

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. Markus Tiedge



# **Untersuchungen zur Expression von Erythropoetinrezeptoren in Zellen außerhalb des hämatopoetischen Systems und deren funktioneller Relevanz**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Medizin“

der medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Simon Bogdanow

aus Schleiz/Thüringen

Rostock 2010

Gutachter:

1. Priv. Doz. Dr. rer. nat. Thomas Bittorf (Universität Rostock, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie)
2. Prof. Dr. med. habil. Robert Jaster (Universität Rostock, Zentrum für Innere Medizin, Abt. Gastroenterologie)
3. Univ.-Prof. Dr. med. Hanno Riess (Charité Berlin, Medizinische Klinik)

Datum der Disputation 08.03.2011

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>2. Stand der Forschung</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>2.1. Struktur und Funktion von Erythropoetin (EPO) und EPO-Rezeptor (EPOR)</b> .....            | <b>8</b>  |
| 2.1.1. EPO .....   | 8         |
| 2.1.2. EPOR .....  | 8         |
| 2.1.3. Signaltransduktion .....  | 9         |
| 2.2. EPOR-Expression in neuronalen und anderen Geweben .....                                       | 12        |
| 2.3. EPO-Funktionen außerhalb des blutbildenden Systems .....                                      | 13        |
| 2.3.1. Nervensystem .....  | 13        |
| 2.3.2. Kardiovaskuläres System .....   | 15        |
| 2.3.3. Immunsystem/Entzündung .....  | 16        |
| 2.3.4. Niere .....   | 17        |
| 2.4. Spleißvarianten des EPOR .....  | 17        |
| 2.5. Klinische Bedeutung der neuronalen cytoprotektiven Effekte des EPO/EPOR Systems .....         | 18        |
| <b>3. Zielsetzung</b> .....  | <b>20</b> |
| <b>4. Material und Methoden</b> .....  | <b>21</b> |
| 4.1. Zelllinien und Versuchstiere .....  | 21        |
| 4.1.1. Neuronale Zelllinien .....  | 21        |
| 4.1.1.1. ST14A-Zellen .....  | 21        |
| 4.1.1.2. ReNcell VM und CX-Zellen .....  | 21        |
| 4.1.2. Hämatopoetische Zellen .....  | 22        |
| 4.1.2.1. Ba/F3 .....   | 22        |
| 4.1.2.2. J2E .....   | 22        |
| 4.1.3. Primäre Zellen .....  | 22        |
| 4.1.3.1. Primäre Rattenzellen .....  | 22        |
| 4.1.3.2. Primäre Mauszellen .....  | 23        |
| 4.2. Zellkultur/Gewebebegewinnung .....  | 23        |
| 4.2.1. Zellkultur .....  | 23        |
| 4.2.1.1. ST14A .....   | 23        |
| 4.2.1.2. Ba/F3 und J2E .....   | 23        |
| 4.2.2. Zellgewinnung (adhärente Zellen) .....  | 24        |
| 4.2.3. Zellzählung .....   | 24        |
| 4.2.4. Einfrieren von Zellen .....   | 24        |
| 4.2.5. Gewebebegewinnung .....   | 24        |
| 4.3. Nukleinsäure-Isolation/Modifikation/Klonierung .....  | 24        |
| 4.3.1. RNA Isolation .....   | 24        |
| 4.3.2. cDNA Synthese .....   | 25        |
| 4.3.3. Primerkonzeption .....  | 25        |
| 4.3.4. PCR Varianten .....   | 26        |
| 4.3.5. Agarosegelelektrophorese .....  | 28        |
| 4.3.6. Gelelution .....  | 28        |
| 4.3.7. Ligation der DNA Fragmente in Klonierungsvektoren und Transformation in Bakterien .....     | 29        |
| 4.3.8. DNA Ligation in eukaryonte Expressionsvektoren und stabile Expression in Ba/F3 Zellen ..... | 31        |
| 4.3.9. Gewinnung von Plasmid DNA aus den Bakterienklonen .....                                     | 32        |
| 4.3.9.1. DNA Mini-Präparation .....  | 32        |

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| 4.3.9.2. DNA Maxi-Präparation .....  | 33 |
| 4.3.10. Restriktionsspaltung von DNA-Molekülen .....   | 33 |
| 4.3.11. DNA-Sequenzanalyse .....   | 33 |
| 4.4. Proteinchemische Verfahren .....  | 34 |
| 4.4.1 Proteinnachweis mittels Immunoblotting .....   | 34 |
| 4.4.1.1. Herstellung von Gesamtproteinextrakten .....  | 34 |
| 4.4.1.2. SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....                                   | 35 |
| 4.4.1.3. Blotting .....  | 36 |
| 4.4.1.4. Immunreaktionen .....   | 36 |
| 4.4.1.4.1. Primäre Antikörper .....  | 37 |
| 4.4.1.5. Detektion mittels „enhanced chemiluminescence“ (ECL) .....                            | 37 |
| 4.4.2. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....                                       | 38 |
| 4.4.2.1. Stimulation der Zellen und Gewinnung von Kernextrakten .....                          | 38 |
| 4.4.2.2. Präparation und Bindung der DNA Sonde .....   | 39 |
| 4.5. RNase Protection Assay (RPA) .....  | 40 |
| 4.5.1. Gewinnung einer DNA-Sequenz zur Klonierung in den<br>Transkriptionsvektor .....         | 40 |
| 4.5.2. Klonierung einer DNA Sequenz in den Transkriptionsvektor pSPT19 .....                   | 41 |
| 4.5.3. <i>In vitro</i> -Transkription zur Herstellung einer markierten RNA Probe .....         | 41 |
| 4.5.4. Hybridisierung .....  | 41 |
| 4.5.5. RNase Behandlung der RNA-RNA Hybride .....  | 42 |
| 4.5.6. Polyacrylamidgelelektrophorese .....  | 42 |
| 4.6. BrdU Proliferationsassay .....  | 43 |
| 4.7. Statistische Auswertung .....   | 43 |
| 5. Ergebnisse .....  | 44 |
| 5.1. Analyse der EPOR-Expression in Zellen und Geweben .....                                   | 44 |
| 5.1.1. Identifikation von EPOR-Transkripten durch PCR-Analysen .....                           | 44 |
| 5.1.1.1. Nachweis der intrazellulären Domäne des EPOR in ST14A<br>Progenitorzellen .....       | 44 |
| 5.1.1.1.1. EPOR-Wildtyp (EPOR-WT) in ST14A Zellen .....  | 44 |
| 5.1.1.1.2. Nachweis einer alternativen Spleißvariante .....                                    | 45 |
| 5.1.1.1.3. Suche nach verkürzten mRNA Transkripten .....                                       | 47 |
| 5.1.1.2. Identifikation der intrazellulären Domäne des EPOR in primären<br>Rattengeweben ..... | 49 |
| 5.1.1.2.1. Nachweis des EPOR-WT in diversen Geweben .....                                      | 49 |
| 5.1.1.2.2. Nachweis alternativer Transkripte in Primärzellen .....                             | 49 |
| 5.1.1.2.3. Vergleich der Expression des EPOR <i>in vivo</i> bei Normoxie und<br>Hypoxie .....  | 50 |
| 5.1.1.3. Nachweis von EPOR-Transkripten in murinen und humanen Zellen .....                    | 51 |
| 5.1.2. Identifikation von EPOR-Transkripten mittels RPA .....                                  | 52 |
| 5.1.2.1. Prinzip der Durchführung des RPA zur Quantifizierung von<br>EPOR-Transkripten .....   | 53 |
| 5.1.2.2. Nachweis des EPOR-WT und Bestätigung der alternativen<br>Spleißvariante .....         | 54 |
| 5.1.2.3. Vergleich der Expression des EPOR <i>in vivo</i> bei Normoxie und<br>Hypoxie .....    | 56 |
| 5.1.3. Sequenzanalyse der PCR-Produkte .....   | 58 |
| 5.1.3.1. Alternativ gespleißtes Intron 7 im Speziesvergleich .....                             | 59 |
| 5.1.3.2. Alternativ gespleißtes Intron 5 .....   | 60 |
| 5.1.4. Nachweis des EPOR-Proteins .....  | 61 |

## Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>5.2. Untersuchung der Signalübertragung des EPOR in ST14A Zellen .....</b>  | <b>62</b>  |
| <b>5.3. EPO-Hybridrezeptor.....</b>  | <b>62</b>  |
| <b>5.3.1. Synthese des Hybridrezeptorgens.....</b>   | <b>62</b>  |
| <b>5.3.2. Überexpression des Hybridrezeptors in Ba/F3 Zellen .....</b>   | <b>64</b>  |
| <b>5.3.3. Nachweis verschiedener EPOR-Subtypen nach stabiler Expression in Ba/F3-Zellen mittels RT-PCR .....</b>         | <b>64</b>  |
| <b>5.3.4. Nachweis verschiedener EPOR-Subtypen nach stabiler Expression in Ba/F3-Zellen mittels Immunoblotting .....</b> | <b>65</b>  |
| <b>5.3.5. Funktionelle Untersuchung der Rezeptorvarianten in Ba/F3 Zellen .....</b>                                      | <b>66</b>  |
| <b>5.3.5.1. Regulation EPOR-abhängiger cytosolischer Signalkaskaden.....</b>   | <b>66</b>  |
| <b>5.3.5.2. EPOR-vermittelte Proliferation.....</b>  | <b>68</b>  |
| <b>6. Diskussion .....</b>   | <b>72</b>  |
| <b>6.1. Expression des EPOR in neuronalen Progenitorzellen.....</b>  | <b>72</b>  |
| <b>6.2. Identifizierung alternativer EPOR in Rattenzellen .....</b>  | <b>73</b>  |
| <b>6.3. Einfluß von Hypoxie auf die Expression von EPOR-Varianten in Rattengeweben.....</b>                              | <b>75</b>  |
| <b>6.4. Strukturelle Unterschiede alternativer Spleißprodukte .....</b>  | <b>76</b>  |
| <b>6.5. Vergleichende funktionelle Analyse der EPOR-Isoformen.....</b>   | <b>77</b>  |
| <b>6.6. Potentielle medizinische Bedeutung alternativer EPOR .....</b>   | <b>79</b>  |
| <b>7. Zusammenfassung.....</b>   | <b>81</b>  |
| <b>8. Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>83</b>  |
| <b>9. Abkürzungsverzeichnis.....</b>   | <b>96</b>  |
| <b>10. Thesen.....</b>   | <b>100</b> |
| <b>Selbständigkeitserklärung .....</b>   | <b>101</b> |

## 1. Einleitung

---

### **1. Einleitung**

Seit der Isolierung und Aufreinigung von Erythropoetin im Jahre 1977 wurde seine zentrale Rolle bei der Bildung und Differenzierung von Erythrozyten durch umfangreiche Untersuchungen etabliert. Die Klonierung des EPO-Genes und die Produktion von rekombinantem humanem EPO führten zum flächendeckenden Einsatz von EPO in der Behandlung von Anämien sowie als Dopingmittel im Rahmen des Leistungssports. In den letzten Jahren wurde klar, dass die Wirkung von EPO nicht auf das hämatopoetische System beschränkt ist. Der Erythropoetinrezeptor konnte in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden. Dabei wurden sowohl protektive als auch mitogene Effekte auf diese Gewebe experimentell gezeigt. Um die funktionellen Effekte zu verstehen, wurde die durch EPO ausgelöste intrazelluläre Signaltransduktion analysiert. Im Mittelpunkt standen dabei vor allem die Untersuchung des EPOR, seiner funktionellen Domänen, seiner Strukturvarianten und seiner Interaktion mit anderen Rezeptoren bzw. cytosolischen Signalproteinen (Arcasoy M.O., 2008)

Klinische Relevanz haben diese Erkenntnisse unter anderem in der Onkologie. Die Existenz des EPOR auf Tumorzellen ist vor allem deshalb von medizinischem Interesse, da Tumorpatienten häufig mit rekombinantem EPO behandelt werden und diese Therapie EPO-vermittelt zu Tumorpheriferation und vermehrter Angiogenese führen könnte. Andererseits könnte dieser Rezeptornachweis zu Etablierung von zielgerichteten Krebstherapien, den sog. „targeted therapies“ beitragen. Solche modernen Behandlungsstrategien sind für Patienten wesentlich besser verträglich und könnten in Kombination mit etablierten Therapien zu einer effizienteren Bekämpfung von Tumoren beitragen.

In eine andere Richtung gehen Forschungen, die einen protektiven und antiapoptischen Effekt des EPO auf ischämische Gewebe außerhalb des hämatopoetischen Systems zeigen. Da in den Industrienationen kardiovaskuläre ischämische Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen zählen ist die Entwicklung von wirksamen cytoprotektiven Therapieformen für ischämiegefährdete Gewebe von hohem medizinischem und gesellschaftlichem Interesse. Besonders vielversprechend sind die Ergebnisse bei Untersuchungen an hypoxischen Geweben. Aber auch chronisch entzündliche, degenerative und traumatische Veränderungen scheinen durch EPO positiv beeinflussbar zu sein. Es wurden direkte schützende Effekte und indirekte Einflüsse auf Angiogenese und Entzündungsreaktionen beschrieben. Weiterhin sollen immunmodulatorische Wirkungen durch EPO vermittelt sein (Brines M., 2010).

Somit zeichnet sich ab, dass EPO in der Onkologie, Angiologie und Geriatrie zukünftig eine wachsende klinische Bedeutung zukommt. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten

## **1. Einleitung**

---

Experimente an tierischen und humanen Zellen soll ein Beitrag zum Verständnis der EPO-Wirkungen in neuronalen Zellen geleistet werden.

## **2. Stand der Forschung**

---

### **2. Stand der Forschung**

#### **2.1. Struktur und Funktion von Erythropoetin (EPO) und EPO-Rezeptor (EPOR)**

##### **2.1.1. EPO**

EPO ist ein 34-kDa großes Glykoprotein (Davis J.M. et al. 1987), das bei Säugern in peritubulären Zellen der Niere produziert wird (Bachmann S. et al. 1993) und essentiell für die Proliferation und Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen in reife Erythrozyten ist (Gregory C.J. et al. 1977). Der physiologische Reiz für die Produktion von EPO ist ein abfallender Sauerstoffpartialdruck im Gewebe, eine Hypoxie (Jelkmann W. et al. 1992), dem eine Gegenregulation mit vermehrter Produktion von Sauerstoffträgern folgt. Durch den Sauerstoffmangel wird der Transkriptionsfaktor HIF (Rosenberger C. et al. 2002) aktiviert. Er ruft eine verstärkte Ablesung des EPO-Gens hervor (Wang G. et al. 1993) und bewirkt damit einen Anstieg der EPO mRNA Transkripte in den interstitiellen Zellen der Niere. Beim Menschen kodiert die EPO mRNA ein Protein von 193 AS Länge. Nach posttranslationaler Modifikation mit der Abspaltung des 27 AS N-terminalen Signalpeptids und eines C-terminalen Arginin resultiert ein 165 AS langes Polypeptid (Imai N. et al. 1990). Das EPO-Molekül enthält zwei stabilisierende Disulfidbrücken, deren Spaltung zu einem Verlust der Bioaktivität führt (Sasaki H. et al. 1987). Zusätzlich besitzt das EPO-Molekül drei Glykosylierungsstellen an den Stickstoffatomen der AS 24, 38, und 83 und eine Glykosylierung an Threonin 126 (Rush R.S. et al. 1995). Die drei erstgenannten Glykosylierungen sind wichtig für die Stabilität des Moleküls, deglykosyliertes EPO ist zwar biologisch aktiv, besitzt aber eine extrem kurze Halbwertszeit (Macdougall L. et al. 2003). Das rekombinante humane EPO (rHuEPO), welches klinisch z.B. zur Therapie von Tumoranämien oder renalen Anämien eingesetzt wird ist nicht vollständig identisch mit der hier beschriebenen endogenen Form (Skibeli V. et al. 2001). Hyperglykosylierte EPO-Analoga wie Darbepoetin alfa (Amgen® USA) haben durch ihre strukturellen Veränderungen eine verminderte Rezeptoraffinität, die daraus folgende verminderte Bindung und Internalisierung dieser Moleküle erklärt ihre bis zu 4-fach erhöhte Halbwertszeit (Jelkmann W. et al. 2002).

