Tsichlis P (1998): Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. Oncogene 17: 313-325

Benedetti A, Graf P, Fulceri R, Romani A, Sies H (1989): Ca2+ mobilization by vasopressin and glucagon in perfused livers. Effect of prior intoxication with bromotrichloromethane. Biochem Pharmacol 38: 1799-1805

Bergonzelli GE, Kruithof EK, Medcalf RL (1992): Transcriptional antagonism of phorbol ester-mediated induction of plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. Endocrinology 131: 1467-1472

Berry MN, Friend DS (1969): High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. J Cell Biol 43: 506-520

Bhalla US, Iyengar R (1999): Emergent properties of networks of biological signaling pathways. Science 283: 381-387

Borrelli E, Montmayeur JP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1992): Signal transduction and gene control: the cAMP pathway. Crit Rev Oncog 3: 321-338

Bos JL (1998): All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. EMBO J 17: 6776-6782

Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA (2001): Rap1 signalling: adhering to new models. Nat Rev Mol Cell Biol 2: 369-377

Bosma PJ, van den Berg EA, Kooistra T, Siemieniak DR, Slightom JL (1988): Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. Promoter and structural gene nucleotide sequences. J Biol Chem 263: 9129-9141

Botelho LH, Rothermel JD, Coombs RV, Jastorff B (1988): cAMP analog antagonists of cAMP action. Methods Enzymol 159: 159-172

Bowtell D, Fu P, Simon M, Senior P (1992): Identification of murine homologues of the Drosophila son of sevenless gene: potential activators of ras. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 6511-6515

Braumann T, Erneux C, Petridis G, Stohrer WD, Jastorff B (1986): Hydrolysis of cyclic nucleotides by a purified cGMP-stimulated phosphodiesterase: structural requirements for hydrolysis. Biochim Biophys Acta 871: 199-206

Brown NJ, Kim KS, Chen YQ, Blevins LS, Nadeau JH, Meranze SG, Vaughan DS (2000): Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production. J Clin Endocrinol Metab 85: 336-344

Bruick RK, McKnight SL (2001): A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Science 294: 1337-1340

Bruzdzinski CJ, Riordan-Johnson M, Nordby EC, Suter SM, Gelehrter TD (1990): Isolation and characterization of the rat plasminogen activator inhibitor-1 gene. J Biol Chem 265: 2078-2085

Bunn HF, Poyton RO (1996): Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. Physiol Rev 76: 839-885

Burbach KM, Poland A, Bradfield CA (1992): Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 8185-8189

Burgering BM, Coffer PJ (1995): Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. Nature 376: 599-602

Burgering BM, Pronk GJ, van Weeren PC, Chardin P, Bos JL (1993): cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. EMBO J 12: 4211-4220

Busca R, Abbe P, Mantoux F, Aberdam E, Peyssonnaux C, Eychene A, Ortonne JP, Ballotti R (2000): Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. EMBO J 19: 2900-2910

Busso N, Nicodeme E, Chesne C, Guillouzo A, Belin D, Hyafil F (1994): Urokinase and type I plasminogen activator inhibitor production by normal human hepatocytes: modulation by inflammatory agents. Hepatology 20: 186-190

Busso N, Péclat V, So A, Sappino AP (1997): Plasminogen activation in synovial tissues: differences between normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis joints. Ann Rheum Dis 56: 550-557

Bygrave FL, Gamberucci A, Fulceri R, Benedetti A (1993): Evidence that stimulation of plasma-membrane Ca2+ inflow is an early action of glucagon and dibutyryl cyclic AMP in rat hepatocytes. Biochem J 292: 19-22

Calles-Escandon J, Mirza SA, Sobel BE, Schneider DJ (1998): Induction of hyperinsulinemia combined with hyperglycemia and hypertriglyceridemia increases plasminogen activator inhibitor 1 in blood in normal human subjects. Diabetes 47: 290-293

Cantley LC, Neel BG (1999): New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 4240-4245

Carmassi F, Morale M, Ferrini L, Dell'Omo G, Ferdeghini M, Pedrinelli R, De Negri F (1999): Local insulin infusion stimulates expression of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator in normal subjects. Am J Med 107: 344-350

Carpino N, Wisniewski D, Strife A, Marshak D, Kobayashi R, Stillman B, Clarkson B (1997): p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. Cell 88: 197-204

Carr DW, Cutler RE, Cottom JE, Salvador LM, Fraser ID, Scott JD, Hunzicker-Dunn M (1999): Identification of cAMP-dependent protein kinase holoenzymes in preantral- and preovulatory-follicle-enriched ovaries, and their association with A-kinase-anchoring proteins. Biochem J 344: 613-623

Cass LA, Summers SA, Prendergast GV, Backer JM, Birnbaum MJ, Meinkoth JL (1999): Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. Mol Cell Biol 19: 5882-5891

Chapman SC, Ayala JE, Streeper RS, Culbert AA, Eaton EM, Svitek CA, Goldman JK, Tavar JM, O'Brien RM (1999): Multiple promoter elements are required for the stimulatory effect of insulin on human collagenase-1 gene transcription. Selective effects on activator protein-1 expression may explain the quantitative difference in insulin and phorbol ester action. J Biol Chem 274: 18625-18634

Chen C, Okayama H (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. Mol Cell Biol 7: 2745-2752

Chen C, Okayama H (1988): Calcium-phosphate-mediated gen transfer: ahighly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. Biotechniques 6: 632-638

Chen S, Liu X, Segaloff DL (2000): A novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive element involved in the transcriptional regulation of the lutropin receptor gene in granulosa cells. Mol Endocrinol 14: 1498-1508

Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Covington JW, Vaughan DE (1998): Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 273: 8225-8231

Cherniack AD, Klarlund JK, Czech MP (1994): Phosphorylation of the Ras nucleotide exchange factor son of sevenless by mitogen activated protein kinase. J Biol Chem 269: 4717-4720

Cherniack AD, Klarlund JK, Conway BR, Czech MP (1995): Disassembly of Son-of-sevenless proteins from Grb2 during p21ras desensitization by insulin. J Biol Chem 270: 1485-1488

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159

Cichy SB, Uddin S, Danilkovich A, Guo S, Klippel A, Unterman TG (1998): Protein kinase B/Akt mediates effects of insulin on hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression through a conserved insulin response sequence. J Biol Chem 273: 6482-6487

Clemens JW, Robker RL, Kraus WL, Katzenellenbogen BS, Richards JS (1998): Hormone induction of progesterone receptor (PR) messenger ribonucleic acid and activation of PR promoter regions in ovarian granulosa cells: evidence for a role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate but not estradiol. Mol Endocrinol 12: 1201-1214

Coccetti P, Mauri I, Alberghina L, Martegani E, Parmeggiani A (1995): The minimal active domain of the mouse ras exchange factor CDC25Mm. Biochem Biophys Res Commun 206: 253-259

Cockell KA, Ren S, Sun J, Angel A, Shen GX (1995): Effect of thrombin on release of plasminogen activator inhibitor-1 from cultured primate arterial smooth muscle cells. Thromb Res 77: 119-131

Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR (1998): Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. Biochem J 335: 1-13

Comb M, Birnberg NC, Seasholtz A, Herbert E, Goodman HM (1986): A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. Nature 323: 353-356

Conti M (2000): Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. Mol Endocrinol 14: 1317-1327

Cook SJ, McCormick F (1993): Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. Science 262: 1069-1072

Coulter S, Rodbell M (1992): Heterotrimeric G proteins in synaptoneurosome membranes ars crosslink by a phenylenedimaleimide, yielding structures comparable in size to crosslinked tubulin and F actin. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 5842-5846

