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