##### **2.1.2. EPOR**

Der EPOR, ein 483 AS großes Glykoprotein, gehört zum Typ1 der Cytokinrezeptorsuperfamilie (D'Andrea A.D. et al. 1990). Diese Gruppe von Rezeptoren ist durch mehrere strukturelle Besonderheiten charakterisiert. Sie besitzen eine extrazelluläre ligandbindende Domäne mit zwei konservierten Cysteinresten und dem konservierten AS-



## 2. Stand der Forschung

---

Motiv WSXWS, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne, die im Gegensatz zu anderen Rezeptortypen keine eigene katalytische Aktivität besitzt (Youssofian H. et al. 1993). Zu dieser Gruppe gehören darüber hinaus Rezeptoren für die Liganden IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, GM-CSF, G-CSF, Prolaktin, CNTF, LIF. Der physiologische Reiz für eine verstärkte Expression des EPOR ist wie bei EPO der Sauerstoffmangel (Bernaudin M. et al. 1999), wobei HIF dabei keine Rolle zu spielen scheint. Der molekulare Mechanismus dieses Vorgangs ist noch unbekannt (Acs G. et al. 2002), möglicherweise spielen proinflammatorische Cytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 (Beleslin-Cokic B.B. et al. 2004) oder EPO selbst eine Rolle (Chin K. et al. 2000).

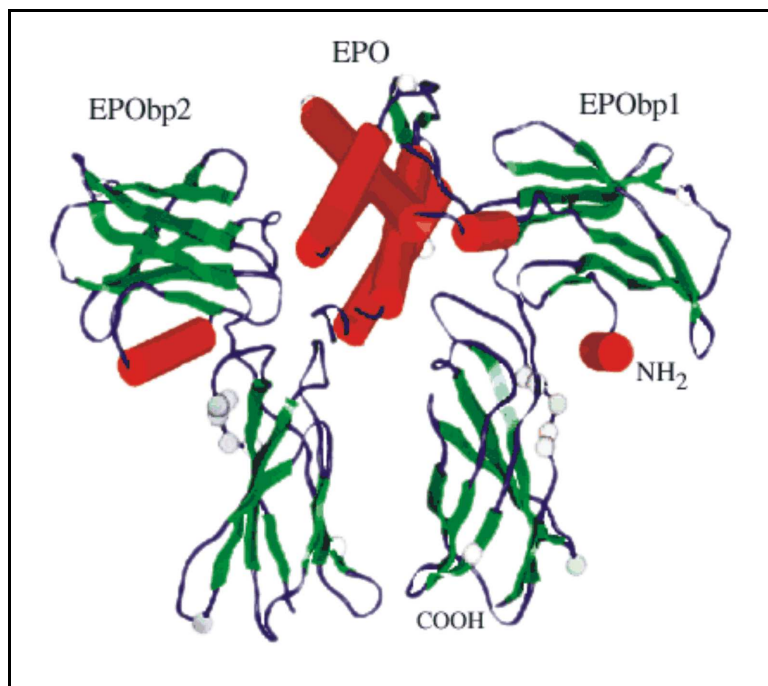


Abbildung 1: Kristallstruktur des Komplexes EPO/EPOR (Syed R.S. et al. 1998)

EPObp1/2 Erythropoetin bindendes Protein  $\triangleq$  EPOR

### 2.1.3. Signaltransduktion

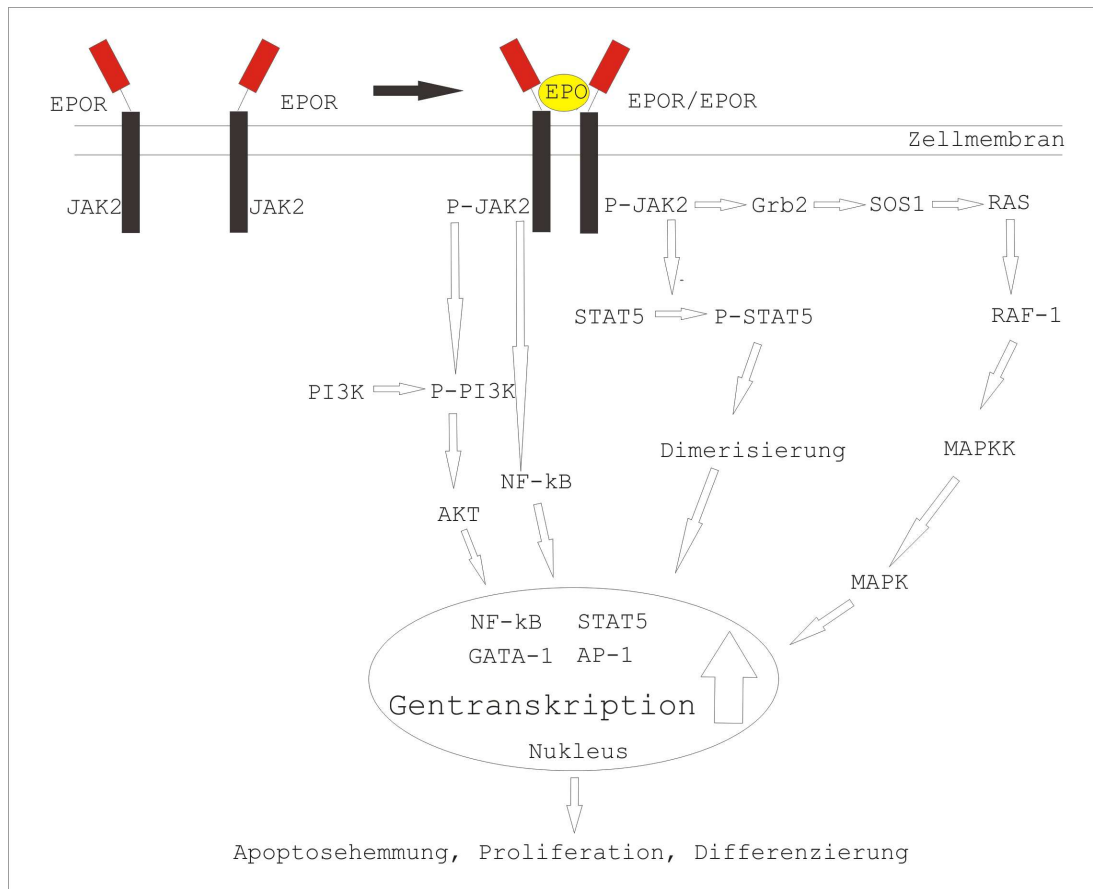
Nach der Bindung von EPO (Abbildung 1) kommt es zu einer Konformationsänderung präformierter Homodimere des EPOR (Livnah O. et al. 1999). Dadurch werden JAK2 Moleküle (Januskinasen), welche mit der intrazellulären Domäne der Rezeptoren assoziiert sind, in räumliche Nähe gebracht und gegenseitige Transphosphorylierungen und eine damit verbundenen Aktivierung ausgelöst (Witthuhn B.A. et al. 1993). Diese aktivierten Januskinasen phosphorylieren verschiedene intrazelluläre Proteine, primär den EPOR selbst.

## **2. Stand der Forschung**

---

Die phosphorylierten Tyrosinreste des EPOR fungieren als Bindungsstellen für Proteine mit SH2 Domänen (Tauchi T. et al. 1995), wie STAT5 (Barber D.L. et al. 2001), Phospholipase C- $\gamma$ 1 (Ren H.Y. et al. 1994), Grb2 (Barber D.L. et al. 1997) und Phosphoinositol-3-Kinase (Damen J.E. et al. 1995). Diese Proteine sind für die Signaltransduktion und die damit verbundenen physiologischen Effekte der Rezeptoraktivierung wie Induktion der Mitogenese, Zelldifferenzierung und Apoptoserepression verantwortlich (Lin Y. et al. 1995). U.a. werden in diesem Zusammenhang die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- $\kappa$ B und GATA-1 aktiviert. Der transiente Charakter der Signale wird durch negativ regulatorische Proteine, die ebenfalls vom phosphorylierten EPOR rekrutiert werden, realisiert. Es handelt sich dabei um die Tyrosinphosphatasen SHP1 (Klingmüller U. et al. 1995) und SHP2 (Pei D. et al. 1996), sowie um die STAT-Inhibitoren SOCS3 (Hansen J.A. et al. 1999) und CIS 1 (Quelle F.W. et al. 1996). Abbildung 2 stellt die wichtigsten Signalwege des EPO/EPOR Systems in hämatopoetischen Zellen dar. Der am besten aufgeklärte Signalweg des EPOR ist der sog. JAK/STAT- Signalweg. Dabei erfolgt nach STAT5 Phosphorylierung am Rezeptorkomplex eine Dimerisierung dieses Proteins mit anschließender Translokation in den Nukleus der Zelle, wo eine Bindung an spezifische genomische Erkennungssequenzen erfolgt und damit die Aktivierung der Transkription bestimmter Gene eingeleitet wird (Gouilleux F. et al. 1995). Durch Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase wird der Signaltransduktionsweg über die Proteine AKT und p70S6 Kinase aktiviert, denen eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellüberlebens und Progression des Zellzyklus zukommt. Die für die Spezifität der intrazellulären Signaltransduktion maßgeblichen Strukturen sind demzufolge die phosphorylierbaren Tyrosinreste an den Positionen 343, 401, 429, 431, 443, 460, 464, 479 und eine als Box1 bezeichnete membranproximale Region, die der JAK2-Bindungsstelle entspricht (Wojchowski D.M. et al. 1999).

## 2. Stand der Forschung



**Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der wichtigsten Signaltransduktionswege des EPO/EPOR Systems in hämatopoetischen Zellen (Erläuterungen im Text)**

Einigen Tyrosinresten konnte in Versuchen mit Punktmutationen eine Funktion in der komplexen Signalweitergabe des EPOR zugeordnet werden. So zeichnen die Positionen 343 und 401 für die Aktivierung von STAT5 verantwortlich, 429 führt zur Bindung von SHP1 und 479 rekrutiert die Phosphoinositol-3-Kinase (Barbone F.P. et al. 1999). Die Aminosäure an Position 464 bindet nach Aktivierung das Signalprotein Grb2, welches über weitere Proteine die Aktivierung der MAP-Kinase initiiert. Die hohe klinische Relevanz von Strukturveränderungen am Rezeptor veranschaulicht die Tatsache, dass z.B. bei einer mutationsbedingten Verkürzung des Rezeptors die Phosphatase SHP1 nicht rekrutiert wird, daraufhin keine Dephosphorylierung von JAK2 (Inaktivierung) erfolgen kann und eine EPO Hypersensibilität resultiert (Furukawa T. et al. 1997). Die Stimulation der erythroiden Vorläuferzellen erfolgt dann ungebremst und bei den Patienten entsteht das Bild einer Erythrozytose (de la Chapelle A. et al. 1993). Einer der physiologischen Effekte von EPO beruht auf einer Steigerung der Transkription des Bcl-x1- Gens (Silva M. et al. 1999), einem Gen der Bcl-2 Familie, welches antiapoptotische Effekte, z.B. durch Hemmung von

## **2. Stand der Forschung**

---

proapoptotischen Caspasen, auslöst. Bcl-xl knockout Mäuse erleiden, dieser Funktion von Bcl-xl entsprechend, bereits während der Embryogenese hämatopoetische Defekte und eine schwere Anämie (Wagner K.U. et al. 2000). In Verbindung mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass STAT5 die Induktion von Bcl-xl (Silva M. et al. 1999) steuert, da nach Ausschaltung der STAT5 Funktion die Apoptoserate in Knockout-Mäusen deutlich anstieg (Socolovsky M. et al. 1999). Eine indirekte Schutzwirkung beruht auf einer Verstärkung der Gewebe-Sauerstoffversorgung durch eine Reduktion der Apoptose von Endothelzellen (Chong Z.Z. et al. 2002) und durch die Stimulation der Angiogenese (Crivellato E. et al. 2004).

### **2.2. EPOR-Expression in neuronalen und anderen Geweben**

Zuerst wurde der EPOR auf erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark, den CFU-E beschrieben. Diese Zellen exprimieren diesen Rezeptor zeitlich begrenzt in einem bestimmten Differenzierungsstadium (Gregory C.J. et al. 1977, Koury M.J. et al. 1992). Dabei bewirkt der aktivierte Rezeptor die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen. Außerhalb des hämatopoetischen Systems wird der EPOR in Endothelzellen (Anagnostou A. et al. 1994), neuronalen Zellen (Masuda S. et al. 1993), Leydig-Zellen (Mioni R. et al. 1992), Myoblasten (Ogilvie M. et al. 2000), Perikard/Endokard (Wu H. et al. 1999), Pankreasinzellen (Fenjves E.S. et al. 2003), Megakaryocyten (Fraser J.K. et al. 1989) und diversen Tumorzellen, wie z.B. beim Nierenzellkarzinom (Westenfelder C. et al. 1999), dem Mammakarzinom (Acs G. et al. 2002), dem Melanom (Selzer E. et al. 2000) oder dem Gliom (Acs G. et al. 2001) exprimiert. Gegenwärtig wird die Frage diskutiert, ob die Expression des EPOR auf Krebszellen einen Überlebensvorteil für diese bedeutet und durch eine möglicherweise vermittelte Resistenz gegen apoptotische Reize bzw. die proliferationsfördernden Stimuli die Krebszellen wesentlich von diesem Rezeptor profitieren (Westenfelder C. et al. 2000, Yasuda Y. et al. 2003). In älteren Arbeiten von Berdel W.E. et al. (1991), Mundt D. et al (1992) und Rosti V. et al. (1993) konnte kein Einfluss von rHuEPO auf EPOR-positive Tumorzellen festgestellt werden. Diese Fragestellungen haben nicht nur Bedeutung in der supportiven Therapie bei Tumorerkrankungen mit rHuEPO, sondern auch als möglicher Ansatzpunkt für eine cytostatische Therapie.

