

Christine Ploschenz

Identifikation von Promotorelementen, die zu einer CAR-abhängigen Induktion von INDY führen

Nachweis der funktionellen Relevanz der INDY-Induktion

Bachelorarbeit

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Copyright © 2011 Diplom.de
ISBN: 9783961164073

Christine Ploschenz

**Identifikation von Promotorelementen, die zu einer
CAR-abhängigen Induktion von INDY führen**

Nachweis der funktionellen Relevanz der INDY-Induktion

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<hr/>	
Inhaltsverzeichnis	
A Abkürzungsverzeichnis	
B Verzeichnis der Abbildungen	
C Zusammenfassung	
<hr/>	
I. Einleitung.....	1-4
<hr/>	
I.1 Molekulare Mechanismen kalorischer Restriktion und Langlebigkeit	1
I.2 Das Indy-Gen und seine Funktion im Zustand kalorischer Restriktion	2
I.2.1 Struktur und Funktion des Indy-Genprodukts	2
I.2.2 Zusammenhang zwischen Indy-Expression und Lebenserwartung	2
I.3 Die Rolle von CAR und PPARα im Energiemetabolismus	3
I.4 Ziel der Arbeit	4
<hr/>	
II. Material und Methoden.....	5-32
<hr/>	
ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	
<hr/>	
II.1 Isolierung und Reinigung von Hepatozyten nach Meredith	5
II.2 Hepatozytenkultivierung	5
II.2.1 Puffer und Lösungen	5
II.2.2 Durchführung der Hepatozytenkultivierung	8
II.3 Transfektion von primären Rattenhepatozyten	9
II.3.1 Puffer und Lösungen	9
II.3.2 Prinzip	9
II.3.3 Transfektionscocktail	10
II.3.4 Durchführung der Transfektion primärer Hepatozyten	10
II.4 Stimulation von primären Rattenhepatozyten mit Phenobarbital und WY14643	11
II.4.1 Puffer und Lösungen	11
II.4.2 Stimulation primärer Hepatozyten	12

MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

II.5	Isolierung von Gesamt-RNA	13
II.5.1	Puffer und Lösungen	13
II.5.2	RNA-Isolierung	14
II.6	Synthese von cDNA-mRNA-Hybriden	15
II.6.1	Puffer und Lösungen	15
II.6.2	Synthese von cDNA	16
II.7	Real-Time-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)	16
II.7.1	Puffer und Lösungen	16
II.7.2	Grundprinzip der RT-qPCR	16
II.7.3	Durchführung der RT-qPCR	18
II.8	Agarosegel-Elektrophorese	20
II.8.1	Puffer und Lösungen	20
II.8.2	Auftrennung der DNA im Agarosegel	21
II.8.3	Isolierung von DNA aus Agarosegel	21
II.9	Umklonierung der rIndy-Promotorfragmente aus pGL3-basic in den Vektor pGL4.83	22
II.9.1	Prinzip	22
II.9.2	Puffer und Lösungen	22
II.9.3	Ligation der rIndy-Promotorfragmente mit pGL4.83	23
II.10	Transformation der pGL4.83 - rIndyprom- Plasmide in E.coli XL-1 Zellen durch Elektroporation	24
II.10.1	Puffer und Lösungen	24
II.10.2	Transformation kompetenter E.coli XL-1 Zellen durch Elektroporation	25
II.11	Analyse rekombinanter Bakterienkolonien durch Plasmidpräparation im Mini-Maßstab	26
II.11.1	Puffer und Lösungen	26
II.11.2	Reinigung von Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatographie im Mini-Maßstab	26
II.12	Charakterisierung von Plasmid-DNA durch Restriktionsspaltung	27

BIOCHEMISCHE METHODEN		
II.13	Messung der Luciferase-Reportergenaktivität	28
II.13.1	Puffer und Lösungen	28
II.13.2	Grundprinzip des Luciferase Assay	29
II.13.3	Durchführung des Luciferase-Assays	30
II.13.4	Proteinbestimmung nach Bradford	30
II.14	Messung des Citrattransports in primäre Hepatozyten der Ratte	31
II.14.1	Puffer und Lösungen	31
II.14.2	Durchführung der Citrattransportstudie	32
III.	Ergebnisse.....	33-48
III.1	Regulation der Indy und Cyp2B1 mRNA in Rattenhepatozyten durch PB und WY14643	33
III.1.1	Induktion der Cyp2B1 mRNA	33
III.1.2	Induktion der Indy mRNA	34
III.2	Regulation der Cyp2B10 und Indy mRNA in mHC durch PB und WY14643	35
III.2.1	Induktion der Cyp2B10 bei C57B/6 Mäusen	35
III.2.2	Induktion der Indy mRNA bei C57B/6 Mäusen	36
III.2.3	Induktion der Cyp2B10 und Indy mRNA in 129SV Mäusen	37
III.3	Regulation der Aktivität von Indy- und Cyp2B1-Reportergenkonstrukten durch PB und WY14643 in Rattenhepatozyten	39
III.3.1	Aktivierung des Cyp2B1-Promotors und der Indy-Promotorfragmente	39
III.4	Umklonierung der rIndy-Promotorfragmente in Renilla-Luciferasevektor	44
III.5	Regulation der Aktivität von Indy Reportergenkonstrukten durch PB und WY14643 mit Renilla-Luciferase als Reportergen	46
III.6	Modulation der Firefly-Luciferase mRNA in Rattenhepatozyten durch PB und WY1463	47
III.7	Regulation des ¹⁴C-Citrattransports in Rattenhepatozyten durch PB und WY14643	48

IV.	Diskussion.....	49-53
IV.1	Einfluss von PB und WY 14643 auf die Cyp2B- und Indy-Expression in Ratten- und Maushepatozyten	49
IV.1.1	Wirkung von PB und WY 14643 auf die Cyp2B1-Expression in Rattenhepatozyten	49
IV.1.2	Wirkung von PB und WY 14643 auf die Indy-Expression in Rattenhepatozyten	50
IV.1.3	Einfluss von PB und WY 14643 auf den Citrattransport	50
IV.1.4	Vergleich der Indy- und Cyp2B-Regulation in Maus – und Rattenhepatozyten	51
IV.2	Mögliche physiologische Relevanz einer Regulation von Indy durch die Transkriptionsfaktoren CAR und PPAR α	51
IV.3	Luciferase als Reportergen bei der Untersuchung PB-abhängigen Aktivierung von Promotoren	52
IV.4	Schlussfolgerung	53
V.	Literaturverzeichnis.....	54-56
D	Anhang	57-62
E	Danksagung	