Cowell IG, Skinner A, Hurst HC (1992): Transcriptional repression by a novel member of the bZIP family of transcription factors. Mol Cell Biol 12: 3070-3077

Crews ST, Fan CM (1999): Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. Curr Opin Genet Dev 9: 580-587

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 378: 785-789

Cypess AM, Unson CG, Wu CR Sakmar TP (1999): Two cytoplasmatic loops of the glucagon receptor are requierd to elevate cAMP or intracellular calcium. J Biol Chem 274: 19455-19464

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999): Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev 13: 2905-2927

David M, Petricoin E 3rd, Larner AC (1996): Activation of protein kinase A inhibits interferon induction of the Jak/Stat pathway in U266 cells. J Biol Chem 271: 4585-4588

DeBernardi MA, Brooker G (1996): Single cell Ca2+/cAMP cross-talk monitored by simultaneous Ca2+/cAMP fluorescence ratio imaging. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 4577-4582

Declerck PJ, De Mol M, Alessi MC (1988): Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma: identification as a multimeric form of S protein (vitronectin). J Biol Chem 263: 15454-15461

Dent P, Haser W, Haystead TA, Vincent LA, Roberts TM, Sturgill T (1992): Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. Science 257: 1404-1407

de Groot RP, den Hertog J, Vandenheede JR, Goris J, Sassone-Corsi P (1993): Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. EMBO J 12: 3903-3911

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL (1998): Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. Nature 396: 474-477

de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL (2000): Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. J Biol Chem 275: 20829-20836

Dhallan RS, Yau KW, Schrader KA, Reed RR (1990): Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. Nature 347: 184-187

DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Morin N, Jolicoeur FC, Pelletier JP (1994): Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression in human synovial fibroblasts by prostaglandin E2: mediation by protein kinase A and role of interleukin-1. Mol Cell Endocrinol 103: 139-148

Dichtl W, Stiko A, Eriksson P, Goncalves I, Calara F, Banfi C, Ares MP, Hamsten A, Nilsson J (1999): Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 3025-3032

Dietzmann K, von Bossanyi P, Krause D, Wittig H, Mawrin Ch, Kirches E (2000): Expression of the plasminogen activator system and the inhibitors PAI-1 and PAI-2 in posttraumatic lesions of the CNS and brain injuries following dramatic circulatory arrests: an immunohistchemical study. Pathol Res Prac 196: 15-21

Dremier S, Pohl V, Poteet-Smith C, Roger PP, Corbin J, Doskeland SO, Dumont JE, Maenhaut C (1997): Activation of cyclic AMP-dependent kinase is required but may not be sufficient to mimic cyclic AMP-dependent DNA synthesis and thyroglobulin expression in dog thyroid cells. Mol Cell Biol 17: 6717-6726

Du K, Montminy M (1998): CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. J Biol Chem 273: 32377-32379

Dynan WS, Tjian R (1983): The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. Cell 35: 79-87

el-Maghrabi MR, Pilkis J, Marker AJ, Colosia AD, D'Angelo G, Fraser BA, Pilkis SJ (1988): cDNA sequence of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase and evidence for down-regulation of its mRNA by insulin. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 8430-8434

Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y (1997): A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 4273-4278

Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y (1999): Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. EMBO J 18: 1905-1914

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001): C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell 107: 43-54

Erickson LA, Hekman CM, Loskutoff DJ (1985): The primary plasminogen-activator inhibitors in endothelial cells, platelets, serum, and plasma are immunologically related. Proc Natl Acad Sci U S A 82: 8710-8714

Fan CM, Kuwana E, Bulfone A, Fletcher CF, Copeland NG, Jenkins NA, Crews S, Martinez S, Puelles L, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M (1996): Expression patterns of two murine homologs of Drosophila single-minded suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. Mol Cell Neurosci 7: 1-16

Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL (1999): Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. Cancer Res 59: 3915-3918

Ferreri K, Gill G, Montminy M (1994): The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 1210-1213

Filippa N, Sable CL, Filloux C, Hemmings B, Van Obberghen E (1999): Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. Mol Cell Biol 19: 4989-5000

Fink T, Kazlauskas A, Poellinger L, Ebbesen P, Zachar V (2002): Identification of a tightly regulated hypoxia-response element in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-1. Blood 99: 2077-2083

Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ (1995): Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. J Biol Chem 270: 21021-2107

Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W (1997): HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. Mech Dev 63: 51-60

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996): Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol 16: 4604-4613

Franke B, Akkerman JW, Bos JL (1997): Rapid Ca2+-mediated activation of Rap1 in human platelets. EMBO J 16: 252-259

Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN (1995): The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. Cell 81: 727-736

Friess H, Duarte R, Kleeff J, Fukuda A, Tang WH, Graber H, Schilling M, Zimmermann A, Korc M, Büchler MW (1998): The plasminogen activator / plasmin system is up-regulated after acute necrotizing pancreatitis in human beings. Surgery 124: 79-86

Frodin M, Peraldi P, Van Obberghen E (1994): Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. J Biol Chem 269: 6207-6214

Fukumoto S, Allan EH, Yee JA, Gelehrter TD, Martin TJ (1992): Plasminogen activator regulation in osteoblasts: parathyroid hormone inhibition of type-1 plasminogen activator inhibitor and its mRNA. J Cell Physiol 152: 346-355

Furuta M, Zhou A, Webb G, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, Steiner DF (2001): Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice. J Biol Chem 276: 27197-27202

Gallicchio M, Hufnagl P, Wojta J, Tipping P (1996): IFN-gamma inhibits thrombin- and endotoxin-induced plasminogen activator inhibitor type 1 in human endothelial cells. J Immunol 157: 2610-2617

Gawler D, Milligan G, Spiegel AM, Unson CG, Houslay MD (1987): Abolition of the expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi activity in diabetes. Nature 327: 229-232

Georg B, Riccio A, Andreasen P (1990): Forskolin down-regulates type-1 plasminogen activator inhibitor and tissue-type plasminogen activator and their mRNAs in human fibrosarcoma cells. Mol Cell Endocrinol 72: 103-110

Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T (1997): CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 2927-2932

Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N (1998): 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. Genes Dev 12: 502-513

Ginot F, Decaux JF, Cognet M ,Berbar T, Levrat F, Kahn A, Weber A (1989): Transfection of hepatic genes into adult rat hepatocytes in primary culture and their tissue-specific expression. Eur J Biochem 180: 289-294

Gonzalez GA, Montminy MR (1989): Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. Cell 59: 675-680

Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS (2000): Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-Induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. Mol Endocrinol 14: 1283-1300

Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R (2001): Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. Circ Res 89: 47-54

Gottschling-Zeller H, Aprath I, Skurk T, Hauner H (2000): Beta-Adrenoceptor agonists and other cAMP elevating agents suppress PAI-1 production of human adipocytes in primary culture. Horm Metab Res 32: 509-514

Goulding EH, Tibbs GR, Siegelbaum SA (1994): Molecular mechanism of cyclic-nucleotide-gated channel activation. Nature 372: 369-374

Graham FL, Van Der Eb AJ (1973): Transformation of rat cells by DNA of adenovirus 5. Virology 52: 456-467

Granner D, Pilkis S (1990): The genes of hepatic glucose metabolism. J Biol Chem 265: 10173-10176

Grant PJ, Kruithof EK, Felley CP, Felber JP, Bachmann F (1990): Short-term infusions of insulin, triacylglycerol and glucose do not cause acute increases in plasminogen activator inhibitor-1 concentrations in man. Clin Sci 79: 513-516