Im Nervensystem ist der EPOR auf Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen nachweisbar, EPO wird dagegen nur von Neuronen und Astrozyten produziert (Nagai A. et al. 2001). In Tiermodellen wurden EPO-Wirkungen auf die Organe/Gewebe Hirn (Wen T.C. et al. 2002), Rückenmark (Celik M. et al. 2002), Retina (Junk A.K. et al. 2002), Niere (Vesey D.A. et al.

## **2. Stand der Forschung**

---

2004), Haut (Buemi M. et al. 2002), Muskulatur (Rotter R. et al. 2008) und Herz (Calvillo L. et al. 2003) experimentell nachgewiesen.

Quantitativ ist die Expression des EPOR in humanen hämatopoetischen und neuronalen Geweben in der Mitte der Embryonalperiode etwa vergleichbar (Liu C. et al. 1997). Zur Geburt sinkt die Rezeptordichte in neuronalen Geweben (z.B. Neuroepithel) ca. um den Faktor 100, um nachfolgend auf diesem Niveau zu persistieren (Liu C. et al. 1997).

### **2.3. EPO-Funktionen außerhalb des blutbildenden Systems**

Einleitend zur Rolle des EPOR in nichterythroiden Zellen soll bemerkt sein, dass trotz intensiver experimenteller Anstrengungen und einer Fülle von publizierten Forschungsergebnissen keineswegs Konsens unter den verschiedenen Forschungsgruppen über die Interpretation dieser Ergebnisse herrscht, sondern im Gegenteil viele Literaturstellen einander widersprechende Daten zeigen und Gegenstand aktueller Diskussionen sind.

Die am besten untersuchte und wahrscheinlich wichtigste Wirkung von EPO außerhalb des Knochenmarks scheint eine cytoprotektive/antiapoptotische Wirkung auf verschiedene Gewebe wie ZNS, Herz, Niere, Muskulatur und Immunsystem zu sein. Cytoprotektive Funktion bedeutet im allgemeinen biologischen Sinne eine erhöhte Resistenz von Zellen gegenüber von außen einwirkenden Stressoren. Solche Stressoren können Sauerstoffmangel, Nährstoffmangel, physikalische Reize oder auch Einwirkungen von Fremdstoffen sein. Dieser Zellschutz kann durch EPO auf eine direkte (z.B. Veränderung des Zellstoffwechsels), aber auch auf eine indirekt supportive Weise (z.B. Angiogenesestimulation) erfolgen.

#### **2.3.1. Nervensystem**

In neuronalen Zellen konnten EPOR-vermittelte cytoprotektive Effekte nach Einwirkung von Hypoxie (Sinor A.D. et al. 2000), Serumentzug (Koshimura K. et al. 1999), Kainat (Siren A.L. et al. 2001), NMDA (Digicaylioglu M. und Lipton S.A. 2001), Glutamat (Morishita E. et al. 1997), Glukoseentzug (Ruscher K. et al. 2002) und NO (Sakanaka M. et al. 1998) nachgewiesen werden. Der EPOR wurde in Abhängigkeit von den genannten Faktoren (unspezifisch) nach 12h verstärkt exprimiert, nach einigen Stunden gefolgt von einer ebenfalls vermehrten Produktion von EPO (Bernaudin M. et al. 1999). Die molekularen Mechanismen der schützenden EPO/EPOR Wirkung in neuronalen Geweben zeigen deutliche Parallelen zu erythroiden Zellen, aber auch wesentliche Unterschiede, die hier kurz diskutiert werden sollen.

## 2. Stand der Forschung

---

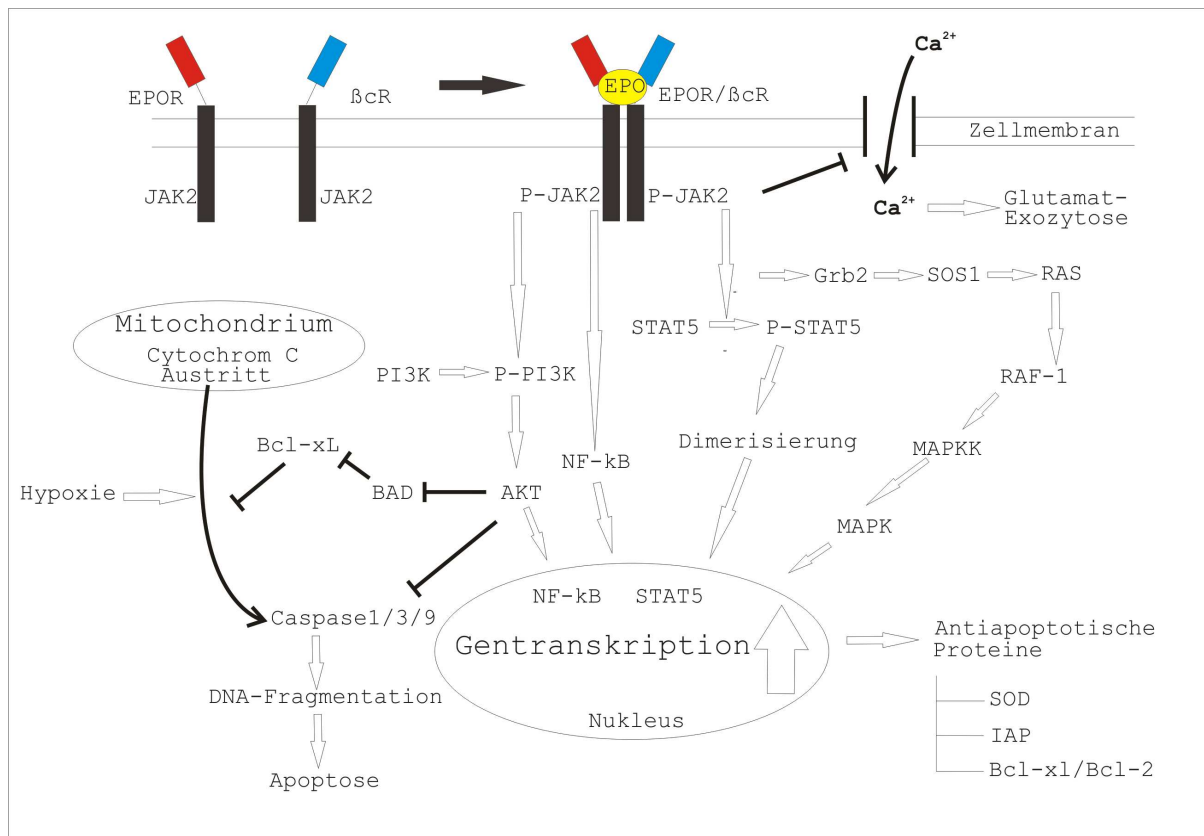
Der Einfluss des EPOR auf die Hirnentwicklung wurde bei Experimenten mit EPOR -/- Knock-out Mäusen (Yu X. et al. 2002) untersucht. Embryonen waren hierbei durch eine abnormale Hirnentwicklung, eine reduzierte Zahl an Vorläuferzellen und eine verminderte Dichte von Neuronen in Verbindung mit einer massiven neuronalen Apoptose charakterisiert. Suzuki N. et al. (2002) zeigten im Gegensatz dazu, dass Mäuse, die den EPOR ausschließlich in erythroiden Zellen exprimierten, sich normal und gesund entwickelten und keinerlei neurologische Defizite aufwiesen. Dieser Unterschied lässt vermuten, dass das herkömmliche EPO/EPOR System in der neuronalen Entwicklung verzichtbar ist. Ob EPO-Wirkungen über andere, alternative Rezeptoren vermittelt werden, bleibt offen.

Die in erythroiden Vorläuferzellen umfangreich charakterisierten Signalwege über JAK2/STAT5/Bcl-xl, PI3K/AKT/Bcl-xl und JAK2/NF- $\kappa$ B werden in neuronalen Zellen ebenfalls durch EPO aktiviert (Digicaylioglu M. and Lipton S.A. 2001, Chong Z.Z. et al. 2003, Ruscher K. et al. 2002, Wen T.C. et al. 2002). Kilic E. et al. (2004) zeigten, dass darüber hinaus auch ERK-1 und ERK-2 bei der neuronalen Cytoprotektion involviert sind. Zusätzlich scheint in Nervenzellen ein direkter Einfluss auf Ca<sup>2+</sup> Kanäle zu bestehen. Deren Hemmung trägt damit zu einer verminderten Glutamat-Freisetzung bei, wodurch die Folgen von Nervenschädigungen reduziert werden (Kawakami M. et al. 2000). Eine weitere neuronale Besonderheit scheint die EPO vermittelte Steigerung der Expression der Glutathion-Peroxidase in Astrozyten mit dementsprechend erhöhter Resistenz gegen oxidativen Stress zu sein (Genc S. et al. 2002). Darüber hinaus wird auch ein Zusammenhang zwischen der Verminderung von proinflammatorischen Gewebereaktionen und dem Schutz von neuronalen Geweben gesehen. So beschreiben Siren A.L. et al. (2001) eine Reduktion von inflammatorischen Cytokinen nach neuronaler Infarzierung, Villa P. et al. (2003) erklären hingegen die verminderte Expression solcher Proteine (z.B. TNF- $\alpha$ ) durch die Apoptosesuppression.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die cytoprotektiven EPO-Effekte, die in hämatopoetischen Zellen durch einen homodimeren Rezeptor ausgelöst werden, möglicherweise in neuronalen Zellen durch einen in Molekulargewicht, Affinität und Proteinassoziation abweichenden Rezeptor vermittelt sind (Fischer J.W. et al. 2003). Es wurde gezeigt, dass modifizierte EPO Formen wie z.B. carbamyliertes EPO, keinen Einfluss auf die Hämatopoese hatten, aber eine weiterhin cytoprotektive und neuroprotektive Wirkung aufwiesen (Erbayraktar S. et al. 2003, Leist M. et al. 2004). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass möglicherweise ein zumindest partiell veränderter EPOR die neuronalen Wirkungen vermittelt. Brines M. et al. (2004) konnten experimentell nachweisen, dass es in

## 2. Stand der Forschung

neuronalen Zellen EPOR gibt, welche aus einer  $\alpha$ -Untereinheit (klassischer EPOR) und einer  $\beta$ cR (common  $\beta$  subunit) bestehen. Diese  $\beta$ cR ist bereits seit längerem als Dimerisierungspartner nach Aktivierung der spezifischen Cytokinrezeptoren für GM-CSF, IL-3 und IL-5 bekannt (Miyajima A. et al. 1992). Die Autoren vermuten, dass die neuronalen Wirkungen von EPO durch diesen EPOR- $\beta$ cR Heterorezeptor vermittelt werden. Daten anderer Autoren stützen diese These jedoch nicht (Um M. et al. 2006).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der bisher identifizierten durch EPO ausgelösten antiapoptotischen Signalwege in neuronalen Zellen**

Dimerisierung des neuronalen EPOR(EPOR+ $\beta$ cR) nach EPO-Bindung  $\rightarrow$  Autophosphorylierung von JAK2  $\rightarrow$  Hemmung des  $Ca^{2+}$  Influx, Aktivierung von STAT5, Aktivierung von NF- $\kappa$ B, Aktivierung von PI3K, Aktivierung Grb2  $\rightarrow$  Aktivierung von antiapoptotischen Proteinen, Hemmung der Apoptoseeinleitung (Mitochondrien-Membranstabilisierung, Caspase-Hemmung)

### 2.3.2. Kardiovaskuläres System

EPO wird von verschiedenen Endothelzellen exprimiert und wirkt nach neueren Erkenntnissen angiogen und vasoprotektiv. *In vitro* kann es die Migration und Proliferation von Endothelzellen fördern (Jaquet K. et al. 2002). Darüber hinaus wird die Integrität der lokalen Mikrozirkulation durch die Stimulation der Angiogenese *in vivo* verbessert (Crivellato E. et al. 2004, Galeano et al. 2006). Bei Krankheitsbildern mit deregulierter Angiogenese wie

## **2. Stand der Forschung**

---

der diabetischen Retinopathie wurde eine signifikante EPO-Überproduktion nachgewiesen (Watanabe D. et al. 2005). EPO-Blockade hingegen, zeigte bei ischämischer Retinopathie eine deutliche Verminderung der Neovaskularisation. Kardioprotektive EPO-Effekte werden ebenfalls auf die verstärkte Neovaskularisation ischämischer Areale zurückgeführt (Hirata A. et al. 2006, Prunier F. et al. 2007). Ursache dafür könnte die Mobilisation von EPC's (endothelial progenitor cells) aus dem Knochenmark und Ansiedlung in postischämischen Arealen sein (Westenbrink B.D. et al. 2007, Yoder M.C. et al. 2007). Weitere Daten lassen vermuten, dass EPO einen Einfluss auf Migration und Differenzierung von Stammzellen ausübt (Shingo T. et al. 2001, Lee S.M. et al. 2004).

In Versuchen von Nakano M. et al. (2007) wurde an Mäusen, bei denen der EPOR ausschließlich im Knochenmark exprimiert war, nach ischämischer Reizung eine verminderte VEGF-Aktivierung, verminderte EPC Mobilisation und verzögerte postischämische Erholung gezeigt. Belesin-Cokic B.B. et al. (2004) vermuten in der verstärkten Expression der endothelialen NO-Synthase nach EPO-Stimulation, mit darauf folgender Relaxation der durch Hypoxie vasospastischen Gefäße, den Schlüsselmechanismus in der Verminderung der Gewebeschädigung nach Sauerstoffmangel. Allerdings sind wohl auch, wie zuvor beschrieben, direkte Effekte auf Kardiomyozyten und Endothelzellen anzunehmen.

Verschiedene präklinische und klinische Studien konnten Vorteile im Krankheitsverlauf bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und abgelaufenem Herzinfarkt unter EPO-Therapie zeigen (Silverberg D.S. et al. 2003, Manchini D.M. et al. 2003, van der Meer P. et al. 2005).

### **2.3.3. Immunsystem/Entzündung**

Verschiedene Studien konnten einen Einfluss von EPO auf die Immunantwort demonstrieren. Beispielsweise wurde in einem Mausmodell bei iatrogen ausgelöster autoimmunologischer Enzephalomyelitis durch eine EPO-Behandlung die entzündlichen Infiltrate und die Demyelinisierung deutlich vermindert (Agnello D. et al. 2002, Zhang J. et al. 2005). Auch bei einem Myokarditismodell konnte durch EPO-Behandlung das Entzündungsareal reduziert und die myokardiale Funktionalität signifikant beeinflusst werden (Mitsuma W. et al. 2006).

Die beobachteten Effekte werden auf eine reduzierte Apoptoserate und eine verminderte Expression inflammatorischer Cytokine zurückgeführt. Diese Immunmodulation wurde auch von Prutchi-Sgiv S. et al (2006) bei Patienten mit multiplen Myelom beschrieben, bei denen durch EPO-Therapie die CD4/CD8 Ratio und die IL-6-Expression deutlich verändert wurde.



