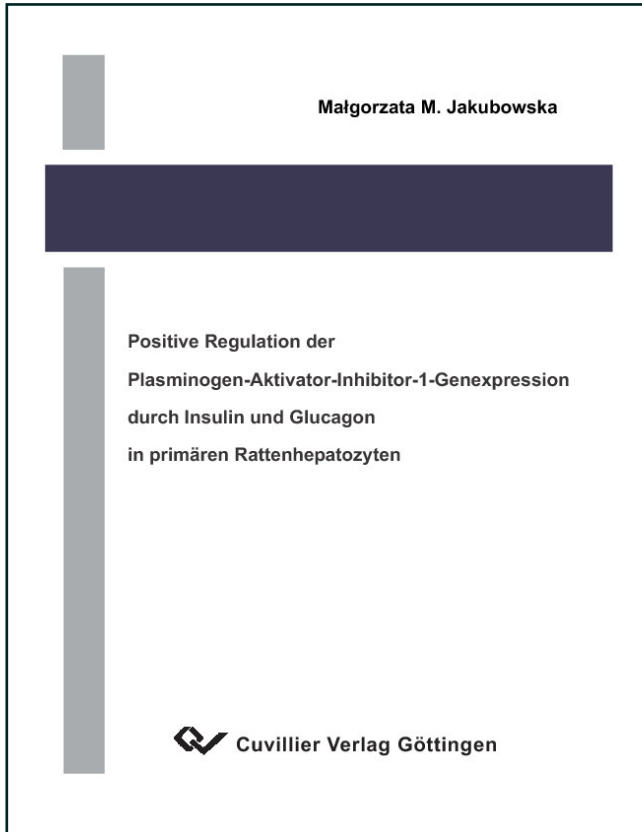




Małgorzata Maria Jakubowska (Autor)

**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](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

## 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 Extrazellulärmatrix regulatorisch beteiligt. Neben PAI-1 sind z.B. das  $\zeta$  1-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 Klufft 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  $\zeta_2$ -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).

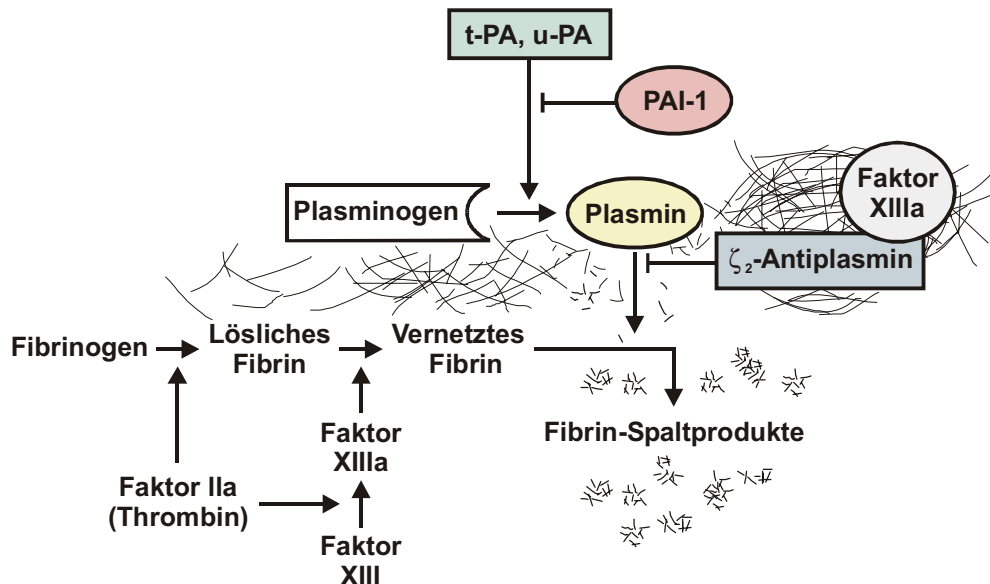


Abb. 1: **Fibrinolyse.** Die Hauptreaktionen des Gerinnungssystems sind in das endogene (intravaskuläre) und exogene (extravaskuläre) System gegliedert (nicht dargestellt). Beide Gerinnungskaskaden führen zu Bildung des Prothrombin-Komplexes (Prothrombinase), Fibrinmonomerbildung aus Fibrinogen, Bildung 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.  $\zeta_2$ -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  $\eta$ FGF (basic fibroblast growth factor) (Lau 1999), TGF- $\eta$  (transforming growth factor) (Sato Y et al. 1990), Angiotensin-II (Oikawa et al. 1997; Brown et al. 2000), TNF- $\zeta$  (Tumornekrose-Faktor- ) (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- $\nu$  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 (Bruzdinski 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 (Bruzdinski 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-<br>element | TF       | Sequenz / Consensussequenz  | Mensch |
|----------------------|----------|---|--------|
| A-1                  | PEA3     | -56 TCATCTATTTCCGGCCACA -37<br>* *<br>ACATCCTC<br>T G                     | 95%    |
|                      |          | A-2   | Sp-1   |
| B                    | Sp-1     | TG G GGC<br>GAGGCTGAAT<br>* **  | 33%    |
|                      | CTF/NF-1 | -119 CAGGGCGGGCGAGCA -105<br>*<br>TGGCNNNNNGCCAA<br>A                     |        |
| C                    | ?        | -171 TACACACACGTGT -159   | 79%    |
| D                    | ?        | -210 AGGATTTGCTCAATTATCC -192   | 79%    |
| E                    | Sp-1     | TG G GGC<br>GAGGCTGAAT<br>* *   | 62%    |
|                      | CTF/NF-1 | -477 TGGCACTGGGCAGAAACCCAAGAGAAAGCCAAG -445<br>* *<br>TGGCNNNNNGCCAA<br>A |        |
| F                    | CTF/NF-1 | -542 TCTATTGGGCTTAAGTCCAAGAGG -519<br>* *<br>TGGCNNNNNGCCAA<br>A          | 75%    |
| G                    | ?        | -666 GGTATTGACACAAAGAGC -648  | 90%    |

Referenzen Consensussequenz: PEA3 (Gutman und Wasylyk 1990), Sp-1 (Dyanan 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-Genexpression 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) <sup>1</sup><br>Sterol-regulatorisches-Element-bindendes Protein (SREBP) <sup>2</sup><br>Fettsäure-Synthase (FAS) <sup>3</sup><br>Pyruvatkinase (PK) (indirekt) <sup>4</sup><br>Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) <sup>5</sup> |
| -supprimierte Genexpression | Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 1 (PCK-1) <sup>6</sup><br>Glucose-6-Phosphatase (G-6-Pase) <sup>7</sup><br>Fructose-1,6-Bisphosphatase (F-1,6-BP) <sup>8</sup><br>Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-bindendes Protein (IGF-BP1) <sup>9</sup>           |

(1) Iynedjian et al. 1989; (2) Kim JB et al. 1998; (3) Wang D und Sul 1997; (4) Assimacopoulos-Jeannot 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.