Graves LM, Bornfeldt KE, Raines EW, Potts BC, Macdonald SG, Ross R, Krebs EG (1993): Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 10300-10304

Grenett HE, Benza RL, Li XN, Aikens ML, Grammer JR, Brown SL, Booyse FM (1999): Expression of plasminogen activator inhibitor type I in genotyped human endothelial cell cultures: genotype-specific regulation by insulin. Thromb Haemost 82: 1504-1509

Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA (1998): Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. Gene Expr 7: 205-213

Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA (2000): The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. Annu Rev Pharmacol Toxicol 40: 519-561

Gutman A, Wasylyk B (1990): The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. EMBO J 9: 2241-2246

Habener JF, Miller CP, Vallejo M (1995): cAMP-dependent regulation of gene transcription by cAMP response element-binding protein and cAMP response element modulator. Vitam Horm 51: 1-57

Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS (1998): Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. Diabetes 47: 1006-1013

Halleux CM, Declerck PJ, Tran SL, Detry R, Brichard SM (1999): Hormonal control of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and production in human adipose tissue: stimulation by glucocorticoids and inhibition by catecholamines. J Clin Endocrinol Metab 84: 4097-4105

Hanoune J, Pouille Y, Tzavara E, Shen T, Lipskaya L, Miyamoto N, Suzuki Y, Defer N (1997): Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. Mol Cell Endocrinol 128: 179-194

Hansen LH, Gromada J, Bouchelouche P, Whitmore T, Jelinek L, Kindsvogel W, Nishimura E (1998): Glucagon-mediated Ca^{2+} signaling in BHK cells expressing cloned human glucagon receptors. Am J Physiol 274: 1552-1562

Healy AM, Gelehrter TD (1994): Induction of plasminogen activator inhibitor-1 in HepG2 human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. J Biol Chem 269: 19095-19100

Heaton JH, Gelehrter TD (1990): Cyclic nucleotide regulation of plasminogen activator and plasminogen activator-inhibitor messenger RNAs in rat hepatoma cells. Mol Endocrinol 4: 171-178

Heaton JH, Nebes VL, O'Dell LG, Morris SM Jr, Gelehrter TD (1989): Glucocorticoid and cyclic nucleotide regulation of plasminogen activator and plasminogen activator-inhibitor gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. Mol Endocrinol 3: 185-192

Heaton JH, Kathju S, Gelehrter TD (1992): Transcriptional and posttranscriptional regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor and tissue-type plasminogen activator gene expression in HTC rat hepatoma cells by glucocorticoids and cyclic nucleotides. Mol Endocrinol 6: 53-60

Heaton JH, Tillmann-Bogush M, Leff NS, Gelehrter TD (1998): Cyclic nucleotide regulation of type-1 plasminogen activator-inhibitor mRNA stability in rat hepatoma cells. Identification of cis-acting sequences. J Biol Chem 273: 14261-14268

Heaton JH, Dlakic WM, Dlakic M, Gelehrter TD (2001): Identification and cDNA cloning of a novel RNA-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA. J Biol Chem 276: 3341-3347

Heaton JH, Dlakic WM, Gelehrter TD (2003): Posttranscriptional regulation of PAI-1 gene expression. Thromb Haemost 89: 959-966

Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W (1999): Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. Blood 94: 1561-1567

Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S, Sasaki Y (1984): Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. Biochemistry 23: 5036-5041

Hill MM, Andjelkovic M, Brazil DP, Ferrari S, Fabbro D, Hemmings BA (2001): Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Serin-473 is independent of its activity and occurs through a Staurosporine-insensitive kinase. J Biol Chem 276: 25643-25646

Hirose K, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fujii H, Saijo Y, Gotoh O, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1996): cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). Mol Cell Biol 16: 1706-1713

Hirshman CA, Zhu D, Panettieri RA, Emala CW (2001): Actin depolymerization via the beta-adrenoceptor in airway smooth muscle cells: a novel PKA-independent pathway. Am J Physiol Cell Physiol 281: C1468-C1476

Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O (1991): Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. Science 252: 954-958

Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA (1997): Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. J Biol Chem 272: 8581-8593

Holgado-Madruga M, Emlet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ (1996): A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. Nature 379: 560-564

Holsinger LJ, Spencer DM, Austin DJ, Schreiber SL, Crabtree GR (1995): Signal transduction in T lymphocytes using a conditional allele of Sos. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 9810-9814

Holt KH, Kasson BG, Pessin JE (1996): Insulin stimulation of a MEK-dependent but ERK-independent Sos protein kinase. Mol Cell Biol 16: 577-583

Howe LR, Leevers SJ, Gomez N, Nakielny S, Cohen P, Marshall CJ (1992): Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. Cell 71: 335-342

Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collén D (1982): Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator: role of fibrin. J Biol Chem 257: 2912-2919

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998): Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O_2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 7987-7992

Hurd TW, Culbert AA, Webster KJ, Tavare JM (2002): Dual role for mitogen-activated protein kinase (Erk) in insulin-dependent regulation of Fra-1 (fos-related antigen-1) transcription and phosphorylation. Biochem J 368: 573-580

Hvidberg A, Djurup R, Hilsted J (1994): Glucose recovery after intranasal glucagon during hypoglycaemia in man. Eur J Clin Pharmacol 46: 15-17

Ichinose A, Tamaki T, Aoki N (1983): Faktor XIII-mediated cross-linking of NH_2-terminal peptide of α2-Antiplasmin inhibitor to fibrin. FEBS Lett 153: 369-371

Ikeda M, Nomura M (1997): cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. Biochem Biophys Res Commun 233: 258-264

Ikeda T, Hoshino T, Honda M, Takeuchi T, Mokuda O, Tominaga M, Mashiba H (1989): Effect of glucagon on glucose output from bivascularly perfused rat liver. Exp Clin Endocrinol 94: 383-386

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr (2001): HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O_2 sensing. Science 292: 464-468

Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway RC, Conaway JW, Klausner RD, Pause A (1999): Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 12436-12441

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998): Cellular and developmental control of O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. Genes Dev 12: 149-162

Iynedjian PB, Jotterand D, Nouspikel T, Asfari M, Pilot PR (1989): Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. J Biol Chem 264: 21824-21829

Iynedjian PB, Roth RH, Fleischmann M, Gjinovci A (2000): Activation of protein kinase B/cAkt in hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase. Biochem J 351: 621-627

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001): Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O_2-regulated prolyl hydroxylation. Science 292: 468-472

Jackson SP, Tjian R (1988): O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. Cell 55: 125-133

Jahnsen T, Hedin L, Kidd VJ, Beattie WG, Lohmann SM, Walter U, Durica J, Schulz TZ, Schiltz E, Browner M (1986): Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. J Biol Chem 261: 12352-12361

Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA (1998): Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. Mech Dev 73: 117-123

Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, Sprecher CA & et al (1993): Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. Science 259: 1614-1616

Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996): Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 271: 17771-17778

Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK (2001): Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. Cell Growth Differ 12: 363-369

Johansson L, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Stegmayr B, Hallmans G (2000): Tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, and tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 complex as risk factors for the development of a first stroke. Stroke 31: 26-32

Johnson MR, Bruzdzinski CJ, Winograd SS, Gelehrter TD (1992): Regulatory sequences and protein-binding sites involved in the expression of the rat plasminogen activator inhibitor-1 gene. J Biol Chem 267: 12202-12210

Juhan-Vague I, Alessi MC (1997): PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events.Thromb Haemost 78: 656-660

Juhan-Vague I, Alessi MC, Morange PE (2000): Hypofibrinolysis and increased PAI-1 are linked to atherothrombosis via insulin resistance and obesity. Ann Med 32: 78-84

Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R (1987): Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. Cell 51: 1079-1090

Kandel ES, Hay N (1999): The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. Exp Cell Res 253: 210-229

Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A (1999): Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. Curr Biol 9: 601-604

Karpinski BA, Morle GD, Huggenvik J, Uhler MD, Leiden JM (1992): Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 4820-4824

Kawasaki H, Eckner R, Yao TP, Taira K, Chiu R, Livingston DM, Yokoyama KK (1998 a): Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. Nature 393: 284-289

Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM (1998 b): A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. Science 282: 2275-2279

Kazlauskas A (1994) Receptor tyrosine kinases and their targets. Curr Opin Genet Dev 4: 5-14

Kee BL, Arias J, Montminy MR (1996): Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. J Biol Chem 271: 2373-2375

Keller SR, Aebersold R, Garner CW, Lienhard GE (1993): The insulin-elicited 160 kDa phosphotyrosine protein in mouse adipocytes is an insulin receptor substrate 1: identification by cloning. Biochim Biophys Acta 1172: 323-332

Kietzmann T, Roth U, Jungermann K (1999): Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. Blood 94: 4177-4185

Kietzmann T, Jungermann K, Gorlach A (2003): Regulation of the hypoxia-dependent plasminogen activator inhibitor 1 expression by MAP kinases. Thromb Haemost 89: 666-673

Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM (1998): Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. J Clin Invest 101: 1-9

Kim TK; Kim TH; Maniatis T (1998): Efficient recruitment of TFIIB and CBP-RNA polymerase II holoenzyme by an interferon-beta enhanceosome in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 12191-12196

King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS (1997): Positional cloning of the mouse circadian clock gene. Cell 89: 641-653

Kline DD, Peng YJ, Manalo DJ, Semenza GL, Prabhakar NR (2002): Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 821-826

Klinger M, Kudlacek O, Seidel MG, Freissmuth M, Sexl V (2002): MAP kinase stimulation by cAMP does not require RAP1 but SRC family kinases. J Biol Chem 277: 32490-32497

Knudsen H, Olesen T, Riccio A, Ungaro P, Christensen L, Andreasen PA (1994): A common response element mediates differential effects of phorbol esters and forskolin on type-1 plasminogen activator inhibitor gene expression in human breast carcinoma cells. Eur J Biochem 220: 63-74

Kohler HP, Grant PJ (2000): Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease – a review. N Eng J Med 342: 1792-1801

Kohn AD, Kovacina KS, Roth RA (1995): Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. EMBO J 14: 4288-4295

Konishi H, Matsuzaki H, Tanaka M, Takemura Y, Kuroda S, Ono Y, Kikkawa U (1997): Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. FEBS Lett 410: 493-498

Konkle BA, Kollros PR, Kelly MD (1990): Heparin-binding growth factor-1 modulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression. Interaction with cAMP and protein kinase C-mediated pathways. J Biol Chem 265: 21867-21873

Kooistra T, Sprengers ED, van Hinsberg VWH (1986): Rapid inactivation of the plasminogen-activator inhibitor upon secretion from cutured human endothelial cells. Biochem J 239: 497-503

Kooistra T, Bosma PJ, Tons HA, van den Berg AP, Meyer P, Princen HM (1989): Plasminogen activator inhibitor 1: biosynthesis and mRNA level are increased by insulin in cultured human hepatocytes. Thromb Haemost 29: 723-728

Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL (1999): Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. Dev Biol 209: 254-267

Kruithof EKO (1988): Plasminogen activator inhibitors – a review. Enzyme 40: 113-121

Kruithof EKO, Tran-Thang C, Bachmann F (1986 a): The fast-acting inhibitor of tissue-type plasminogen activator in plasma is also the primary plasma inhibitor of urokinase. Thrombosis and Haemostasis 55: 65-69

Kruithof EKO, Vassalli JD, Schleuning WD, Mattaliano RJ, Bachmann F (1986 b): Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. J Biol Chem 261: 11207-11213

Kruithof EKO, Gudinchet A, Bachmann F (1988): Plasminogen activator inhibitor 1 and plasminogen activator inhibitor 2 in various disease states. Thromb Haemost 59: 7-12

Kuo JF, Greengard P (1969): Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. Proc Natl Acad Sci U S A 64: 1349-1355

Kurokawa R, Kalafus D, Ogliastro MH, Kioussi C, Xu L, Torchia J, Rosenfeld MG, Glass CK (1998): Differential use of CREB binding protein-coactivator complexes. Science 279: 700-703

Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M (1997): The hypoxia-inducible factor-1 DNA recognition site is cAMP-responsive. Kidney Int 51: 564-566

Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH (1994): Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. Nature 370: 223-226

Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J (1992): Raf-1 activates MAP kinase-kinase. Nature 358: 417-421

Landin K, Tengborn L, Smith U (1990): Elevated fibrinogen and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in hypertension are related to metabolic risk factors for cardiovascular disease. J Intern Med 227: 273-278

Landin K, Tengborn L, Chmielewska J, von Schenck H, Smith U (1991): The acute effect of insulin on tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in man. Thromb Haemost 65: 130-133

Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK (2002 a): FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. Genes Dev 16: 1466-1471

Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (2002 b): Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. Science 295: 858-861

Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988): The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. Science 240: 1759-1764

Langan TA (1968): Histone phosphorylation: stimulation by adenosine 3',5'-monophosphate. Science 162: 579-580

Lange AJ, Argaud D, el MM, Pan W, Maitra SR, Pilkis SJ (1994): Isolation of a cDNA for the catalytic subunit of rat liver glucose-6-phosphatase: regulation of gene expression in FAO hepatoma cells by insulin, dexamethasone and cAMP. Biochem Biophys Res Commun 201: 302-309

Laoide BM, Foulkes NS, Schlotter F, Sassone-Corsi P (1993): The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. EMBO J 12: 1179-1191

Lau HKF (1999): Regulation of proteolytic enzymes and inhibitors in two smooth muscle cell phenotypes. Cardiovasc Res 43: 1049-1059

Lau HKF, Ho J (2002): Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 secretion by urokinase and tissue plasminogen activator in rat epithelioid-type smooth muscle cells. Br J Haematol 117: 151-158

Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL (2001): HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. Mol Cell Biol 21: 3995-4004

Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE (1997 a): A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. J Biol Chem 272: 21403-21407

Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE (1997 b): The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. J Biol Chem 272: 11439-11443

Le Magueresse-Battistoni B, Pernod G, Sigillo F, Kolodie L, Benahmed M (1998): Plasminogen activator inhibitor-1 is expressed in cultured rat Sertoli cells. Biol Reprod 59: 591-598

Lee CH, Li W, Nishimura R, Zhou M, Batzer AG, Myers MG Jr, White MF, Schlessinger J, Skolnik EY (1993): Nck associates with the SH2 domain-docking protein IRS-1 in insulin-stimulated cells. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 11713-11717

Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA (2000): Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction.N Engl J Med 342: 626-633

Lenzen C, Cool RH, Prinz H, Kuhlmann J, Wittinghofer A (1998): Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. Biochemistry 37: 7420-7430

Lehrach H, Diamond D, Wozney JM & Boedtker H (1977): RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry 16: 4743-4751

Li J, Larocca JN, Rodriguez-Gabin AG, Charron MJ (1997): Expression and signal transduction of the glucagon receptor in betaTC3 cells. Biochim Biophys Acta 1356: 229-236

Liao J, Barthel A, Nakatani K, Roth RA (1998): Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. J Biol Chem 273: 27320-27324

Lijnen HR, Collen D (1988): Mechanism of plasminogen activation by mammalian plasminogen activators. Enzyme 40: 90-96