## **2. Stand der Forschung**

---

### **2.3.4. Niere**

Die wahrscheinliche Wirkung von EPO auf die Niere bei einer hohen systemischen Administration ist die Reduktion der Apoptoserate geschädigter Zellen (Spandou et al 2006). In diesem Zusammenhang wurde eine verminderte Caspase-Aktivität und eine Hochregulation von Bcl-2 beobachtet (Yang C.W. et al. 2003). Als Stressoren wurden Cisplatin (Bagnis C. et al. 2001) und Ciclosporin, mit begleitender chronischer Entzündung, (Lee S.H. et al. 2005) untersucht. Interessanterweise zeigte EPO bei durch Bestrahlung induzierter Dysfunktion eine dosisabhängige Verschlechterung der Nierenfunktion, deren Ursache aktuell noch nicht geklärt ist (Andratschke N. et al. 2006).

### **2.4. Spleißvarianten des EPOR**

Die basale EPOR-Expression in adulten neuronalen Geweben ist im Vergleich zu hämatopoetischen Geweben und fetalem Hirn bis zu zwei Potenzen niedriger, die EPOR Transkripte sind größtenteils alternativ- bzw. ineffizient prozessiert (Chin K. et al. 1995). Dies verändert sich nach hypoxischer Reizung von Nervenzellen, der EPOR wird verstärkt exprimiert, die alternativen Spleißvarianten, die nicht zu funktionsfähigen EPOR führen nehmen an Quantität ab, und der normal gespleißte EPOR wird translatiert (Chin K. et al. 2000). Die Folge dieser Veränderungen ist eine erhöhte Sensitivität neuronaler Zellen bei einer Stimulation mit EPO. Chin K. et al. (2000) erklären diese Beobachtungen mit einer vermehrten Aktivierung eines proximal des EPOR gelegenen Promotors, dessen Aktivität durch die Transkriptionsfaktoren GATA1, GATA3 und AP2 reguliert wird. Diese Faktoren sind für eine normale Hirnentwicklung essentiell (Pandolti P.P. et al. 1995, Schorle H. et al. 1996).

Chiba S. et al. (1997) fanden in erythroiden murinen Zellen eine alternative Spleißvariante, bei der Intron 7 in der mRNA verbleibt. Die Autoren konnten nachweisen, dass Mäuse mit Polycythämia vera diese Spleißvariante in deutlich geringerem Ausmaß exprimierten, und schlossen daher auf eine inhibitorische Wirkung dieser EPOR-Variante auf die Proliferation von CFU-E Vorläuferzellen. Shimizu R. et al. (1999) konnten diese inhibitorische Wirkung in ihren Untersuchungen bestätigen, transgene Mäuse mit vermehrter Expression dieses Rezeptors zeigten eine ineffektive Hämatopoese. Als Ursache des alternativen Spleißens wird ein in hämatopoetischen Zellen spezifisches cis-regulatorisches Element vermutet (Chiba S. et al. 1997). Bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom konnte die genannte Spleißform in einigen Fällen in vermehrtem Ausmaß gefunden werden, was die ineffektive Hämatopoese mitbegründen könnte (Shimizu R. et al. 1999). Transgene Mäuse mit Überexpression dieser

## **2. Stand der Forschung**

---

Rezeptorform zeigten ebenfalls eine verminderte Hämatopoese (Yakamura Y. et al. 1998). In Endothelzellen wurde diese Spleißvariante ebenfalls nachgewiesen, jedoch konnte ihr keine biologische Funktion zugeschrieben werden.

Untersuchungen von Arcasoy M.O. et al. (2003) an Krebszelllinien aus Lunge, Kolon, Brust, Prostata und Ovar erbrachten ebenfalls den Nachweis alternativer Spleißformen. So konnte die von Chiba S. et al. (1997) gefundene Form sowie mehrere durch Baseninsertion mit Stopcodon entstandene, unter anderem lösliche, EPOR-Formen gezeigt werden. Für die löslichen EPOR-Formen postulierten die Autoren eine kompetitive Wirkung zum Wildtyp, mit einer verminderten rezeptorvermittelten Signaltransduktion bei verstärkter Expression, einem Mechanismus, der von der Modulation der Wirkung von Wachstumshormonen bekannt ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es verschiedene Hinweise zur Existenz alternativer EPO-Rezeptoren in humanen und murinen Zelllinien gibt. Es handelt sich hauptsächlich um lösliche Isoformen ohne Transmembrandomäne und verkürzte Isoformen mit teilweise bzw. vollständig fehlender intrazellulärer Domäne. Vermutlich sind diese Rezeptorvarianten in der Pathogenese von verschiedenen hämatologischen Erkrankungen beteiligt. Hinsichtlich des Ratten-EPOR gibt es nur wenige Daten, die die Existenz alternativer Rezeptorformen nahe legen (Shams I. et al. 2005, Yamaji R. et al. 1998). Funktionelle Untersuchungen bei Ratten existieren dazu bisher nicht.

### **2.5. Klinische Bedeutung der neuronalen cytoprotektiven Effekte des EPO/EPOR Systems**

Die größten Hoffnungen werden zurzeit bei dem Krankheitsbild des Schlaganfalls (ischämischer Hirninsult) in die Wirkungen von EPO gesetzt. So wurde gezeigt, dass EPO Hirn-, Retina-, und Rückenmarkszellen gegen die durch Ischämie hervorgerufenen Schäden schützt. Tierexperimentelle und klinische Studien lassen erwarten, dass die systemische Administration hoher Dosen EPO innerhalb der ersten acht Stunden nach Ereignis die Infarktgröße und das funktionelle Outcome der Infarktpatienten wesentlich verbessert (Ehrenreich H. et al. 2002, Tsuchiya D. et al. 2001, Sadamoto Y. et al. 1998, Brines M.L. et al. 2000). Entzündliche Erkrankungen des ZNS, z. B. auf der Basis von Autoimmunprozessen werden durch EPO in Tiermodellen signifikant gemildert (Agnello D. et al. 2002, Sattler M.B. et al. 2004), ebenso wie verletzungsbedingte posttraumatische Hirnschädigungen (Gorio A. et al. 2002) und Nervenläsionen infolge einer diabetischen Polyneuropathie (Bianchi R. et al. 2004). Auch bei chronisch degenerativen Veränderungen wie der Parkinsonschen Erkrankung

## **2. Stand der Forschung**

---

(Genc S. et al. 2002), Morbus Alzheimer (Chong Z.Z. et al. 2005) sowie psychischen Erkrankungen wie der Schizophrenie (Ehrenreich H. et al. 2004) existieren Daten, die Anlass zur Hoffnung auf einen klinischen Nutzen des EPO-Einsatzes geben. Bei den letztgenannten Erkrankungen ist die Datenlage hinsichtlich Mechanismen und Übertragbarkeit in therapeutische Konzepte noch weitestgehend unklar.

### **3. Zielsetzung**

---

#### **3. Zielsetzung**

Verschiedene nicht-hämatologische cytoprotektive Wirkungen des EPO/EPOR Systems und ihre vermutete hohe klinische Relevanz machen es notwendig, die bisher nur wenig verstandenen Eigenschaften dieses Systems näher zu untersuchen. Dabei stellt sich die Frage, ob in diesen nicht-hämatopoetischen Geweben nur der EPOR-Wildtyp oder auch andere alternative EPOR vorkommen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, in verschiedenen nicht-hämatopoetischen Zellen (u.a. Nervenzellen) den EPOR nachzuweisen, nach alternativen Rezeptorformen zu suchen und, falls vorhanden, ihre biologische Funktion und Bedeutung zu bestimmen. Aus den Ergebnissen sollen Rückschlüsse auf die Wirkung von EPO außerhalb des hämatopoetischen Systems gezogen werden.

Im Einzelnen stehen dabei folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Ist der EPOR auf mRNA- und Proteinebene in neuronalen Progenitorzellen und anderen nicht-hämatopoetischen Zellen nachweisbar?
2. Gibt es alternative EPOR in diesen Zellen, wie sehen diese aus und in welchem Umfang werden sie bei Hypoxie exprimiert?
3. Welche biologische Funktion ist den alternativen Rezeptoren zuzuschreiben und wie verhalten sie sich im Vergleich zum Wildtyp- Rezeptor?
4. Welche praktische medizinische Bedeutung könnten diese alternativen EPOR besitzen?

## **4. Material und Methoden**

---

### **4. Material und Methoden**

#### **4.1. Zelllinien und Versuchstiere**

##### **4.1.1. Neuronale Zelllinien**

###### **4.1.1.1. ST14A-Zellen**

ST14A ist eine neuronale Stammzelllinie, welche aus Stammhirnen von 14 Tage alten Rattenembryonen gewonnen und durch Immortalisierung striataler Vorläuferzellen generiert wurde. Die Immortalisation erfolgte durch die Transfektion der Zellen mit dem thermosensitiven Onkogen SV40 large T (Cattaneo E. et al. 1998). Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass Zellen ohne Kontamination durch eine Verschmelzung mit Neuroblastomzellen und dadurch auch mit einem normalen Chromosomensatz einen ständigen Teilungsrhythmus durchlaufen. Bei der nonpermissiven Temperatur von 33°C zeigen diese Zellen nun eine hohe Proliferationstendenz, es erfolgt eine kontinuierliche Zellteilung mit einer auf hohem Niveau persistierenden Expression des Neuronenmarkers Nestin. Bei einer nonpermissiven Temperatur von 39°C wird das transfizierte Onkogen deaktiviert und die Zellen gehen in ein Stadium der Differenzierung über, die Nestinexpression sinkt und dafür steigt die Expression des Differenzierungsmarkers MAP2. Das temperaturabhängige Wachstum der ST14A Zellen erlaubt den praktischen Einsatz in Transplantationsversuchen. Dabei werden sie in vitro bei 33°C vermehrt und nach Überführung in vivo erfolgt die Ausbildung eines Netzwerkes von neuronalem Charakter. Nach Transplantation von Progenitorzellen in lebende Rattenhirne ist eine mikroskopische Veränderung zu neuronalen Zellen bereits nachgewiesen (Lundberg C. et al. 1996). Ebenso können ST14A Zellen genutzt werden um neurotrophe Faktoren verstärkt zu exprimieren. So standen neben den nativen ST14A-Zellen auch Zellklone zur Verfügung, die außer den beschriebenen Charakteristika die neurotrophen Faktoren CNTF oder GDNF überexprimieren (Weinelt S. et al. 2003; Böttcher T. et al. 2003).

###### **4.1.1.2. ReNcell VM und CX-Zellen**

Diese beiden humanen Zelllinien wurden von der Firma ReNeuron® (Guildford, UK) etabliert und sind kommerziell erhältlich. Die CX Zellen sind Stammzellen aus dem 14 Tage alten fötalen Cortex, immortalisiert durch retrovirale Transfektion mit dem c-myc Onkogen. Bei den VM Zellen handelt es sich um neuronale Stammzellen aus dem 10 Wochen alten fötalen ventralen Mesencephalon die retroviral mit dem v-myc Onkogen transfiziert wurden (Pollock K. et al. 2006). Über die Expression des EPOR gibt es aktuell keine Daten. Die Zellen für die nachfolgend dargestellten molekularbiologischen Tests wurden in der Klinik für

## **4. Material und Methoden**

---

Neurologie und Psychiatrie der Universität Rostock kultiviert und freundlicherweise für unsere Experimente zur Verfügung gestellt.

### **4.1.2. Hämatopoetische Zellen**

#### **4.1.2.1. Ba/F3**

Die weit verbreiteten Ba/F3-Zellen sind murine IL-3 abhängige Zellen mit pro-B Zell-Charakteristik (Palacios R. et al. 1984). Ba/F3-Zellen stammen aus dem peripheren Blut von BALB/c-Mäusen. Der EPOR ist in dieser Zelllinie nicht nachweisbar.

#### **4.1.2.2. J2E**

Die J2E Zelllinie entstammt murinen fetalen Hepatozyten, die durch die Transformation mit den Onkogenen raf/myc immortalisiert wurden. Als Vektor diente dabei der Retrovirus J2 (Klinken S.P. et al. 1988). Diese Zellen exprimieren ca. 1000 EPO-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, nach EPO-Zugabe kann zunächst gesteigerte Proliferation und dann erythroide Differenzierung beobachtet werden.

### **4.1.3. Primäre Zellen**

Die verwendeten primären Zellen wurden aus Gewebeproben von Versuchstieren gewonnen, die sofort nach der Isolierung zur Präparation von Zelllysaten bzw. RNA verarbeitet wurden.

#### **4.1.3.1. Primäre Rattenzellen**

Für die Probengewinnung standen Gewebeproben aus sämtlichen Organen der Ratte zur Verfügung. Daneben wurden auch Organe Phenylhydrazin-behandelter (sekundäre Anämie) Ratten eingesetzt. Die hämatologischen Parameter kurz vor Tötung der Tiere sind beispielhaft in Tabelle 1 dargestellt.

## **4. Material und Methoden**

---

| Parameter |        | Kontrolle | behandelte Ratte |
|-----------|--------|-----------|------------------|
| WBC/      | Gpt    | 19,9      | 37,9             |
| RBC/      | Gpt    | 8,5       | 4,2              |
| HGB/      | mmol/l | 9,5       | 5,3              |
| HCT/      |        | 0,46      | 0,23             |
| MCH/      | amol/l | 1122      | 1259             |
| MCHC/     | mmol/l | 20,5      | 23,0             |
| MCV/      | fl     | 54,2      | 54,6             |
| PLT/      | Gpt    | 692       | 821              |

**Tabelle 1 Beispiel der Blutbildparameter einer anämischen Ratte und einer Kontrolle**

### **4.1.3.2. Primäre Mauszellen**

An murinen Geweben zur Gewinnung von primären Zellen standen Proben aus dem Großhirn und Stammhirn zur Verfügung.

## **4.2. Zellkultur/Gewebebegewinnung**

### **4.2.1. Zellkultur**

Die verwendeten Kulturzellen standen als Aliquots zu  $5-10^6$  Zellen in tiefgefrorenem Zustand (flüssiger Stickstoff) zur Verfügung. Sie wurden im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut, in 5 ml Auftaumedium (D-MEM, 20% FCS) überführt und abzentrifugiert (1000 Umdrehungen/min.).

#### **4.2.1.1. ST14A**

Die Kultivierung erfolgte im Kulturmedium D-MEM (10%FCS, 1% Gentamicin) in Zellkulturflaschen (Greiner Labortechnik®, Deutschland,  $75\text{ cm}^2$ ). Die Flaschen wurden bei  $33^\circ\text{C}$  und  $5\%\text{CO}_2$  für ca. drei Tage inkubiert (ca. 90% Konfluenz) und dann für die Experimente verwendet bzw. weiter propagiert.

#### **4.2.1.2. Ba/F3 und J2E**

Ba/F3 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium zusammen mit 10% FCS und 4% konditioniertem Medium von BPV-Zellen als IL-3 Quelle gehalten. J2E Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS kultiviert. Als Antibiotikum wurde in beiden Zellkulturen Gentamicin zugesetzt.

