



Małgorzata Maria Jakubowska (Autor)

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

Małgorzata M. Jakubowska

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

 Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2770>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

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
	<i>Perfusion der Leber</i>	28
	<i>Herstellung der Hepatozytensuspension</i>	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
	<i>Maxipräparation</i>	35
	<i>Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA</i>	36
3.2.4	Transfektion von Hepatozyten mit der Calcium-Phosphat-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
	<i>Denaturierung der RNA</i>	42
	<i>Elektrophoresebedingungen</i>	42
	<i>Visualisierung der RNA mit Ethidiumbromid</i>	43
	<i>Transfer der RNA auf Nylonmembran</i>	43
	<i>Hybridisierung der RNA mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden</i>	44
	<i>Detektion und Quantifizierung</i>	45
3.3	Biochemische Methoden	46
3.3.1	Proteinbestimmung	46
3.3.2	Western-Blot-Analyse	47

<i>Vorbereitung der Proteine für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	47
<i>Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen</i>	47
<i>Blotten der Proteine auf Nitrocellulose (NC)</i>	49
<i>Inkubation des "Blots" mit Antikörpern</i>	51
<i>Nachweis der gebundenen Antikörper durch die Peroxidase-Reaktion</i>	52
3.3.3 Luciferase-Nachweis	52
3.4 Sicherheitsmaßnahmen	53
4. ERGEBNISSE	54
4.1 Modulation der PAI-1-Genexpression durch Insulin und pO₂ 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 pO₂ 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 pO₂ (16% O₂) 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 pO₂ 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% O₂) und venösem (8% O₂) pO₂	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% O₂) und venösem (8% O₂) pO₂	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