Lijnen HR, Juhan-Vague I (2002): The fibrinolytic system and obesity. Thromb Haemost 88: 882

Lindahl TL, Ohlson PI, Wiman B (1990): Themechanism of the reaction between human plasminogen-aktivator inhibitor 1 and tissue plasminogen activator. Biochem J 265: 109-113

Lindgren A, Lindoff C, Norrving B, Astedt B, Johansson BB (1996): Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in stroke patients. Stroke 27: 1066-1071

Liu YX, Liu K, Zhou HM, Du Q, Hu ZY, Zou RJ (1995): Hormonal regulation of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured monkey Sertoli cells. Hum Reprod 10: 719-727

Liu YX, Peng XR, Liu HZ, Chen YJ, Ny T (1998): Prolactin regulation of tissue type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-I gene expression in eCG-primed rat granulosa cells in culture. Biol Reprod 59: 409-416

Loike JD, Cao L, Brett J, Ogawa S, Silverstein SC, Stern D (1992): Hypoxia induces glucose transporter expression in endothelial cells. Am J Physiol 263: C326-C333

Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J (1992): The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. Cell 70: 431-442

Magnuson NS, Beck T, Vahidi H, Hahn H, Smola U, Rapp UR (1994): The Raf-1 serine/threonine protein kinase. Semin Cancer Biol 5: 247-253

Maizels ET, Cottom J, Jones JC, Hunzicker-Dunn M (1998): Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. Endocrinology 139: 3353-3356

Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ (1995): Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. EMBO J 14: 3136-3145

Margaglione M, Di Minno G, Grandone E, Vecchione G, Celentano E, Cappucci G, Grilli M, Simone P, Panico S, Mancini M (1994): Abnormally high circulation levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with a history of ischemic stroke. Arterioscler Thromb 14: 1741-1745

Margarit SM, Sondermann H, Hall BE, Nagar B, Hoelz A, Pirruccello M, Bar-Sagi D, Kuriyan J (2003): Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. Cell 112: 685-695

Martegani E, Vanoni M, Zippel R, Coccetti P, Brambilla R, Ferrari C, Sturani E, Alberghina L (1992): Cloning by functional complementation of a mouse cDNA encoding a homologue of CDC25, a Saccharomyces cerevisiae RAS activator. EMBO J 11: 2151-2157

Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001): Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. EMBO J 20: 5197-5206

Masuda S, Chikuma M, Sasaki R (1997): Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. Brain Res 746: 63-70

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999): The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 399: 271-275

Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Göke B, Thorens B, Drucker DJ (2003): International Union of Pharmacology XXXV. The Glucagon Receptor Family. Pharmacol Rev 55: 167-194

McCormick F (1994): Activators and effectors of ras p21 proteins. Curr Opin Genet Dev 4: 71-76

McLeod SJ, Ingham RJ, Bos JL, Kurosaki T, Gold MR (1998): Activation of the Rap1 GTPase by the B cell antigen receptor. J Biol Chem 273: 29218-29223

Mei FC, Qiao J, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Quilliam LA, Cheng X (2002): Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. J Biol Chem 277: 11497-11504

Metjian A, Roll RL, Ma AD, Abrams CS (1999): Agonists cause nuclear translocation of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. A Gbetagamma-dependent pathway that requires the p110gamma amino terminus. J Biol Chem 274: 27943-27947

Meyer TE, Habener JF (1993): Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. Endocr Rev 14: 269-290

Mine T, Kojima I, Ogata E (1988): Sources of calcium mobilized by glucagon in isolated rat hepatocytes. Acta Endocrinol 119: 301-306

Mirza AM, Kohn AD, Roth RA, McMahon M (2000): Oncogenic transformation of cells by a conditionally active form of the protein kinase Akt/PKB. Cell Growth Differ 11: 279-292

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P (1993): Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. Cell 75: 875-886

Monfar M, Lemon KP, Grammer TC, Cheatham L, Chung J, Vlahos CJ, Blenis J (1995): Activation of pp70/85 S6 kinases in interleukin-2-responsive lymphoid cells is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and inhibited by cyclic AMP. Mol Cell Bio 15: 326-337

Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH (1986): Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. Proc Natl Acad Sci U S A 83: 6682-6686

Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A (1993): Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. Science 260: 1658-1661

Morris JK, Richards JS (1996): An E-box region within the prostaglandin endoperoxide synthase-2 (PGS-2) promoter is required for transcription in rat ovarian granulosa cells. J Biol Chem 271: 16633-16643

Motojima M, Ando T, Yoshioka T (2000): Sp1-like activity mediates angiotensin-II-induced plasminogen-activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene expression in mesangial cells. Biochem J 349: 435-441

M'Rabet L, Coffer P, Zwartkruis F, Franke B, Segal AW, Koenderman L, Bos JL (1998): Activation of the small GTPase rap1 in human neutrophils. Blood 92: 2133-2140

Murga C, Fukuhara S, Gutkind JS (2000): A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. J Biol Chem 275: 12069-12073

Myers MG Jr, White MF (1996): Insulin signal transduction and the IRS proteins. Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 615-658

Myers MG Jr, Wang LM, Sun XJ, Zhang Y, Yenush L, Schlessinger J, Pierce JH, White MF (1994): Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. Mol Cell Biol 14: 3577-3587

Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Parvin J, Montminy M (1997 a): Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors. Genes Dev 11: 738-747

Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Lee CG, Hurwitz J, Parvin JD, Montminy M (1997 b): RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. Cell 90: 1107-1112

Nancy V, Wolthuis RM, de Tand MF, Janoueix-Lerosey I, Bos JL, de Gunzburg J (1999): Identification and characterization of potential effector molecules of the Ras-related GTPase Rap2. J Biol Chem 274: 8737-8745

Nargolwalla C, McCabe D, Fritz IB (1990): Modulation of levels of messenger RNA for tissue-type plasminogen activator in rat Sertoli cells, and levels of messenger RNA for plasminogen activator inhibitor in testis peritubular cells. Mol Cell Endocrinol 70: 73-80

O'Brien RM, Granner DK (1996): Regulation of gene expression by insulin. Physiol Rev 76: 1109-1161

O'Brien RM, Streeper RS, Ayala JE, Stadelmaier BT, Hornbuckle LA (2001): Insulin-regulated gene expression. Biochem Soc Trans 29: 552-558

Ohtsuka T, Shimizu K, Yamamori B, Kuroda S, Takai Y (1996): Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein. J Biol Chem 271: 1258-1261

Oikawa T, Freeman M, Lo W, Vaughan DE, Fogo A (1997): Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of the renin-angiotensin inhibition. Kidney Int 51: 164-172

Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M (1993): Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. J Biol Chem 269: 3568-3573

Olman MA, Hagood JS, Simmons WL, Fuller GM, Vinson C, White KE (1999): Fibrin fragment induction of plasminogen activator inhibitor transcription is mediated by activator protein-1 through a highly conserved element. Blood 94: 2029-2038

O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, Pugh CW (1999): Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. J Biol Chem 274: 2060-2071

Parker BA, Stark GR (1979): Regulation of simian virus 40 transcription: sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA. J Virol 31: 360-369

Pasco DS, Fagan JB (1989): Efficient DNA-mediated gene transfer into primary cultures of adult rat hepatocytes. DNA 8: 535-541

Pawson T (1995): Protein modules and signalling networks. Nature 373: 573-580

Pawson T, Scott JD (1997): Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science 278: 2075-2080

Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Grignani F, Pawson T, Pelicci PG (1992): A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. Cell 70: 93-104

Pham N, Cheglakov I, Koch CA, de Hoog CL, Moran MF, Rotin D (2000): The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP. Curr Biol 10: 555-558

