



Daniela Flügel (Autor)

Regulation der Stabilität des Hypoxie-induzierbaren Faktors durch Glycogen-Synthase-Kinase-3



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2270>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1 Der Hypoxie-induzierbare Faktor	6
1.2 Aktivierung und Stabilisierung von HIF-1 α unter Hypoxie	7
1.3 Aktivierung und Kontrolle der HIF-1 α -Aktivität durch Insulin	7
1.4 Regulation der GSK-3 durch Insulin und den Wnt-Signalweg	8
1.5 Aufgabenstellung	11
2. Material	12
2.1 Geräte	12
2.2 Chemikalien	13
2.3 Sonstige Materialien	15
2.4 Nachweis- und Reinigungssysteme	16
2.5 Molekulare-Standards	16
2.5.1 DNA-Längenstandards	16
2.5.2 Protein-Standards	16
2.6 Stammlösungen	16
2.7 Enzyme	18
2.7.1 Restriktionsendonucleasen mit Erkennungssequenzen	18
2.7.2 DNA-modifizierende Enzyme	19
2.7.3 Sonstige Enzyme	19
2.8 Antikörper	20
2.9 Tiere und Tierhaltung	21
2.10 Eukaryote Zelllinien	21
2.11 Bakterien, Plasmide und Vektoren	21
2.11.1 E. coli-XL-1 (blue)	21
2.11.2 Plasmidkonstrukte: pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Konstrukte, pcDNA6/Myc-His A-Konstrukte, pCMV-Myc-Konstrukte, pGEX-5X1-Konstrukte	22

2.11.3	Weitere Vektoren	29
	<i>pGI3-Konstrukte</i>	29
	<i>p5GE1B-Luc</i>	30
	<i>pCMV2-Gal4-TADN-HIF-1α Wildtyp</i>	30
	<i>pCMV2-Gal4-TADC- HIF-1α Wildtyp</i>	30
2.12	Digoxigenin-markierte RNA-Sonden	31
3.	Methoden	32
3.1	Zellbiologische Methoden	32
3.1.1	Isolierung von Rattenhepatocyten	32
	<i>Perfusion der Leber</i>	32
	<i>Herstellung der Hepatocytensuspension</i>	32
3.1.2	Primärkultur von Rattenhepatocyten	34
3.1.3	Kultur von HepG2-Zellen und COS-7-Zellen	35
	<i>Anlegen und Weiterführen einer Kultur</i>	35
	<i>Medium für HepG2- und COS-7-Zellen</i>	36
3.1.4	Induktionsversuche in transient transfizierten HepG2-Zellen	36
3.1.5	Ernte und Zellaufschluß von HepG2-Zellen	36
3.2	Molekularbiologische Methoden	38
3.2.1	Herstellung elektrokompetenter E.coli	38
3.2.2	Transformation von E.coli	39
	<i>Elektrische Transformation von E.coli</i>	39
3.2.3	Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA (Minipräparation)	40
	<i>Minipräparation</i>	41
	<i>Restriktionsanalyse</i>	42
3.2.4	Gelelektrophorese	42
3.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	43
3.2.6	Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA (Maxipräparation)	44
3.2.7	Charakterisierung der Plasmide durch Sequenzierung	46
3.2.8	Aufreinigung der Proben	46
3.2.9	Automatische Sequenzierung und EDV-gestützte Auswertung	47
3.2.10	Transfektion von HepG2- und COS-7-Zellen nach der Calcium-Phosphat-Technik	47
3.2.11	RNA-Isolierung aus primären Rattenhepatocyten und HepG2-Zellen	48