## **4. Material und Methoden**

---

### **4.2.2. Zellgewinnung (adhärente Zellen)**

Aus konfluenten Kulturflaschen wurde das Medium abgenommen, mit vorgewärmten PBS (GibcoBRL®, Paisley, Schottland) gespült und mit 3 ml ebenfalls vorgewärmter Trypsinlösung (2,5 g/l Trypsin, 0,38 g/l EDTA, GibcoBRL®) behandelt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 35°C konnten die Zellen vollständig mit dem Zellschaber (Greiner Labortechnik®, Deutschland) vom Untergrund abgelöst, und die Trypsinreaktion mit 8 ml Mediumzugabe beendet werden. Anschließend wurde die Zellsuspension durch Zentrifugation bei 300 x g pelletiert und zur Probengewinnung verwendet.

### **4.2.3. Zellzählung**

Die durch Trypsinierung gewonnenen Zellen wurden in PBS suspendiert und ein Aliquot von 50µl mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung gemischt. Anschließend wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt.

### **4.2.4. Einfrieren von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 5-10<sup>6</sup> Zellen/ml in FCS eingestellt, mit 1 ml Gefrierlösung (10% FCS, DMSO) gemischt und danach in Kryoboxen (Nalgene®, Hereford, UK) auf -70°C abgekühlt. Nach mindestens 2h bei -70°C konnten die Zellen zur Langzeitlagerung in einen Stickstofftank überführt werden.

### **4.2.5. Gewebegewinnung**

Nach Tötung der Tiere in einer CO<sub>2</sub> Atmosphäre wurden die Organe mit sterilen mikrochirurgischen Instrumenten unter einer Abzugshaube (Heraeus®, Hanau, Deutschland) freipräpariert, entnommen und umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Vor der RNA Isolation mittels Trizol®(Invitrogen®, Karlsruhe, Deutschland) Reagenz wurden die Organe in gefrorenem Zustand mit einem Skalpell zerkleinert und in einem Glasmörser homogenisiert.

## **4.3. Nukleinsäure-Isolation/Modifikation/Klonierung**

### **4.3.1. RNA Isolation**

Die Gewinnung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem Reagenz Trizol® gemäß den Angaben des Herstellers. Für einen Ansatz zur RNA Gewinnung wurden 5-10x10<sup>6</sup> Zellen oder 50-100 mg homogenisiertes Gewebe in 1 ml Trizol® suspendiert. Bei diesem Verfahren wird



## **4. Material und Methoden**

---

zunächst die RNA extrahiert, durch Zugabe von Isopropanol ausgefällt und nach wiederholtem Waschen mit 70% Ethanol getrocknet und in RNase freiem Wasser gelöst. Die Bestimmung der Konzentration der Gesamt-RNA erfolgte mit einem Photospektrometer (Ultrospec 2100 pro®Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg, Deutschland), wobei typischerweise eine Menge von etwa 100-300 µg RNA pro Ansatz resultierte.

### **4.3.2. cDNA Synthese**

Für die cDNA-Synthese wurden Oligo-dT Primer verwendet, die komplementär zu Poly-A Sequenzen am 3'-Ende von mRNAs sind. Während der cDNA-Synthese entsteht damit ein Pool von cDNA-Molekülen, die für die jeweils vorhandenen mRNAs und damit die Proteinexpression einer Zelle repräsentativ sind. Für die Reaktionen wurde ein Protokoll der Firma Promega® (Mannheim, Deutschland) genutzt. 1 µg der Gesamt-RNA wurde mit 2 µl Oligo-dT Primer (50 µM) versetzt, mit deionisiertem Wasser auf 12 µl aufgefüllt, für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Danach wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt: 4 µl 5x M-MLV Reaction Buffer, 1 µl dNTP Mix (10 mM), 0,5 µl RNase Inhibitor (40 U/µl) sowie 1 µl M-MLV RT (200 U/µl). Diese Lösung wurde dann mit dem RNA-Primer-Mix gemischt und für 1h bei 42°C inkubiert. Das Reaktionsprodukt konnte nun bei einer Temp. von -20°C gelagert oder direkt für PCR Experimente weiterverwendet werden (→4.3.4.).

### **4.3.3. Primerkonzeption**

Die Primer wurden mit dem Programm FastPCR (Universität Helsinki, Finnland) entwickelt und von der Firma Biotex® Berlin Buch GmbH (Deutschland) synthetisiert und HPLC-gereinigt. Alle Primer wurden so konzipiert, dass ihre Schmelztemperaturen miteinander kompatibel waren. So waren die wichtigsten Parameter der Primer  $T_m50$  (Temperatur, bei der 50% der Primer dissoziiert sind) ca. 50°C, GC-Gehalt ca. 50-60% und Haarnadelstruktur-Enthalpie=0,0 kcal/mol. Die Berechnung der Schmelztemperatur der Primer erfolgte nach der Formel (Baldino F. et al. 1989):

$$T_m = 81,5 + 16,6 \cdot \lg[\text{Me}^+] + 0,41 \cdot (\% \text{GC}) - 675/N - (\% \text{mismatch}).$$

Dabei bedeuten:  $[\text{Me}^+]$  Konzentration monovalenter Kationen in mol/l; (%GC) prozentualer Anteil an Guanin- und Cytosinresten; mismatch prozentualer Anteil von Basenfehlpaarungen  
Die Annealing-Temperaturen wurden experimentell beginnend mit dem Wert der Schmelztemperatur optimiert. Tabelle 2 stellt die verwendeten Primer mit Bezeichnung und Nukleotidsequenz dar.

## 4. Material und Methoden

| Verwendete Primer in den verschiedenen PCR-Reaktionen |   |
|---|---|
| Name des Primers                                      | Primersequenz in 5'→3' Richtung         |
| rEPOR_723(+)  | ACT GAC TGC TAG CGA CTT GGA             |
| rEPOR_1524(-)   | CTA GGA GCA GGC CAC GTA G               |
| rEPORV1_861(-)  | ACA CTG TCC CCA GGC CAG AT              |
| rEPORV1_839(+)  | AAG ATC TGG CCT GGG GAC AG              |
| rEPOR_1122(-)   | AAC CAT TCA TCC AAT ACC AGG TAG         |
| rEPOR_1100(+)   | TAC CTG GTA TTG GAT GAA TGG TTG         |
| rEPORV2_1101(-)                                       | TGG ACT CCC TGG GCC CG                  |
| rEPORV2_1083(+)                                       | AGC GGG CCC AGG GAG TCC ACG             |
| rEPOR_783(+)  | CTC ACT GTT GCT GAC TGT GCT             |
| rEPOR_1275(-)   | TAC TCA AAG CTG GAA GGC GAG             |
| rEPOR_1020(+)   | TGA CTC AGG CTG GGG ATG CA              |
| rEPOR_1488(-)   | GTG TCT GGA ACA AGG CTA TTC TC          |
| rEPOR_1356(-)   | TTC AGG TGA GGT GGA GTG GG              |
| rEPOR_1154(-)   | AGA GGT TCT CAC TGC ATG GG              |
| hEPOR_884(+)  | GCC TAG CGA CCT GGA CC                  |
| hEPOR_1663(-)   | CTA AGA GCA AGC CAC ATA GCT G           |
| rEPOR_-17(+)  | GGT ACC TGG GGC TAC ATC ATG GAC CAA CTC |
| rEPOR_1526(-)   | TAC GTG GCC TGC TCC TAG GAT CTA GA      |
| M13_forward   | GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA          |
| M13_reverse   | TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC             |
| rEPOR_tRPA_Intron_7(+)                                | GTA ACC TGT TTGTCT TCT CTG TTC          |
| rEPOR_635(+)  | GGA CGC GCT ACA CCT TCG C               |
| rEPOR_1091(-)   | TGG GCC CGC TCA CTG CCC AC              |

**Tabelle 2** Verwendete Primer in den verschiedenen PCR-Versuchen

### 4.3.4. PCR Varianten

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden DNA-Matrizen (Templates) sequenzspezifisch amplifiziert (Saiki R.K. et al. 1989). Dazu wird die DNA durch eine Temperatur von ca. 95°C zunächst in ihre Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt, der Anlagerungsreaktion, hybridisieren anschließend die Oligonukleotidprimer mit ihrem komplementären DNA-Strang (Annealing), worauf im dritten Schritt die DNA-Polymerase eine DNA-Neusynthese zwischen diesen Primern in 5'→3' Richtung vornimmt (Elongation). Der Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird 20-50 mal wiederholt (je nach Ausgangskonzentration der zu amplifizierenden DNA), wobei die neu synthetisierten Tochterstränge im nächsten Zyklus selbst als DNA-Matrizen

#### 4. Material und Methoden

fungieren. Schon ab dem dritten Zyklus entstehen so DNA-Doppelstränge, deren Länge dem Abstand zwischen den Primern entspricht. Mit jedem Zyklus erhöht sich der Anteil dieser DNA-Abschnitte mit der Zielsequenz auf etwa das doppelte, so dass theoretisch nach n Zyklen eine Anzahl von maximal  $2^n$  DNA-Molekülen dieser Länge im Reaktionsansatz enthalten ist. Dies entspricht einer logarithmischen Vervielfältigung der DNA-Zielsequenz. Im Verlauf der Versuche wurden einige Parameter dieser Methode den speziellen Anforderungen der jeweiligen Fragestellung angepasst. So wurde z.B. die Annealingtemperatur zur Erhöhung der Spezifität variiert oder die Zahl der Reaktionszyklen verändert, um die Sensitivität der Methode zu modifizieren. In Tabelle 3 sind die verwendeten und je nach ihrer Fragestellung optimierten Protokolle aufgeführt, die auf Grund ihrer vielfältigen Variationen nicht erschöpfend dargestellt werden können.

Alle PCR-Produkte wurden im Anschluß an die Reaktion elektrophoretisch auf einem DNA-Agarosegel analysiert und z.T. für weitere Versuche verwendet.

| Protokoll        | Template | Reaktionsansätze  | Thermocycling   |
|------------------|----------|---|---|
| Standard-PCR     | cDNA     | 25 µl Taq Mastermix Kit<br>(Quiagen®)<br>23 µl Bidest<br>0,5 µl (+) Primer (50 µM)<br>0,5 µl(-) Primer (50 µM)<br>1 µl DNA Lsg.<br>mit 50 µl Wachs (Chill out 14,<br>MJ Research®) überschichten  | 1x 5min 95°C<br>35x 30sec 95°C<br>30sec 57°C<br>1min 72°C<br>1x 7min 72°C |
| Pfu-Hotstart-PCR | cDNA     | 40 µl Bidest<br>5 µl 10x PfuTurboCx Rxn Buffer<br>1,25 µl dNTP (10 mM)<br>0,5 µl (+) Primer (50 µM)<br>0,5 µl (-) Primer (50 µM)<br>1 µl (2,5 U/µl) PfuTurbo Cx<br>Hotstart Polymerase<br>(Stratagene®)<br>2 µl DNA-Lsg.<br>mit 50 µl Wachs (Chill out 14,<br>MJ Research®) überschichten | 1x 3min 95°C<br>40x 1min 95°C<br>1min 57°C<br>1,5min 72°C<br>1x 7min 72°C |

**Tabelle 3 PCR Protokoll der Standardreaktionen**

## **4. Material und Methoden**

---

### **4.3.5. Agarosegelelektrophorese**

Nukleinsäuren können bei geeignetem pH-Wert als geladene Makromoleküle innerhalb eines elektrischen Feldes in einer Agarose-Gelmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. RNA und DNA sind im pH Bereich des Puffers (pH 8,0) aufgrund ihres Phosphatrests negativ geladen und wandern daher zur Anode. Im Anschluss an die PCR kann so anhand der Größe des amplifizierten Produkts dessen Reinheit und Spezifität überprüft werden.

Durchführung: Eine 1-2%ige Agarosesuspension (GibcoBRL®) wurde in 0,5x TBE Puffer (GibcoBRL®) angesetzt und die Agarose durch Kochen gelöst. Zu der abkühlenden Agaroselösung wurde Ethidiumbromidlösung (GibcoBRL®, Endkonzentration 0,3 µg/ml) zugegeben und die Agaroselösung auf einen Gelträger (MiniSub CellGT, BioRad®, München, Deutschland) gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 0,5xTBE gefüllte horizontale Elektrophoresekammer (BioRad®) transferiert. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer gemischt und ebenso wie ein DNA Molekülgewichtsmarker (1kb ladder, GibcoBRL®) in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V (PowerSupply Model200/2, BioRad®) durchgeführt. Die notwendige Laufzeit bis zur ausreichenden Auftrennung der Proben konnte anhand der Farbmarker Bromphenolblau bzw. Xylencyanol im Ladepuffer oder mittels UV-Tisch (INTAS Concept 95 KFE 103®, NewHaven, USA) und direkter Beobachtung des Bandenmusters ermittelt werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarosegel zur Auswertung im UV-Licht photographiert und als Bitmap Datei abgespeichert.

### **4.3.6. Gelelution**

Die Extraktion und Aufreinigung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen basiert auf der Löslichkeit von Agarose und der selektiven, quantitativen Adsorption von Nukleinsäuren (bis zu 10 µg) an einer Silicagelmembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, während andere Bestandteile die Membran ungebunden passieren können.

Die DNA-Extraktion erfolgte nach der Auftrennung der DNA im Agarosegel mit Hilfe des „QIAquick® Gel Extraction Kit“ (Quiagen®, Hilden, Deutschland). Dabei musste das zu extrahierende DNA-Fragment zunächst unter einer UV-Lampe (INTAS Concept 95 KFE 103®, IBI®, New Haven, USA) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und gewogen werden. Das Gewicht der ausgeschnittenen Banden betrug in der Regel 150-300 mg. Pro 100 mg Gelstück wurden dann 300 µl Puffer QG zugegeben. Anschließend wurde das Röhrchen im Wasserbad bei 50 °C für ca. 10 min

## **4. Material und Methoden**

---

inkubiert, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Um diesen Vorgang zu beschleunigen, wurde die Probe alle 3 min gemischt. Nach der Inkubation wurden dem Röhrchen pro 100 mg Agarose 100 µl Isopropanol zugeführt, die Probe wurde anschließend gemischt und dann auf eine QIAquick®-Zentrifugensäule in einem 2 ml Auffangröhrchen gegeben. Die Zentrifugation erfolgte bei 12000 x g für 1 min in einer Eppendorf Tischzentrifuge. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule erneut auf das Auffanggefäß gesetzt. Anschließend wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wieder 1 min zentrifugiert. Zur Entfernung letzter Reste des PE-Puffers wurde nochmals wie bereits oben beschrieben zentrifugiert. Nach dem Waschen wurde die Säule dann auf ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und 50 µl Elutionspuffer EB (10 mM TrisCl, pH 8,5) in die Mitte der Silicagelmembran pipettiert. Nach 1 min Inkubationszeit erfolgte eine erneute Zentrifugation für 1 min. Die nunmehr eluierte DNA konnte für Ligationen verwendet werden.

