



Jae-Sun Kim (Autor)

Isolation und Charakterisierung von Spleißvarianten des Glucagon-Rezeptors der Ratte

Jae-Sun Kim

**Isolation und Charakterisierung von
Spleißvarianten des Glucagon-Rezeptors
der Ratte**



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3188>

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

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
VERZEICHNIS DER AMINOSÄUREN UND IHRER ABKÜRZUNGEN	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
TABELLENVERZEICHNIS	XI
ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	3
1.1 Intestinale Resorption von Kohlenhydraten	3
1.2 Regulation der intestinalen Resorption der Kohlenhydrate	3
1.3 Glucagon-37 (Oxyntomodulin)	5
1.4 Glucagon-Secretin-Rezeptor-Familie	6
1.5 Aufgabenstellung	9
2. MATERIAL	10
2.1 Tiere und Tierhaltung	10
2.2 Eukaryote Zelllinie	10
2.2.1 COS-7-Zelllinie	10
2.3 Bakterien, Vektoren und Plasmidkonstrukte	10
2.3.1 Bakterien	10
2.3.2 Vektoren	11
2.3.3 Plasmid-Gen-Konstrukte	14
2.4 Oligonukleotide (Primer)	19
2.4.1 Degenerierte Oligonukleotide für Low-Stringency-PCR	19
2.4.2 Oligonukleotide für RT-PCR	20
2.4.3 „Antisense“-Oligonukleotide aus dem Gcg29R-Gen für 5'-RACE-PCR	21
2.4.4 Oligonukleotide für Sequenzierung der Plasmide	22
2.4.5 Oligonukleotide zur Herstellung von Plasmidkonstrukten mittels PCR für Expressionsversuche	22
2.4.6 Oligonukleotide für sequenzgerichtete Mutagenese-PCR	22
2.5 Antikörper	23
2.6 Enzyme	23
2.7 Nachweis-, Reinigungs- und Synthesesysteme ("Kits")	26
2.8 Stammlösungen	27
2.9 Chemikalien	29

2.10	Sonstige Materialien	31
2.11	Geräte	31
3.	METHODEN	33
3.1	Zellbiologische Methoden	33
3.1.1	Isolierung von Rattenenterocyten	33
3.1.2	Isolierung von Rattenhepatocyten.....	35
	<i>Perfusion der Leber</i>	35
	<i>Herstellung der Hepatocytensuspension</i>	36
3.2	Molekularbiologische Methoden	39
3.2.1	Isolierung und Nachweis von spezifischer RNA und DNA.....	39
	<i>RNA-Isolierung aus Gewebe</i>	40
3.2.2	cDNA-Synthese durch reverse Transkription (RT).....	41
3.2.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction).....	43
3.2.4	Low-Stringency-PCR (LS-PCR)	46
3.2.5	5'-RACE-PCR (RACE = <u>R</u> apid <u>A</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>E</u> nds)	47
3.2.6	PCR-gestützte zielgerichtete Mutagenese	49
3.2.7	Kolonie-PCR	50
3.2.8	Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Detektion	51
3.2.9	Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	52
3.2.10	Sequenzierung von DNA.....	53
3.2.11	Ligation der PCR-Fragmente in das Plasmid pGEM [®] -T Easy.....	55
3.2.12	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	56
3.2.13	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit dem Ligationsansatz	57
3.2.14	Isolierung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab (Minipräparation)	59
	<i>Minipräparation</i>	59
	<i>Restriktionsanalyse</i>	60
3.2.15	Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA (Maxipräparation)	61
3.3	Biochemische Methoden	63
3.3.1	Expression der Rezeptorproteine in eukaryonten COS-7 Zellen.....	63
	<i>Kultivierung der COS-7-Zellen</i>	63
	<i>Transiente Transfektion der COS-7-Zellen</i>	63
3.3.2	Kompetitionsbindungsstudien zur Bestimmung der Bindungskonstanten.....	65
3.3.3	Bestimmung der Signaltransduktionseigenschaften des Gcg29-Rezeptors und seiner Spleißvarianten-Rezeptoren Quantifizierung der cAMP- Konzentrationen im RIA (Radioimmunoassay).....	66
3.3.4	Quantifizierung der cAMP-Konzentrationen im RIA (Radioimmunoassay).....	67