Inhaltsverzeichnis	III
3.3 Biochemische Methoden	49
3.3.1 Northern Blot Analyse	49
<i>Denaturierung der RNA</i>	50
<i>Elektrophoresebedingungen</i>	50
<i>Visualisierung der RNA mit Ethidiumbromid</i>	51
<i>Transfer auf eine Nylonmembran</i>	51
<i>Hybridisierung der RNA mit Digoxigenin-markierten Sonden</i>	52
<i>Detektion und Quantifizierung</i>	53
3.3.2 Methode zur Isolierung der Gesamtproteine aus HepG2-Zellen	54
3.3.3 Methode zur Isolierung der Gesamtproteine aus COS-7-Zellen	56
3.3.4 Proteinbestimmung	56
3.3.5 Western Blot Analyse	57
<i>Vorbereitung der Proteine für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	57
<i>Präparation eines SDS-Minigels und Durchführung der Elektrophorese</i>	58
<i>Blotten der Proteine auf Nitrocellulose (NC)</i>	59
<i>Inkubation des "Blots" mit Antikörpern</i>	61
<i>Nachweis der gebundenen Antikörper über den Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörper</i>	62
<i>Erneute Verwendung des NC-Filters</i>	62
3.3.6 Luciferase Nachweis	63
3.3.7 Anreicherung von Expressionsproteinen in E.coli und Aufreinigung mittels Glutathion-Sepharose 4B	63
<i>Transformation</i>	63
<i>Expression</i>	64
<i>Analyse der exprimierten Proteine</i>	64
<i>Aufreinigung der Expressionsproteine aus E.coli</i>	64
<i>Aufreinigung der Expressionsproteine mittels Glutathion-Sepharose 4B</i>	64
<i>Elution</i>	65
3.3.8 GSK-Kinase-Assay	66
Phosphorimager	67
4. Ergebnisse	68
4.1 Aktivierung der PAI-1- und HIF-1α-Expression in primären Rattenhepatocyten und HepG2-Zellen	68
4.1.1 Induktion der PAI-1-mRNA- und HIF-1 α -Protein-Spiegel durch Lithiumchlorid und Insulin in primären Rattenhepatocyten und HepG2-Zellen	68

4.1.2	Fehlender Einfluß von Rapamycin auf die Induktion der PAI-1-mRNA und des HIF-1 α -Proteins durch venösen pO ₂ in primären Ratten-hepatocyten und HepG2-Zellen	70
4.1.3	Hemmung der PAI-1-Promotor abhängigen Luciferase-Aktivität durch GSK-3 in HepG2-Zellen	71
4.2	Modulation des HIF-1α-Proteinspiegels durch Lithiumchlorid (LiCl), Cycloheximid (CHX) und Actinomycin D (Act. D)	72
4.3	Regulation der HIF-1α-Proteinmenge durch GSK-3 in HepG2-Zellen	73
4.3.1	Regulation des Transaktivierungspotentials von HIF-1 α durch GSK-3 α und GSK-3 β in HepG2- und COS-7-Zellen	74
4.4	Modulation des gesamten HIF-1α Proteins durch die GSK-3 in HepG2-Zellen	76
4.5	Modulation der HIF-1α N-terminalen Transaktivierungsdomäne bei Punktmutation der GSK-3-Phosphorylierungsstellen in HepG2- und COS-7-Zellen	79
4.6	Modulation des gesamten humanen HIF-1α Proteins durch die GSK-3 in HepG2-Zellen	83
4.7	Phosphorylierung der HIF-1α-TADN durch GSK-3	86
4.8	Modulation des HIF-2α Proteins durch GSK-3 in HepG2- und COS-7-Zellen	87
4.9	Modulation des HIF-3α Proteins in HepG2-Zellen	89
5.	Diskussion	91
5.1	Insulin-vermittelte Aktivierung der PAI-1-Genexpression über PI3K, PKB und den Transkriptionsfaktor HIF-1α	91
5.2	Regulation der HIF-1α-Spiegel durch GSK-3α und GSK-3β auf Ebene der Translation und Proteinstabilität	92
5.3	Mutationen der GSK-3-Phosphorylierungsstellen innerhalb der HIF-1α N-terminalen Transaktivierungsdomäne steigern die Proteinstabilität	93
5.3.1	Die VHL-Bindungsstellen haben keinen Einfluss auf die Regulation von HIF-1 α durch die GSK-3	94
5.3.2	Die HIF-1 α -TADN ist Substrat der GSK-3	96
5.4	Bedeutung der Mutationen der GSK-3-Phosphorylierungsstellen innerhalb der HIF-2α N-terminalen Transaktivierungsdomäne	96

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	V
5.5 Einfluss der Proteinkinase B auf das Transaktivierungspotential von HIF-3α	97
5.6 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der HIF-1α Regulation durch die GSK-3	98
Literaturverzeichnis	101