### **4.3.7. Ligation der DNA Fragmente in Klonierungsvektoren und Transformation in Bakterien**

Für die Klonierung von frisch erzeugten PCR-Fragmenten wurde der TOPOTM® TA Cloning Kit Version N der Firma Invitrogen verwendet. Dieser Kit beruht auf folgendem Prinzip: Die *Taq*-Polymerase fügt während der Reaktion unspezifisch einen 3'dA-Überhang an das PCR-Produkt an. Der bereits linearisierte TOPO TA® Vektor hat demgegenüber an seinen 3'-Enden einen dT Überhang und ist zusätzlich mit Topoisomerase I gekoppelt. Dadurch wird eine schnelle und effiziente Ligation von PCR-Fragmenten in den Vektor ermöglicht. In der Regel wurden folgende Ansätze verwendet:

|                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| PCR-Produkt                        | 0,5-4 µl |
| Bidest. Wasser                     | ad 5 µl  |
| Salzlösung, TOPOTM® TA Cloning Kit | 1 µl     |
| Vektor pCR2.1                      | 1 µl     |
| Gesamtvolumen                      | 7 µl     |

Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt, anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf Eis gestellt. Zeitgleich wurden kompetente Bakterien (One Shot Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen®) auf Eis aufgetaut. 2 µl des Ligationsansatzes wurden zu den Zellen hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert.

#### 4. Material und Methoden

---

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen für 30 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterworfen und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Den Proben wurde anschließend 250 µl raumtemperiertes SOC-Medium (Invitrogen®) zugesetzt. Die E. coli Kulturen wurden bei 37 °C für 1 Stunde horizontal rotierend (bei 200 U/min) inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension auf vorgewärmte und mit 100 mg/ml Ampicillin und 80µl X-gal (Sigma®, Deisenhofen, Deutschland) vorbehandelte LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus Instruments®) inkubiert. Nach ca.17h Vermehrungszeit der Bakterien bildeten sich Kolonien verschiedener Bakterienklone auf der LB-Agarplatte. Die Kolonien unterschieden sich in ihrer Farbe, es waren farblos helle und blaue Kolonien vorhanden. Dieser Farbunterschied beruhte auf den Eigenschaften des Transformationsvektors, dieser enthält ein Gen für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, welches das Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff umsetzt. Wurde nun in den Vektor erfolgreich ein DNA-Fragment einkloniert und befand sich dieses an der vorgesehenen Klonierungsstelle im  $\beta$ -Galaktosidasegen, so wurde die Synthese dieses Enzyms unmöglich und die Kolonien blieben farblos. Um nun auch Bakterienklone, die das gewünschte DNA-Fragment aufgenommen hatten, von jenen zu selektionieren, die unspezifische DNA -Sequenzen beinhalteten, wurde eine sog. Kolonie-PCR durchgeführt (Tabelle 4). Dazu wurden farblose Kolonien mit einer 10 µl Pipettenspitze vom LB-Agar abgenommen und in einem vorbereiteten Kolonie-PCR Ansatz (siehe unten) suspendiert, gleichzeitig wurden Kolonien auf neuen Agarplatten angelegt. Die PCR wurde mit spezifischen Primern für das gesuchte Fragment durchgeführt, entsprechend positive Kolonien wurden dann für weitere Versuche verwendet.

Ein Kolonie-PCR Ansatz bestand aus folgenden Teilen:

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Taq-Mastermix (TAQ, Puffer, dNTP's) | 12,5 µl |
| Primer (+)                          | 0,25 µl |
| Primer (-)                          | 0,25 µl |
| Wasser                              | 12 µl   |

Das Temperaturprofil erforderte eine längere Denaturierungsphase, um die Plasmid-DNA in den Bakterien einer Amplifikation zugänglich zu machen. Initiale Denaturierung: 5 min bei 95°C.

## **4. Material und Methoden**

| Vorgang                | Zyklenzahl | Temperatur | Dauer    |
|------------------------|------------|------------|----------|
| initiale Denaturierung | 1          | 95°C       | 5 min    |
| Denaturierung          | 30         | 95°C       | 45 s     |
| Annealing              |            | 57°C       | 45 s     |
| Elongation             |            | 72°C       | 1 min/kb |
| finale Elongation      | 1          | 72°C       | 5 min    |

**Tabelle 4 Reaktionsbedingungen der Kolonie-PCR**

### **4.3.8. DNA Ligation in eukaryonte Expressionsvektoren und stabile Expression in Ba/F3 Zellen**

Die transformierten und selektionierten Bakterien, die den TOPO®-Vektor mit dem gewünschten Insert enthielten, wurden vermehrt und die Plasmide im Anschluss präpariert. Danach erfolgte eine Restriktionsspaltung zur Isolation der inserierten DNA-Sequenzen. Mit den gleichen Restriktionsenzymen wurde der eukaryonte Expressionsvektor pcDNA 3.1 gespalten. Dadurch war es möglich, die Nukleinsäuresequenzen aus dem TOPO®-Vektor in pcDNA 3.1 zu überführen. Zur Ligation in den neuen Vektor wurde der gleiche Versuchsablauf wie in Abschnitt 4.3.7. beschrieben angewendet. Nach erneuter Transformation in Bakterien, Vervielfältigung und Isolierung wurde die Sequenz bzw. die korrekte Orientierung der inserierten cDNA überprüft. Anschließend wurden die Plasmide in murine Ba/F3 Zellen eingebracht.

Zur Transfektion wurden die Plasmide mittels Elektroporation (Chu et. al. 1987) in die Ba/F3 Zellen überführt. Bei diesem Vorgang wurden  $1 \times 10^7$  Zellen und 20 µg DNA in 800 µl kaltem PBS gelöst. Danach erfolgte die Elektroporation mittels BioRad®-Gene Pulser (300 V, 960 µF). Diese Art der Transfektion beruht darauf, dass durch die angelegte Spannung für einen kurzen Augenblick die Zellmembran für die Plasmide durchgängig wird, sich jedoch nachfolgend wieder verschließt und die Vitalität der Zellen erhalten bleibt. Zellen, bei denen die Membranschädigung zu umfangreich war, sterben bei dieser Prozedur (ca. 50%).

Da der verwendete Expressionsvektor ein Neomycin-Resistenzgen enthält ist es möglich im Anschluss an die Elektroporation die transfizierten Zellen zu selektieren. Das Resistenzgen ermöglicht den Zellen die Produktion einer Aminoglykosid-Phosphotransferase, welche dem verwendeten Geneticin® (Calbiochem®, Bad Soden, Deutschland) die Fähigkeit zur ribosomalen Bindung und damit die Toxizität nimmt. Zwei Tage nach Transfektion wurden

## **4. Material und Methoden**

---

die Zellen mit G418-Selektionsmedium (Calbiochem®) versetzt, Zellen ohne Resistenzen waren nun nicht mehr in der Lage Proteine zu synthetisieren und starben.

Nach Selektion der resistenten Zellen wurde die polyklonale Kultur auf ca. 5 Zellen/ml in G418-Selektionsmedium verdünnt und es wurden je 100 µl Suspension in jede Vertiefung einer 96er-Mikrotiterplatte überführt. Heranwachsende Einzelzellklone wurden später in größere Kulturgefäße überführt. Sobald ausreichend monoklonale Zellen zu Verfügung standen, wurden diese mittels RT-PCR und Immunoblotting auf das gewünschte Genprodukt untersucht.

### **4.3.9. Gewinnung von Plasmid DNA aus den Bakterienklonen**

#### **4.3.9.1. DNA Mini-Präparation**

Zur weiteren Verwendung und Sequenzkontrolle wurden Plasmidisolierungen durchgeführt. Hierfür erfolgte die Präparation der Plasmide aus Flüssigkulturen. Dazu wurde 5 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (Ampicillin 100 µg/ml) mit einer Bakterienkolonie beimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 U/min) inkubiert. Nachdem diese Kulturen ihre stationäre Wachstumsphase erreicht hatten, erfolgte die Aufarbeitung mittels eines Kits der Firma Invitex® (Invisorb Spin Plasmid Mini Kit, Berlin, Deutschland). Die Funktionsweise dieses Kits basiert auf der Methode der modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim H.C. und Doly J.A., 1979), sowie der Adsorption von DNA an Silicagelmembranen bei hohen Salzkonzentrationen (Vogelstein B. und Gillespie D., 1979). Nach Gewinnung eines Zellpellets durch Zentrifugation erfolgte die alkalische Lyse mit NaOH-SDS-Lösung. Daran schloß sich die Neutralisation des pH-Wertes mit Essigsäure an, die zum Ausfällen vieler Proteine, Lipoproteine und der chromosomalen DNA führt. Nach dem Abzentrifugieren der festen Bestandteile wurde der klare Überstand kurz mit einer DNA-bindenden Matrix inkubiert. Während die gebundene Plasmid-DNA zurückgehalten wird, werden die anderen löslichen Bestandteile des Lysates durch Spülen mit einer ethanol- und salzhaltigen Waschlösung entfernt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe eines wässrigen Elutionspuffers von der Matrix eluiert. Danach wurde die Plasmid-DNA pro 100 µl DNA-Lösung mit 50 µl 3M Ammoniumacetatlösung und 350 µl 100% Ethanol über Nacht bei Raumtemperatur ausgefällt, am nächsten Tag abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in Aqua dest. aufgenommen. Die detaillierten Präparationsvorschriften wurden den Angaben des Herstellers entnommen. Eine Plasmid Mini Präparation lieferte im Durchschnitt etwa 10 µg DNA.



## **4. Material und Methoden**

---

### **4.3.9.2. DNA Maxi-Präparation**

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden Teile einer Bakterienkolonie in 200 ml LB-Flüssigkultur (50 µg/ml Ampicillin) gegeben und vermehrt. Die Plasmid-Präparation erfolgte anschließend mit dem Kit NucleoBond® der Firma Macherey-Nagel® (Düren, Deutschland) nach der vorgegebenen Anleitung, vom Versuchsprinzip ist dieses Verfahren mit der Mini-Präparation identisch. Eine Plasmid Maxi Präparation lieferte im Durchschnitt etwa 500 µg DNA.

### **4.3.10. Restriktionsspaltung von DNA-Molekülen**

Zur Restriktionsspaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Klasse II verwendet, welche innerhalb palindromischer Erkennungssequenzen von ca. 4-8 Basen schneiden. Die Restriktionsspaltung erfolgte in den vom Hersteller (New England Biolabs®, Frankfurt, Deutschland) mitgelieferten Puffern für ca. 2 h bei 37 °C. Dabei wurden 1-5 U Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt.

### **4.3.11. DNA-Sequenzanalyse**

Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden unter Benutzung des „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham®) durchgeführt. Dieses Kit kombiniert das Verfahren der Kettenabbruchreaktion (Sanger F. et al., 1977) mit einer DNA-Amplifikation durch eine zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte (Thermocycling) und einer Fluoreszenzmarkierung. Die im Vektor beiderseits der Klonierungsstelle vorhandenen Bindungsstellen für Standardprimer (M13\_forward, M13\_reverse) ermöglichten die Sequenzanalyse unbekannter Basenfolgen.

Für jede Probe wurden zunächst folgende Komponenten in einem Volumen von 30 µl gemischt.

4% DMSO

80 nM fluoreszenz-markierter Primer (M13\_forward, M13\_reverse)

≈60 ng/µl Plasmid-DNA

Je 6 µl dieses Ansatzes wurden in Biozym® (Oldendorf, Deutschland) 96-V Mikroplatten überführt und mit 2 µl der im Kit mitgelieferten Reaktionslösungen A, C, G bzw. T gemischt und mit 10 µl Wachs überschichtet. Die Parameter für das Temperatur-Cycling sind in Tabelle 5 dargestellt.

## **4. Material und Methoden**

---

| Vorgang                | Zyklenzahl | Temperatur | Dauer |
|------------------------|------------|------------|-------|
| initiale Denaturierung | 1          | 95°C       | 4 min |
| Denaturierung          | 30         | 95°C       | 30 s  |
| Annealing              |            | 55°C       | 30 s  |
| Elongation             |            | 72°C       | 30 s  |

**Tabelle 5 Reaktionsbedingungen der Sequenzierungsreaktion**

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze mit der im Kit enthaltenen Stop-Lösung gemischt. Danach erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der synthetisierten DNA-Fragmente durch ein Polyacrylamidsequenziergel.

Das Sequenziergel wurde folgendermaßen hergestellt: 15 ml Polyacrylamidsequenzierlösung wurden mit 7,5 ml Sequenzierpuffer, 400 µl DMSO und 300 µl TEMED gemischt und danach blasenfrei zwischen zwei Glasplatten gegossen (1,5 h Polymerisationszeit). Das Gel wurde in die Sequenzierkammer (LI-COR®, Lincoln, USA) eingehängt, auf 50°C erwärmt und mit 1,2 µl der Proben beladen. Danach erfolgte die Auftrennung bei 1500 Volt Spannung und 50 Watt Leistung.

Die Rohdaten wurden mit dem Programm BaseImageIR (LI-COR®) in Sequenzdateien umgewandelt. Die Auswertung der Sequenzdateien (.abi) erfolgte mit den PC-Software-Produkten Sequencing Analysis (PerkinElmer®, Norwalk, USA), Chromas (Technelysium®, Helensvale, Australien) und BioEdit Sequence Alignment Editor (Isis Pharmaceuticals, Inc.®, Carlsbad, USA). Vergleiche mit den Sequenzdatenbanken EMBL und Genbank wurden mit Hilfe des Blast-Programms (Altschul S.F. und Koonin E.V., 1998) über den Webserver [www.ncbi.nlm.nih](http://www.ncbi.nlm.nih) am NIH (USA) oder über den Fasta3-Server [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) am EBI (Cambridge, GB) vorgenommen. Zur Bestätigung neuer Sequenzen wurden mindestens zwei identische cDNA-Klone benötigt.

### **4.4. Proteinchemische Verfahren**

#### **4.4.1 Proteinnachweis mittels Immunoblotting**

##### **4.4.1.1. Herstellung von Gesamtproteinextrakten**

Zellen einer konfluent bewachsenen Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) bzw ca. 1x10<sup>6</sup> Zellen wurden nach Ablösen und Waschen in PBS in 100 µl 95°C heißem Probenpuffer (2%SDS, 10% Glycin, 5mM EDTA, 62,5mM Tris, 0,001% Bromphenolblau, 5% Mercaptoethanol) aufgenommen. Danach wurden die Zellen in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei

## 4. Material und Methoden

95°C im Heizblock für 5 min inkubiert. Um die in den Proteinproben enthaltene DNA zu fragmentieren, welche die Ansätze sehr viskös und damit schwer pipettierbar machte, wurde eine Ultraschallbehandlung angeschlossen (20 kHz, 1 min). Dazu wurde das Gerät Bandelin/Sonopuls® (Berlin, Deutschland) verwendet.