3.3.5	Gesamtproteinisolierung aus kultivierten Zellen.....	68
3.3.6	Proteinbestimmung mittels Bradford-Methode.....	68
3.3.7	Western-Blot-Analyse.....	69
	<i>Vorbereitung der Proteine für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....</i>	<i>69</i>
	<i>Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen.....</i>	<i>69</i>
	<i>Präparation eines SDS-Minigels und Durchführung der Elektrophorese.....</i>	<i>72</i>
	<i>Blotten der Proteine auf Nitrocellulose (NC).....</i>	<i>72</i>
	<i>Inkubation des "Blots" mit Antikörpern.....</i>	<i>74</i>
	<i>Nachweis der gebundenen Antikörper durch die Peroxidase-Reaktion.....</i>	<i>75</i>
3.3.8	Immunofluoreszenz-mikroskopischer Nachweis der mit EGFP fusionierten Rezeptoren in transient transfizierten COS-7-Zellen.....	75
	<i>Kultivierung und Transfektion der Zellen.....</i>	<i>75</i>
	<i>Fixierung.....</i>	<i>76</i>
	<i>Einbettung.....</i>	<i>76</i>
3.4	Sicherheitsmaßnahmen.....	77
4.	ERGEBNISSE.....	78
4.1	Identifizierung der Gcg29-, GLP1-, Secretin- und VIP-Rezeptor- mRNA aus Enterocyten mittels Low-Stringency-PCR (LS-PCR).....	78
4.2	Differentielle Gen-Expression der Rezeptoren für Gcg29, GLP1, GLP2, GIP, Secretin und VIP im Dünndarm der Ratte.....	78
4.3	Identifizierung von Spleißvarianten der Glucagon-Rezeptor-mRNA der Ratte.....	81
4.3.1	Identifizierung von Spleißvarianten der Gcg29-Rezeptor-mRNA mittels LS-PCR (Low-Stringency-PCR).....	83
4.3.2	Identifizierung von Spleißvarianten der Gcg29R-mRNA mittels 5´-RACE (<u>R</u> apid <u>A</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>E</u> nds).....	83
4.3.3	Identifizierung von Spleißvarianten der Gcg29R-mRNA mittels RT-PCR.....	86
4.3.4	Sequenzanalyse der identifizierten Gcg29R-Spleißvarianten.....	89
4.4	Detektion der Rezeptorproteine in COS-7-Zellen, die mit Vektoren für Gcg29R-Wildtyp und Gcg29R-Spleißvarianten transfiziert waren.....	93
4.5	Nachweis der Rezeptorproteine mit Hilfe von EGFP (enhanced green fluorescence protein).....	95
4.5.1	Detektion der Gcg29R-, SV1-, SV2- und SV3-EGFP-Fusionsproteine in transient transfizierten COS-7-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	95
4.5.2	Westernblot-Analyse der Gcg29R-, SV1-, SV2- und SV3-EGFP- Fusionsproteine in transient transfizierten COS-7-Zellen.....	98

4.5.3	Detektion der Gcg29R-, SV1-, SV2- und SV3-mEGFP-Fusionsproteine in transient transfizierten COS-7-Zellen.....	99
4.6	Steigerung der cAMP-Produktion durch Bindung von Gcg29 bzw. Gcg37 an Gcg29-Rezeptor und seinen Spleißvarianten.....	102
4.7	Untersuchung des Start-Codons der Gcg29R-mRNA mittels zielgerichteter Mutagenese der verschiedenen ATG-Codons.....	103
4.8	Gewebespezifische und zeitabhängige Modulation des alternativen Spleißens der Gcg29R-mRNA der Ratte.....	108
5.	DISKUSSION.....	110
5.1	Ist der Gcg37-Rezeptor neues Mitglied der Glucagon-Secretin-Rezeptor-Familie?.....	110
5.2	Ist der Gcg37-Rezeptor eine Isoform des Gcg29-Rezeptors?.....	111
5.3	Alternative Spleißvarianten des Gcg29-Rezeptors der Ratte.....	114
5.4	Vergleich des Gcg29-Rezeptors gegenüber seinen Spleißvarianten.....	116
5.4.1	Expression der SV1, die keine Leserahmen-Verschiebung zeigt.....	116
5.4.2	Expression der SV2 und SV3, die eine Leserahmen-Verschiebung zeigen, durch alternative Benutzung eines anderen ATG's als Start-Codon	118
5.5	Start-Codon der Gcg29R-mRNA zur Translation des Gcg29-Rezeptorproteins und die regulatorische Funktion des im 5'-UTR liegenden ATG-Codons.....	120
5.6	Potentielle physiologische Bedeutung der Gcg29R-Spleißvarianten.....	122
5.5	Andere strukturelle Möglichkeiten des mutmaßlichen Gcg37-Rezeptors.....	123
5.7	Schlussfolgerung.....	124
6.	LITERNATURVERZEICHNIS.....	125