Pierrat B, Correia JS, Mary JL, Tomas-Zuber M, Lesslauer W (1998): RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK). J Biol Chem 273: 29661-29671

Pilkis SJ, Granner DK (1992): Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. Annu Rev Physiol 54: 885-909

Pittner RA, Fain JN (1991): Activation of membrane protein kinase C by glucagon and Ca(2+)-mobilizing hormones in cultured rat hepatocytes. Role of phosphatidylinositol and phosphatidylcholine hydrolysis. Biochem J 277: 371-378

Pizon V, Chardin P, Lerosey I, Olofsson B, Tavitian A (1988): Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the 'effector' region. Oncogene 3: 201-204

Post SR, Miyazaki H, Tager HS (1992): Identification of a Mg(2+)- and guanyl nucleotide-dependent glucagon receptor cycle by use of permeabilized canine hepatocytes. J Biol Chem 267: 25776-25785

Pronk GJ, McGlade J, Pelicci G, Pawson T, Bos JL (1993): Insulin-induced phosphorylation of the 46- and 52-kDa Shc proteins. J Biol Chem 268: 5748-5753

Proud CG, Denton RM (1997): Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. Biochem J 328: 329-341

Qiao J, Mei FC, Popov VL, Vergara LA, Cheng X (2002): Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP. J Biol Chem 277: 26581-26586

Qiu W, Zhuang S, von Lintig FC, Boss GR, Pilz RB (2000): Cell type-specific regulation of B-Raf kinase by cAMP and 14-3-3 proteins. J Biol Chem 275: 31921-31929

Quax PHA, van den Hoogen M, Verheijen JH, Padro T, Zeheb R, Gelehrter TD, van Berkel TJC, Kuiper J, Emeis J (1990): Edotoxin induction of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in rat tissues in vivo. J Biol Chem 265: 15560-15563

Quilliam LA, Mueller H, Bohl BP, Prossnitz V, Sklar LA, Der CJ, Bokoch GM (1991): Rap1A is a substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase in human neutrophils. J Immunol 147: 1628-1635

Quilliam LA, Huff SY, Rabun KM, Wei W, Park W, Broek D, Der CJ (1994): Membrane-targeting potentiates guanine nucleotide exchange factor CDC25 and SOS1 activation of Ras transforming activity. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 8512-8516

Rameh LE, Cantley LC (1999): The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. J Biol Chem 274: 8347-8350

Reif K, Nobes CD, Thomas G, Hall A, Cantrell DA (1996): Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. Curr Biol 6: 1445-1455

Reilly CF, McFall RC (1991): Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-β regulate plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 266: 9419-8714

Ren S, Cockell KA, Fenton JW, Angel A, Shen GX (1997): G proteins and phospholipase C mediate thrombin-induced generation of plasminogen activator inhibitor-1 from vascular smooth muscle cells. J Vasc Res 34: 82-89

Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J (1999): p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. J Biol Chem 274: 32631-32637

Richard DE, Berra E Pouyssegur J (2000): Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 275: 26765-26771

Rippe RA, Brenner DA, Leffert HL (1990): DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture. Mol Cell Biol 10: 689-695

Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW (1988): Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. J Biol Chem 263: 9063-9066

Rogue PJ, Humbert JP, Meyer A, Freyermuth S, Krady MM, Malviya AN (1998): cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and activates nuclear Ca2+-ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 9178-9183

Rothenberg PL, Lane WS, Karasik A, Backer J, White M, Kahn CR (1991): Purification and partial sequence analysis of pp185, the major cellular substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. J Biol Chem 266: 8302-8311

Rouille Y, Westermark G, Martin SK, Steiner DF (1994): Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 3242-3246

Rouille Y, Bianchi M, Irminger J, Halban P (1997 a): Role of the prohormone convertase PC2 in the processing of proglucagon to glucagon. FEBS Lett 413: 119-123

Rouille Y, Kantengwa S, Irminger J-C, Halban PA (1997 b): Role of the prohormone convertase PC3 in the in the processing of proglucagon to glucagon-like peptide-1. J Biol Chem 272: 32810-32816

Rozakis-Adcock M, McGlade J, Mbamalu G, Pelicci G, Daly R, Li W, Batzer A, Thomas S, Brugge J, Pelicci PG, Schlessinger J, Pawson T (1992): Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. Nature 360: 689-692

Rutter GA, White MR, Tavare JM (1995): Involvement of MAP kinase in insulin signalling revealed by non-invasive imaging of luciferase gene expression in single living cells. Curr Biol 5: 890-899

Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998): HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. EMBO J 17: 3005-3015

Rydholm H, Bostrom S, Eriksson E, Risberg B (1995): Complex intracellular signal transduction regulates tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) synthesis in cultured human umbilical vein endothelium. Scand J Clin Lab Invest 55: 323-330

Sable CL, Filippa N, Hemmings B, Van Obberghen E (1997): cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner. FEBS Lett 409: 253-257

Salceda S, Caro J (1997): Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. J Biol Chem 272: 22642-22647

Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ (1996): Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. J Clin Invest 97: 37-46

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: a laboratory manual, 2. Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989

Sandau KB, Faus HG, Brune B (2000): Induction of hypoxia-inducible-factor 1 by nitric oxide is mediated via the PI 3K pathway. Biochem Biophys Res Commun 278: 263-267

Santell L, Levin EG (1988): Cyclic AMP potentiates phorbol ester stimulation of tissue plasminogen activator release and inhibits secretion of plasminogen activator inhibitor-1 from human endothelial cells. J Biol Chem 263: 16802-16808

Sato K, Yamazaki K, Shizume K, Kanaji Y, Obara T, Ohsumi K, Demura H, Yamaguchi S, Shibuya M (1995): Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Grave's immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA expression in the rat thyroid in vivo. J Clin Invest 96: 1295-1302

Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB (1990): Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. J Cell Biol 111: 757-763

Schneider DJ, Nordt TK, Sobel BE (1992): Stimulation by proinsulin of expression of plasminogen activator inhibitor type-I in endothelial cells. Diabetes 41: 890-895

Schneider DJ, Absher PM, Ricci MA (1997): Dependence of augmentation of arterial endothelial cell expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by insulin on soluble factors released from vascular smooth muscle cells. Circulation 96: 2868-2876

Schneiderman J, Sawdey MS, Keeton MR, Bordin GM, Bernstein EF, Dilley RB, Loskutoff DJ (1992): Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 6998-7002

Scott JD, McCartney S (1994): Localization of A-kinase through anchoring proteins. Mol Endocrinol 10: 5-11

Seki T, Miyasu T, Noguchi T, Hamasaki A, Sasaki R, Ozawa Y, Okukita K, Declerck PJ, Ariga T (2001): Reciprocal regulation of tissue-type and urokinase-type plasminogen activators in the differentiation of murine preadipocyte line 3T3-L1 and the hormonal regulation of fibrinolytic factors in the mature adipocytes. J Cell Physiol 189: 72-78

Semenza GL (2000): HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. J Appl Physiol 88: 1474-1480

Semenza GL (2002): Pysiology meets biophysics: visualizing the interaction of hypoxia-inducible factor 1 alpha with p300 and CBP. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 11570-11572

Semenza GL, Wang GL (1992): A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol Cell Biol 12: 5447-5454

Sharma SC, Richards JS (2000): Regulation of AP1 (Jun/Fos) factor expression and activation in ovarian granulosa cells. Relation of JunD and Fra2 to terminal differentiation. J Biol Chem 275: 33718-33728