### 4.4.1.2. SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor der immunchemischen Detektion im Western Blot wurden die zellulären Proteine über SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen nach dem von Laemmli U.K. (1970) beschriebenen Verfahren aufgetrennt. Es wurde ein diskontinuierliches Vertikal-Elektrophoresesystem verwendet. Das Trenngel hatte eine Konzentration von 8% Polyacrylamid, das Sammelgel 3,9%. Die Elektrophorese wurde in Elektrodenpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3) durchgeführt. Für die SDS PAGE wurden folgende Gele und Puffer benutzt:

| <b>SDS-Polyacrylamidgele:</b> |                      |                      |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
|                               | Trenngel 8%          | Sammelgel 3,9%       |
| 40% Acrylamid/Bis-29:1        | 6,0 ml               | 1,0 ml               |
| Trenn- bzw. Sammelgelpuffer   | 7,5 ml               | 2,0 ml               |
| 10% Ammoniumpersulfat         | 250 µl               | 50 µl                |
| TEMED                         | 17 µl                | 10 µl                |
| H <sub>2</sub> O              | auf 30 ml auffüllen  | auf 8 ml auffüllen   |
| <b>Puffer:</b>                |                      |                      |
|                               | Trenngelpuffer       | Sammelgelpuffer      |
| Tris                          | 36,3g                | 6,1g                 |
| SDS                           | 0,8g                 | 0,4g                 |
| H <sub>2</sub> O              | auf 200 ml auffüllen | auf 100 ml auffüllen |
| pH                            | pH 8,8               | pH 6,8               |

**Tabelle 6 Zusammensetzung der Gele und Puffer zur SDS-PAGE**

Das SDS-PAGE-Trenngel wurde in eine vertikale Gelkammer (Renner®, Dannstadt, Deutschland) gegossen und anschließend mit Butanol überschichtet, um unter Luftabschluß eine gleichmäßige Polymerisation und eine exakte Grenzschicht zu gewährleisten. Nach 2h war die Polymerisation abgeschlossen, das Butanol wurde entfernt, das Sammelgel über das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nachdem das Gel 1h gehärtet war wurden üblicherweise 10-100 µl Gesamtzellysate aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde der Proteinmarker Prestained Protein Marker (Biorad®) verwendet.

## **4. Material und Methoden**

---

### **4.4.1.3. Blotting**

Nach der SDS-PAGE wurden aufgetrennte Proteine über ein Tank-Blot-Verfahren aus dem Gel eluiert und auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF) immobilisiert, um sie Analysen zugänglich zu machen (Imunoblotting). Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran basierte auf einer ursprünglich von Towbin H. et al. (1979) beschriebenen Methode. Für das Tank- Verfahren wurde eine Transferkammer (Fa. Biorad®) benutzt. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde zunächst das Sammelgel mit einem Skalpell abgetrennt und das Trenngel für 10 min in Transferpuffer (50 mM Tris; 40 mM Glycin; 0,0375%SDS; 20% Methanol) äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde für 10 s in Methanol aktiviert, 5 min in Aqua bidest. gespült und ebenfalls in Transferpuffer für 10 min äquilibriert. Zeitgleich wurden 6 Whatman®-Filterpapiere (Maidstone, UK) auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Das „Transfer-Sandwich“ wurde wie folgt zusammengesetzt:

#### **ANODE (+) oben**

3 Whatman®-Paper

PVDF-Membran

Polyacrylamidgel

3 Whatman®-Paper

#### **KATHODE (-) unten**

Luftblasen wurden beim Aufbau des Sandwiches mit einer Gummiwalze entfernt und danach erfolgte der Transfer bei 400 mA und 4°C über 4 Stunden (PowerSupply Model200/2, BioRad®). Die Membran wurde aus dem Tank genommen und 1h in PBS-Tween (GibcoBRL®) mit 5% BSA und 0,1% Natriumacid inkubiert (Blockvorgang), danach konnten die Immunreaktionen durchgeführt werden.

### **4.4.1.4. Immunreaktionen**

Nachdem die freien Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran durch den Blockvorgang besetzt und die ungebundenen Proteine durch dreimaliges Waschen in PBS-Tween entfernt waren, konnte der spezifische Antikörper gegen das gesuchte Protein zugegeben werden. Dazu wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 oder 1:2000, je nach Bindungsaktivität, in PBS-Tween mit einem Zusatz von 5% BSA und 0,1% Natriumazid für

## **4. Material und Methoden**

12h bei 4°C unter ständigem horizontalem Schütteln inkubiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7/8 aufgeführt. Um überschüssige Antikörper zu entfernen schloss sich erneut ein Waschschrift von 3 mal 10 min in PBS-Tween an. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Nach Entfernen der Sekundärantikörperlösung, wurde die Membran erneut dreimal, für je 10 min, bei Raumtemperatur in PBS-Tween gewaschen.

### **4.4.1.4.1. Primäre Antikörper**

| Antigen                  | Name/Nummer         | Quelle                | Hersteller                                     |
|--------------------------|---------------------|-----------------------|--|
| p42/44 MAPK<br>(pan ERK) | #612641             | Maus(monoklonal)      | BD Bioscience<br>Pharmlngen®<br>(SanJose, USA) |
| Phospho-<br>p42/44 MAPK  | #9106               | Maus(monoklonal)      | Cell Signaling®<br>(Danvers, USA)              |
| EPOR                     | EpoR(H-194):sc-5624 | Kaninchen(polyklonal) | Santa Cruz® (Santa<br>Cruz, USA)               |
| Phospho-STAT5            | #9351               | Kaninchen(polyklonal) | Cell Signaling®                                |
| Phospho-JAK2             | #3771               | Kaninchen(polyklonal) | Cell signaling®                                |

**Tabelle 7** Verwendete primäre Antikörper

### **4.4.1.4.2. Sekundäre Antikörper**

| Antigen        | Name/Nummer | Quelle | Hersteller |
|----------------|-------------|--------|------------|
| Anti-Kaninchen | NA934V      | Esel   | Amersham®  |
| Anti-Maus      | NA931V      | Schaf  | Amersham®  |

**Tabelle 8** Verwendete sekundäre Antikörper

### **4.4.1.5. Detektion mittels „enhanced chemiluminescence“ (ECL)**

Das Prinzip der Proteindetektion mittels ECL+ Lösung beruht auf der Oxidation des Substrats Luminol durch das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase und der damit verbundenen Lichtemission bei einer Wellenlänge von 428 nm. Da die Reaktion nur im Bereich der Immunkomplexe auftritt, ist eine spezifische Detektion von

## **4. Material und Methoden**

---

Proteinen möglich und durch Intensitätsdifferenzen ebenfalls eine quantitative Abschätzung der relativen Proteinmengen.

Mit einem Filterpapier wurde vorsichtig überschüssige Flüssigkeit von der Membran abgenommen und anschließend 125  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  ECL+ Lösung (Amersham®) gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Membran mit einer Folie versiegelt, um sie vor Verdunstung und damit Beendigung der Lumineszenzreaktion zu schützen. Die so präparierte Membran wurde mit einer Lumineszenzkamera (Fuji CCD 440L®, Tokio, Japan) oder durch Röntgenfilme (Agfa®, Mortsel, Belgien) analysiert. Je nach Intensität waren Expositionszeiten von wenigen Sekunden bis zu einigen Minuten notwendig.

### **4.4.2. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Um spezifische Protein-DNA-Interaktionen zu untersuchen, wurden „Electrophoretic mobility Shift Assays“ (EMSA) durchgeführt (Fried M.G. und Crothers D.M., 1981, Garner M.M und Revzin A., 1981). Diese Methode nutzt den Effekt, dass proteingebundene DNA gegenüber freier DNA eine Änderung (Shift) in der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit (Mobility) aufweist und so z.B. vergleichend untersucht werden kann, ob und wie stark Rezeptoren nach Stimulation DNA-bindende Proteine aktivieren. Um die DNA-Proteinkomplexe sichtbar zu machen, wurden die DNA-Sonden radioaktiv markiert. Die Identifizierung der Proteine in den Komplexen erfolgte mit Hilfe von gegen die Transkriptionsfaktoren gerichteten Antikörpern, die die Migration zusätzlich reduzierten (Supershift).

#### **4.4.2.1. Stimulation der Zellen und Gewinnung von Kernextrakten**

Eine konfluent bewachsene Flasche (75  $\text{cm}^2$ ), welche ca.  $1 \times 10^6$  Zellen enthielt, wurde mehrfach mit erwärmtem DMEM Medium ohne FCS gewaschen und anschließend mit 5 U/ml rhEPO in Medium für verschiedene Zeiten inkubiert. Die Dauer richtete sich nach der jeweiligen Fragestellung des Versuchs. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, in 50ml Zentrifugenröhrchen überführt, pelletiert und mit PBS (Gibco BRL®) gewaschen. Zur Gewinnung der Kernextrakte wurden anschließend 500  $\mu\text{l}$  eiskalter Puffer A (10 mM HEPES; 10 mM KCl; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 mM DTT; 0,7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin; 1 Tbl. Complete; 1 mM Vanadat; 62,5 ml Endvolumen) zugeführt und die Zellen zur hypotonen Lyse darin suspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10 s Zentrifugation bei 14000 x g und Entfernen des Überstands wurde das Kernpellet in 100  $\mu\text{l}$  eiskaltem Puffer B (20 mM HEPES; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 mM DTT; 25% Glycerol; 420 mM

## **4. Material und Methoden**

---

NaCl; 0,2 mM EDTA; 0,7 µg/ml Pepstatin; 1 Tbl. Complete, 1 mM Vanadat; 62,5 ml Endvolumen) resuspendiert und 20 min im Eisbad extrahiert. Anschließend wurde der Ansatz für 3 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Kernextrakte erfolgte bei -70°C.

### **4.4.2.2. Präparation und Bindung der DNA Sonde**

Die doppelsträngige DNA-Sonde (Erkennungssequenz) wurde durch Hybridisierung zweier komplementärer einzelsträngiger Oligonukleotide (BioTeZ®) hergestellt (Bittorf, T. et al, 2001). Es wurden jeweils 5 µl einer 50 µM Oligonukleotidlösung gemischt und 10 min bei 80°C inkubiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 90 µl Aqua bidestillata verdünnt. Daraufhin wurde die DNA mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-dATP (Amersham) radioaktiv markiert. Dazu wurden 20 µl des folgenden Reaktionsansatzes für 30 min bei 37°C inkubiert.

|                   |  |
|-------------------|--|
| 1x                | Reaktionspuffer (Boehringer®Mannheim)            |
| 125 nM            | doppelsträngiges Oligonukleotid                  |
| ≈0,5 µM, 1,5 Ci/l | [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-dATP, ≈3,3 µM, 10 Ci/l |
| 0.5 U/µl          | T4 Polynukleotidkinase (Boehringer® Mannheim)    |

Anschließend wurde die DNA mit einer Sephadex G25-Säule (Pharmacia Biotech®) von den nicht inkorporierten Nukleotiden getrennt. Nachfolgend wurde die markierte DNA-Sonde für 30 min bei 27°C mit dem Kernextrakt inkubiert. Dazu diente folgender 20 µl Ansatz.

|           |  |
|-----------|--|
| 0,1x      | Kernextrakt  |
| 0,1 mg/ml | Poly-dIdC  |
| 1 mg/ml   | BSA  |
| 1x        | Shift-Puffer5x Vorratslg.: 10 mM Tris; 50 mM NaCl;<br>0,1 mM EDTA, 1 mM DTT;<br>5% Glycerol 0,1% NP40;<br>1mM Pefabloc; pH 7,5 |
| 6,25 nM   | markiertes Oligonukleotid (Sonde)  |

In Supershiftanalysen wurde der Ansatz nach Zugabe (etwa 500 ng) eines Antikörpers gegen das nachzuweisende Protein erneut für 30 min bei 37°C inkubiert.

### **4.4.2.3. Elektrophoretische Auftrennung und Analyse des DNA-Protein Komplexes**

Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf einem 6%-igen Polyacrylamidgel für ca. 2h bei 250 V aufgetrennt. Das Gel hatte folgende Zusammensetzung:

## **4. Material und Methoden**

---

|                                 |                       |
|---------------------------------|-----------------------|
| 12 ml                           | Acrylamid/Bis-29:1    |
| 2 ml                            | 10x TBE, pH 8,4       |
| 480 µl                          | 10% Ammoniumpersulfat |
| 80 µl                           | TEMED                 |
| mit Bidest auf 80 ml aufgefüllt |                       |

Die Elektrophorese wurde in 0,25x TBE-Puffer (pH 8,4) durchgeführt. Danach wurde das Gel zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet (BioRad®). Anschließend wurde ein Röntgenfilm mit dem Gel exponiert.

### **4.5. RNase Protection Assay (RPA)**

Der Ribonuclease Protection Assay (Gilman M. 2001) dient der Identifikation und Quantifizierung von RNA (meist Messenger-RNA) in einem Gemisch aus zellulärer Gesamt-RNA. Er ist im Vergleich zum Northern-Blot wesentlich empfindlicher und erlaubt den Nachweis geringer RNA Mengen. Für den RPA wird eine markierte RNA Sonde synthetisiert, welche komplementär zu der zu analysierenden RNA ist. Hierzu wird ein korrespondierendes DNA Fragment in einen geeigneten Vektor, in dem es unter der Kontrolle eines Bakteriophagen-Promotors (T7, Sp6) steht, kloniert. Durch die Verwendung der entsprechenden DNA-abhängigen RNA-Polymerase (T7- bzw. Sp6 Polymerase) wird so eine für die Ziel-RNA spezifische RNA-Sonde transkribiert. Die radioaktiv markierte RNA-Sonde wird dann mit der Probe inkubiert und nach der Hybridisierung mit Ribonuklease behandelt. Während die hybridisierte RNA vor einer Degradation geschützt bleibt, wird die einzelsträngige, nicht hybridisierte RNA verdaut. Die geschützte RNA wird anschließend auf einem Polyacrylamidgel separiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die nachfolgend dargestellten Reaktionen erfolgten mit dem RNase Protection Kit der Firma Roche® Applied Science (Mannheim, Deutschland), die detaillierten Protokollbedingungen können den Angaben des Herstellers entnommen werden.

#### **4.5.1. Gewinnung einer DNA-Sequenz zur Klonierung in den Transkriptionsvektor**

Mit den Primern rEPOR\_tRPA\_Intron\_7(+) und rEPOR\_1122(-) wurde aus DNA-Proben von ST14A Zellen mittels PCR eine 296bp lange Nukleinsäuresequenz amplifiziert. Die PCR wurde nach dem Taq-Polymerase Protokoll durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die weitere Vervielfältigung der DNA nach Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1 in One



## **4. Material und Methoden**

---

Shot® Chemically Competent *E. coli* Zellen, wie in Abschnitt 4.3.7. beschrieben. Die Plasmide wurden aufgereinigt und die gewünschte Sequenz mit dem Restriktionsenzym EcoRI aus dem Amplifikationsvektor herausgetrennt. Die erhaltenen Schnittstellen dienten zugleich im nächsten Schritt zur Einklonierung in den Transkriptionsvektor pSPT19. Zur DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wurden folgende 20 µl Ansätze pipettiert:

2 µl DNA-Lösung (ca. 1 µg Gesamt-DNA)

2 µl Reaktionpuffer (NEB®, Frankfurt, Deutschland))

2 µl Restriktionsendonuklease EcoRI ,20 Units (NEB®)

14 µl steriles deionisiertes Wasser

Die Spaltungsreaktion erfolgte bei 37°C und einer Inkubationszeit von 60 Minuten.

