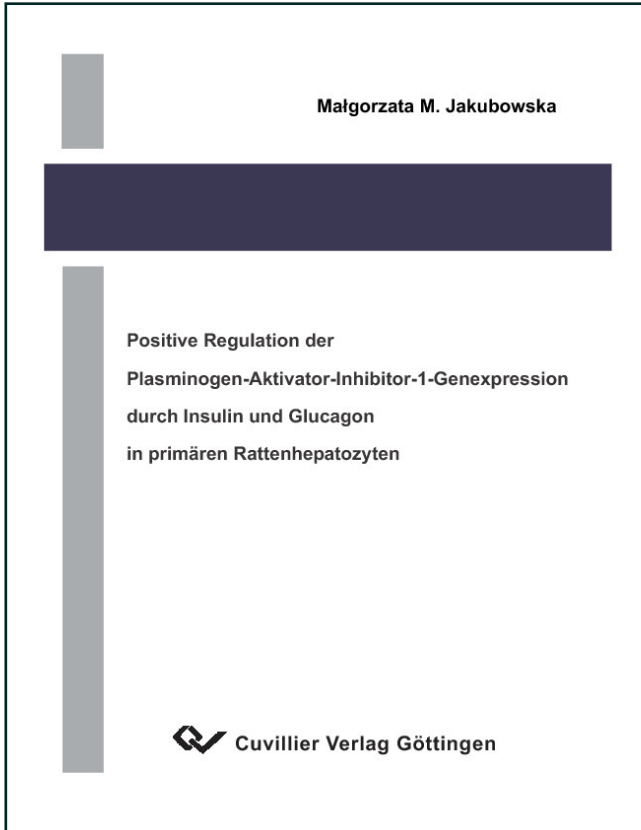




Malgorzata Maria Jakubowska (Autor)
**Positive Regulation der Plasminogen-Aktivator-
Inhibitor-1-Genexpression durch Insulin und
Glucagon in primären Rattenhepatozyten**



<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 |