Sharma SC, Clemens JW, Pisarska MD, Richards JS (1999): Expression and function of estrogen receptor subtypes in granulosa cells: regulation by estradiol and forskolin. Endocrinology 140: 4320-4334

Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999): CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. Annu Rev Biochem 68: 821-861

Shimoda LA, Manalo DJ, Sham JS, Semenza GL, Sylvester JT (2001): Partial HIF-1alpha deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281: 202-208

Shou C, Farnsworth CL, Neel BG, Feig LA (1992): Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. Nature 358: 351-354

Simon MA, Bowtell DD, Dodson GS, Laverty TR, Rubin GM (1991): Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. Cell 67: 701-716

Simpson AJ, Booth NA, Moore NR, Bennett B (1991): Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. J Clin Pathol 44: 139-143

Sirois J, Richards JS (1993): Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Evidence for the role of a cis-acting C/EBP beta promoter element. J Biol Chem 268: 21931-21938

Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH, Lowenstein E, Mohammadi M, Margolis B, Schlessinger J (1993): The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. Science 260: 1953-1955

Slivka SR, Loskutoff DJ (1991): Regulation of type I plasminogen activator inhibitor synthesis by protein kinase C and cAMP in bovine aortic endothelial cells. Biochim Biophys Acta 1094: 317-322

Sobel BE, Woodcock-Mitchell J, Schneider DJ, Holt RE, Marutsuka K, Gold H (1998): Increased plasminogen activator inhibitor type 1 in coronary artery atherektomy speciens from type 2 diabetic compared with nondiadetic patients: a potential factor predisponsing to thrombosis and its persistence. Circulation 97: 2213-2221

Sodhi A, Montaner S, Miyazaki H, Gutkind JS (2001): MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF. Biochem Biophys Res Commun 287: 292-300

Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, Neel BG, Birge RB, Fajardo JE, Chou MM, Hanafusa H, Schaffhausen B, Cantley LC (1993): SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. Cell 72: 767-778

Sprengers ED, Kluft C (1987): Plasminogen aktivator inhibitors. Blood 69: 381-387

Stambolic V, Suzuki A, de-la PJ, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998): Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. Cell 95: 29-39

Staples KJ, Bergmann M, Tomita K, Houslay MD, McPhee I, Barnes PJ, Giembycz MA, Newton R (2001): Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)-dependent inhibition of IL-5 from human T lymphocytes is not mediated by the cAMP-dependent protein kinase A. J Immunol 167: 2074-2080

Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT (1997): The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. Cell 89: 105-114

Stephens LR, Anderson K, Stokoe D, Erdjument BH, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins PT (1998): Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. Science 279: 710-714

Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T (2002): Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. FEBS Lett 512: 157-162

Streeper RS, Chapman SC, Ayala JE, Svitek CA, Goldman JK, Cave A, O'Brien RM (1998): A phorbol ester-insensitive AP-1 motif mediates the stimulatory effect of insulin on rat malic enzyme gene transcription. Mol Endocrinol 12: 1778-1791

Sugano T, Tsuji H, Masuda H, Nishimura H, Yoshizumi M, Kawano H, Kimura S, Ukimura N, Yano S, Kunieda Y, Nakagawa K, Nakagawa M (2001): Adrenomedullin inhibits angiotensin II-induced expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured rat aortic endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21: 1078-1083

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF (1991): Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. Nature 352: 73-77

Sun XJ, Miralpeix M, Myers MG Jr, Glasheen EM, Backer JM, Kahn CR, White MF (1992): Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. J Biol Chem 267: 22662-22672

Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG Jr, Miralpeix M, White MF (1993): Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. Mol Cell Biol 13: 7418-7428

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF (1995): Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. Nature 377: 173-177

Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996): Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 461-480

Taha C, Liu Z, Jin J, Al-Hasani H, Sonenberg N, Klip A (1999): Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. J Biol Chem 274: 33085-33091

Takahashi H, Uno S, Watanabe Y, Arakawa K, Nakagawa S (2000): Expression of nerve growth factor-induced type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) mRNA is inhibited by genistein and wortmannin. Neuroreport 11: 1111-1115

Takahata S, Sogawa K, Kobayashi A, Ema M, Mimura J, Ozaki N, Fujii-Kuriyama Y (1998): Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. Biochem Biophys Res Commun 248: 789-794

Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L (2000): Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. EMBO J 19: 4298-4309

Thalacker FW, Nilsen-Hamilton M (1992): Opposite and independent actions of cyclic AMP and transforming growth factor beta in the regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor expression. Biochem J 287: 855-862

Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, Hallmans G (1998): High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. Circulation 98: 2241-2247

Thorsen S (1992): The mechanism of plasminogen activation and the variability of the fibrin effector during tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis. Ann N Y Acad Sci 667: 52-63

Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997): Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. Genes Dev 11: 72-82

Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL (1998): The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. Genes Dev 12: 3320-3324

Tillmann-Bogush M, Heaton JH, Gelehrter TD (1999): Cyclic nucleotide regulation of PAI-1 mRNA stability. Identification of cytosolic proteins that interact with an a-rich sequence. J Biol Chem 274: 1172-1179

Tranque P, Robbins R, Naftolin F, Andrade-Gordon P (1992): Regulation of plasminogen activators and type-1 plasminogen activator inhibitor by cyclic AMP and phorbol ester in rat astrocytes. Glia 6: 163-171

Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Semenza GL, Van Obberghen E (2002): Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. J Biol Chem 277: 27975-27981

Ueda H, Itoh H, Yamauchi J, Morishita R, Kaziro Y, Kato K, Asano T (2000): G protein betagamma subunits induce stress fiber formation and focal adhesion assembly in a Rho-dependent manner in HeLa cells. J Biol Chem 275: 2098-2102

Ui M, Okada T, Hazeki K, Hazeki O (1995): Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. Trends Biochem Sci 20: 303-307

Uno S, Nakamura M, Seki T, Ariga T (1997): Induction of tissue-type plasminogen activator (tPA) and type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) as early growth responses in rat hepatocytes in primary culture. Biochem Biophys Res Commun 239: 123-128

Uno S, Nakamura M, Ohomagari Y, Matsuyama S, Seki T, Ariga T (1998): Regulation of tissue-type plasminogen activator (tPA) and type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene expression in rat hepatocytes in primary culture. J Biochem 123: 806-812

Unson CG, Cypess AM, Wu CR, Goldsmith PK, Merrifield RB, Sakmar TP (1996): Antibodies against specific extracellular epitopes of the glucagon receptor block glucagon binding. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 310-315

Van Aelst L, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M (1993): Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 6213-6217

Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA (1993): Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. Cell 74: 205-214

Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ (1997): cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. Cell 89: 73-82

Vuorinen-Markkola H, Puhakainen I, Yki-Jarvinen H (1992): No evidence for short-term regulation of plasminogen activator inhibitor activity by insulin in man. Thromb Haemost 67: 117-120

Wagner OF, de Vries C, Hohmann C, Veerman H, Pannekock H (1989): Interaction between plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) bound to fibrin and either tissue-type plasminogen activator (t-PA) or urokinase-type plasminogen activator (u-PA): binding of t-PA/PAI-1 complexes to fibrin mediated by both the finger and the kringle-2 domain of t-PA. J Clin Invest 84: 647-655

Wakelam MJ, Murphy GJ, Hruby VJ, Houslay MD (1986): Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. Nature 323: 68-71

Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG (1968): An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. J Biol Chem 243: 3763-3765

Wang D, Sul HS (1997): Upstream stimulatory factor binding to the E-box at -65 is required for insulin regulation of the fatty acid synthase promoter. J Biol Chem 272: 26367-26374

Wang GL, Semenza GL (1995): Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 270: 1230-1237

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O_2 tension. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 5510-5514

Warne PH, Viciana PR, Downward J (1993): Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. Nature 364: 352-355

Waters SB, Yamauchi K, Pessin JE (1995): Insulin-stimulated dissociation of the Sos-Grb2 complex. Mol Cell Biol 15: 2791-2799

Wei W, Mosteller RD, Sanyal P, Gonzales E, McKinney D, Dasgupta C, Li P, Liu BX, Broek D (1992): Identification of a mammalian gene structurally and functionally related to the CDC25 gene of Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 7100-7104

Wenger RH (2002): Cellular adaptation to hypoxia: O_2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O_2-regulated gene expression. FASEB J 16: 1151-1162

Wenger RH, Rolfs A, Marti HH, Guenet JL, Gassmann M (1996): Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1 alpha. Biochem Biophys Res Commun 223: 54-59

White LA, Bruzdzinski C, Kutz SM, Gelehrter TD, Higgins PJ (2000): Growth state-dependent binding of USF-1 to a proximal promoter E box element in the rat plasminogen activator inhibitor type 1 gene. Exp Cell Res 260: 127-35

White MF, Kahn CR (1994): The insulin signaling system. J Biol Chem 269: 1-4

White MF, Maron R, Kahn CR (1985): Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. Nature 318: 183-186

Wiener CM, Booth G, Semenza GL (1996): In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. Biochem Biophys Res Commun 225: 485-488

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (1998): Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. Blood 92: 2260-2268

Williams NG, Roberts TM (1994): Signal transduction pathways involving the Raf proto-oncogene. Cancer Metastasis Rev 13:105-116

Wiman B (1995): Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: its role in thrombotic disease. Thromb Haemost 74: 71-76

Wiman B, Ljungberg B, Chmielewska J, Urden G, Blomback M, Johnsson H (1985): The role of the fibrinolytic system in deep vein thrombosis. J Lab Clin Med 105: 265-270

Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW (1993): Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. Science 262: 1065-1069

Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Panayotou G (1996): Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. Mol Cell Biol 16: 1722-1733

Yamamoto KK, Loskutoff DJ (1997): The kidneys of mice with autoimmune disease acquire a hypofibrinolytic/procoagulant state that correlates with the development of glomerulonephritis and tissue microthrombosis. Am J Pathol 151: 725-734

Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH III, Montminy MR (1988): Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. Nature 334: 494-498

Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR (1998): Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. Nature 396: 584-587

Young AA, Cooper GJ, Carol P, Rink TJ, Wang MW (1993): Response to intravenous injection of amylin and glucagon in fasted, fed, and hypoglycemic rats. Am J Physiol Endocrinol Metab 264: E943-E950

Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester JT, Semenza GL (1999): Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. J Clin Invest 103: 691-696

Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS (2001): HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 9630-9635

Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Shioya H, Utsugisawa Y, Yokoyama K, Weichselbaum R, Shi Y, Kufe D (1999): Role for p300 in stabilization of p53 in the response to DNA damage. J Biol Chem 274: 1883-1886

Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B (1998): Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. EMBO J 17: 5085-5094

Zhao H, Okada S, Pessin JE, Koretzky GA (1998): Insulin receptor-mediated dissociation of Grb2 from Sos involves phosphorylation of Sos by kinase(s) other than extracellular signal-regulated kinase. J Biol Chem 273: 12061-12067

Zheng CF, Guan KL (1994): Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. EMBO J 13: 1123-1131

Zhou YD, Barnard M, Tian H, Li X, Ring HZ, Francke U, Shelton J, Richardson J, Russell DW, McKnight SL (1997): Molecular characterization of two mammalian bHLH-PAS domain proteins selectively expressed in the central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 713-718

Zidovetzki R, Wang JL, Kim JA, Chen P, Fisher M, Hofman FM (1999): Endothelin-1 enhances plasminogen activator inhibitor-1 production by human brain endothelial cells via protein kinase C-dependent pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 1768-1775

Zundel W, Swiersz LM, Giaccia A (2000): Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. Mol Cell Biol 20: 1507-1514

Zwartkruis FJ, Wolthuis RM, Nabben NM, Franke B, Bos JL (1998): Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling. EMBO J 17: 5905-5912

LEBENSLAUF

Ich, Małgorzata Maria Jakubowska, wurde am 15.08.1974 als Tochter von Jolanta Aniela Świątkiewicz-Jakubowska (Ärztin) und Ryszard Paweł Jakubowski (Ingenieur) in Końskie, Polen geboren.

Die Grundschule besuchte ich in Szydłowiec und Kielce (Polen) bis zur fünften Klasse. Im Alter von 12 Jahren bin ich im Juli 1986 in die Bundesrepublik Deutschland gekommen, wo ich weiter die Grundschule (09/86 - 01/87 Carl-Diem-Schule) und anschließend die Orientierungsstufe (02/87 - 06/88 Riesschule) in Ritterhude, Niedersachsen besuchte. Von August 1988 bis Juni 1995 habe ich bis zum Abschluss meiner Schulbildung Gymnasien in Niedersachsen und Bremen besucht (08/88 - 07/89 Gymnasium Osterholz-Scharmbeck (Niedersachsen); 08/89 - 07/90 Gymnasium an der Drebberstraße (Bremen); 08/90 - 07/92 Gymnasium an der Ronzelenstraße (Bremen); 08/92 - 06/95 Schulzentrum des Sekundarbereichs II Horn (Bremen)). Meine Schulbildung habe ich am 28.06.1995 mit der allgemeinen Hochschulreife / Abitur abgeschlossen.

Anschließend begann ich im Oktober 1995 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen (10/95 - 03/01). Während meiner Studienzeit habe ich die experimentelle Arbeit zur vorliegenden Dissertation am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Georg-August-Universität Göttingen (Leiter: Prof. Dr. K. Jungermann) begonnen. Ab April 2001 habe ich an der Hochschule des Saarlandes, Homburg an der Saar das Medizinstudium fortgesetzt (04/01- 04/02) und am 26.04.2002 mit dem 3. Staatsexamen abgeschlossen.

Während meiner Studienzeit war ich im Rahmen meiner Promotionsarbeit am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie an der Georg-August-Universität Göttingen als wissenschaftliche Hilfskraft tätig. Des Weiteren bin ich seit Oktober 2000 freie Autorin für den Deutschen Ärzte-Verlag GmbH, Köln und freie Mitarbeiterin der Unternehmensberatung TCC Trans Clinic Consultants GmbH, Saarbrücken.

Nach Abschluss des Medizinstudiums war ich am Caritas-Krankenhaus Dillingen/Saar als Ärztin im Praktikum im Fachbereich Neurologie beschäftigt (06/02 – 11/03) und bin seit dem 1. Dezember 2003 als Assistenzärztin ebenfalls am Caritas-Krankenhaus Dillingen/Saar im Fachbereich Neurologie angestellt.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kurt Jungermann für die Überlassung des Dissertationsthemas. Leider konnte er die Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr miterleben.

PD Dr. Thomas Kietzmann, dem Betreuer und spiritus rector dieser Arbeit, danke ich ganz besonders für die Unterstützung, die vielen Tips und Anregungen im Verlauf dieser Arbeit. Durch die Übernahme der Dissertation erhielt ich die Möglichkeit zu einem erfolgreichen Ende, wofür ich mich nochmals an dieser Stelle bedanken möchte.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Abteilung, die mir immer behilflich waren und für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten. Besonders bei Steffi, Katja, Uli und Anja möchte ich mich für die Einarbeitung und Hilfe bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an meine Familie und Freunde, insbesondere Volker Bahr, für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.