### **4.5.2. Klonierung einer DNA Sequenz in den Transkriptionsvektor pSPT19**

Wie beschrieben wurde die verwendete Template-DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI so „geschnitten“, dass mit dem Transkriptionsvektor kompatible Enden entstanden. Durch elektrophoretische Auftrennung in einem Ethidiumbromidgel und anschließender Aufreinigung des gewünschten Fragments mittels QIAquick® Gel Extraction Kit“(Quiagen®) konnte die Sequenz in die vorgesehene Polylinkerregion des pSPT19 Vektors eingefügt werden. Die Promotoren für die SP6 und T7 Polymerasen befinden sich auf beiden Seiten der Polylinkerregion des Vektors.

### **4.5.3. *In vitro*-Transkription zur Herstellung einer markierten RNA Probe**

Für dieses standardisierte Protokoll zur Herstellung einer [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] markierten RNA-Sonde wurde zu Beginn 0,5 µg DNA, ein Gemisch aus ATP,UTP und GTP, Reaktionspuffer, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] CTP (400Ci/mmol), steriles Wasser und die SP6 oder T7 Polymerase gemischt. Die Transkription erfolgte während einer Inkubationszeit von 20 min bei 37°C. Um die Template-DNA zu entfernen wurde eine DNase I Behandlung angeschlossen. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 0,2 M EDTA beendet, die nicht „eingebauten“ Ribonukleosidtriphosphate wurden durch Zentrifugation über eine Quick Spin Column, Sephadex G-50® (GE Healthcare®, Freiburg, Deutschland) von den Proben getrennt.

### **4.5.4. Hybridisierung**

Die markierte RNA-Sonde wurde im Hybridisierungspuffer aufgenommen, dabei war die Menge an verwendetem Puffer abhängig von der spezifischen Radioaktivität der Probe.

## **4. Material und Methoden**

---

Nachfolgend wurde den Proben ein RNA-Gemisch aus den zu untersuchenden Zellen zugefügt und diese Ansätze 5 min bei 95°C denaturiert. Die anschließende Hybridisierungsreaktion erfolgte bei 45°C im Heizblock über eine Zeit von mindestens 4 Stunden.

### **4.5.5. RNase Behandlung der RNA-RNA Hybride**

Das Gemisch der RNA-RNA Hybriden wurde mit RNase Digestion Puffer, RNase T1 und RNase A versetzt und für die Spaltung 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte für 15 min bei 37°C eine Proteinase K Behandlung. Zur Extraktion der unverdauten RNA-RNA Hybride wurde ein Phenol/Chloroform/Isopropanol Gemisch verwendet, die gelöste RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und mit Ethanol ausgefällt.

### **4.5.6. Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die RNA-Proben wurden bei 4°C und 14000 x g 15 Minuten zentrifugiert, danach wurde vorsichtig das Ethanol über den Pellets abgenommen, anschließend wurden die Pellets bei Raumtemperatur gelagert, bis das Ethanol vollständig verdunstet war. Die Proben wurden im Probenpuffer aufgenommen und in Eppendorfreaktionsgefäßen 5 min bei 95°C denaturiert. Vor dem Auftragen auf ein 4%iges Polyacrylamidgel (7M Harnstoff) wurden die denaturierten RNA-Lösungen auf Eis zwischengelagert. Die Elektrophorese erfolgte in einem Tris-Borat-Puffer bei 30 Volt für ca. 2,5 Stunden. Danach wurde das Gel zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet (BioRad®). Anschließend wurde ein Röntgenfilm mit dem Gel exponiert oder die Detektion der radioaktiven Banden erfolgte mit dem Phosphoimager (Fuji Bas 1800II®). Neben der Autoradiographie der getrockneten Acrylamidgele wurden mit Hilfe des Phosphoimagers auch quantitative Daten gewonnen. Die entsprechende Auswertung wurde mit der Software AIDA® (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) ausgeführt. Dabei wurde der Tatsache Rechnung getragen, dass das für den alternativ gespleißten Rezeptor charakteristische Hybridisierungsprodukt aufgrund seiner Größe mehr Radioaktivität enthält als das Wildtyp-Produkt. Dies wurde nach Analyse der Sequenz (eingebautes radioaktives CTP) durch Multiplikation der für das Wildtyp-Hybridisierungsprodukt gefundenen Intensität mit dem Faktor 1.278 korrigiert.

## **4. Material und Methoden**

---

### **4.6. BrdU Proliferationsassay**

Für diese Versuche wurde ein Reaktionskit der Firma Roche® (Cell Proliferation ELISA, BrdU) verwendet. Nachfolgend sind die Prinzipien der Versuchsdurchführung beschrieben, die genauen Bedingungen sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

Die zu untersuchenden Zellen ( $1.5 \times 10^4$  Zellen/100 $\mu$ l) wurden in Anwesenheit verschiedener Wachstumsfaktoren in 96-well Mikrotiterplatten für 24 Stunden kultiviert. Nachfolgend wurde das BrdU-Reagenz für weitere 2 Stunden zu den Zellen gegeben. BrdU ist ein an Brom gekoppeltes Pyrimidinnukleotid, welches während der DNA-Synthese anstelle von Thymidin eingebaut wird und damit in zunehmender Konzentration in proliferierenden Zellen nachweisbar ist. Nach circa 2 Stunden wurden die Mikrotiterplatten zentrifugiert (300 x g, 5 min.), das Medium entfernt und die Zellen bei 60°C für 1h getrocknet und nachfolgend mit einem im Kit enthaltenen Reagenz fixiert. Anschließend wurde ein Peroxidase-gekoppelter Anti-BrdU Antikörper zu den fixierten Zellen gegeben. Nach den Waschvorgängen konnte mittels Substratreaktion und anschließender spektrometrischer Bestimmung (VICTOR3®, Perkin Elmer, Waltham, USA) bei 370 nm vergleichend die Menge an gekoppeltem Antikörper und damit eingebautem BrdU festgestellt werden.

Dieser Versuchsablauf wurde jeweils simultan mit den vier verschiedenen Zellpopulationen durchgeführt (parentale Ba/F3 und drei stabil mit EPOR-Varianten transfizierte Zellklone). Dabei wurden pro Rezeptorvariante jeweils drei Einzelklone betrachtet. Insgesamt wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt.

### **4.7. Statistische Auswertung**

Unterschiede in den Mittelwerten bei den Proliferationsversuchen wurden mittels Zweistichproben t-Test auf Signifikanz geprüft (Gosset W.S., 1908). Die Tests wurden zweiseitig ausgeführt. Die Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPadPrism® (GraphPad Software®, La Jolla, USA) durchgeführt. Der Faktor  $p$  ist dabei die Wahrscheinlichkeit der zutreffenden Nullhypothese. Unterschreitet die Wahrscheinlichkeit der zutreffenden Nullhypothese einen festgelegten Wert spricht man von statistischer Signifikanz. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt verwendet:  $p < 0,1$  (statistisch hinweisend)  $p < 0,05$  (signifikant);  $p < 0,005$  (hoch signifikant).

## 5. Ergebnisse

### 5. Ergebnisse

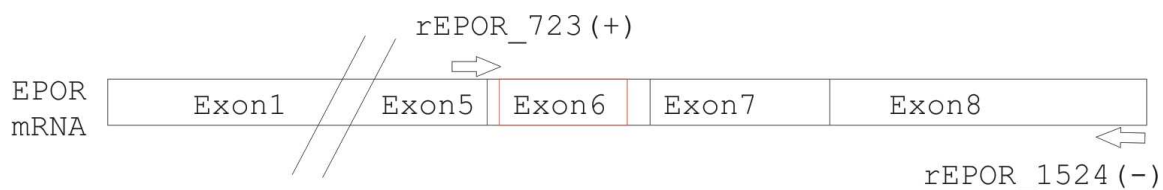
#### 5.1. Analyse der EPOR-Expression in Zellen und Geweben

##### 5.1.1. Identifikation von EPOR-Transkripten durch PCR-Analysen

##### 5.1.1.1. Nachweis der intrazellulären Domäne des EPOR in ST14A Progenitorzellen

##### 5.1.1.1.1. EPOR-Wildtyp (EPOR-WT) in ST14A Zellen

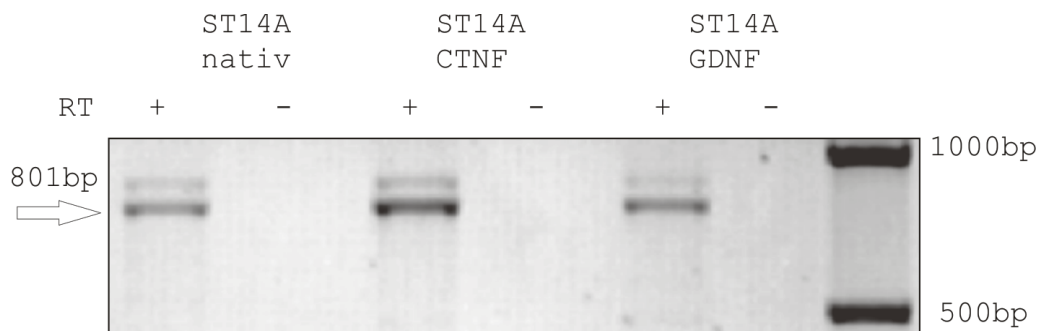
Zwei unabhängige RNA-Präparationen aus ST14A-Zellen wurden mit Oligo-dT Primern in cDNA umgeschrieben und in nachfolgenden PCR-Reaktionen als Template eingesetzt. Für den Nachweis der intrazellulären Domäne des EPOR wurden die Primer rEPOR\_723(+) für den Positivstrang und rEPOR\_1524(-) für den Negativstrang verwendet. Der Upstream Primer wurde um DNA Kontaminationen auszuschließen überlappend in Exon 5 und Exon 6 des EPOR-gens platziert. Der 3'-Primer befand sich am Ende des Gens abschließend mit dem Stop-Codon (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des rEPOR Transkriptes mit Position der Primer**

**rEPOR\_723(+)** und **rEPOR\_1524(-)** Transmembrandomäne rot markiert

Das zu erwartende PCR-Produkt hatte somit eine Länge von 801 Basen und war in nativen ST14A Zellen und in Subklonen der ST14A Zellen mit Überexpression der neurotrophen Faktoren CTNF und GDNF deutlich nachweisbar (Abbildung 5).

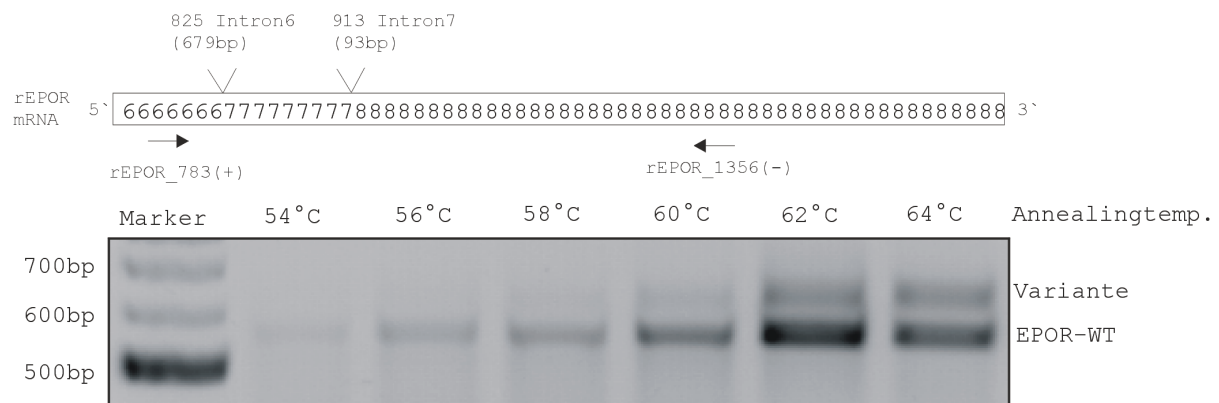


**Abbildung 5: EPOR WT Transkripte in ST14A Zellen**

## 5. Ergebnisse

### 5.1.1.1.2. Nachweis einer alternativen Spleißvariante

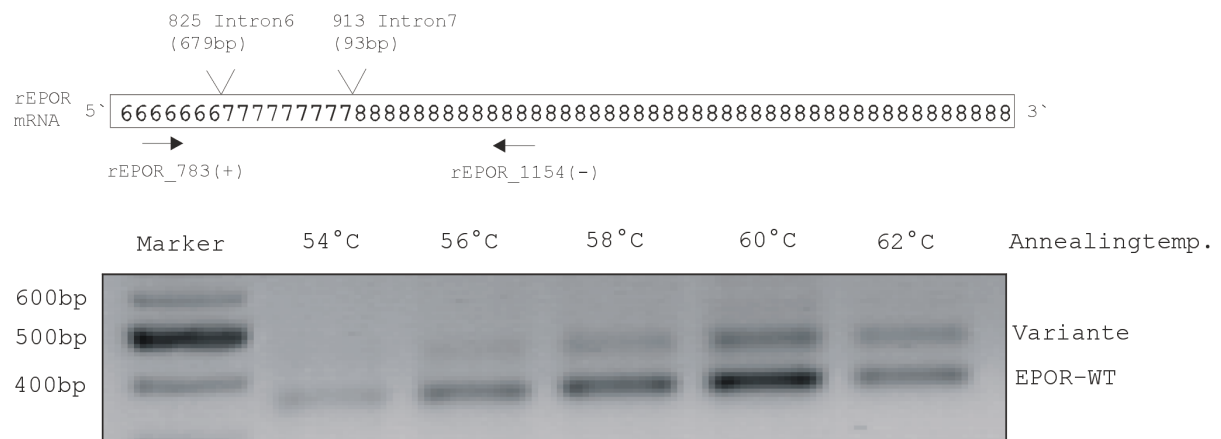
Da bei dem Nachweis des EPOR-WT in ST14A Zellen reproduzierbar eine weitere Bande in der Elektrophorese auffiel, erfolgten PCR-Reaktionen zur Identifikation dieses Produktes. Eine systematische Analyse mit verschiedenen Primerkombinationen zeigte alternative Produkte, die jeweils um ca. 100 bp größer als das Wildtyp-Produkt waren. In Abbildung 6, 7, 8 sind mehrere Beispiele für entsprechende Experimente dargestellt. Bei allen Versuchen wurde ein Gradient der Annealingtemperatur eingesetzt, um die Spezifität der Reaktionen abzuschätzen. Weiterhin wurde versucht Primer zu wählen, die mehr als ein Intron „überspannten“, um eine zusätzliche Kontrolle von DNA-Kontaminationen der Proben zu gewährleisten. Genomische DNA Überreste hätten dementsprechend zu deutlich vergrößerten PCR-Produkten geführt.



**Abbildung 6: EPOR-spezifische Amplifikationsprodukte aus ST14A cDNA bei verschiedenen Annealingtemperaturen [Primer rEPOR\_783(+) und rEPOR\_1356(-)]**

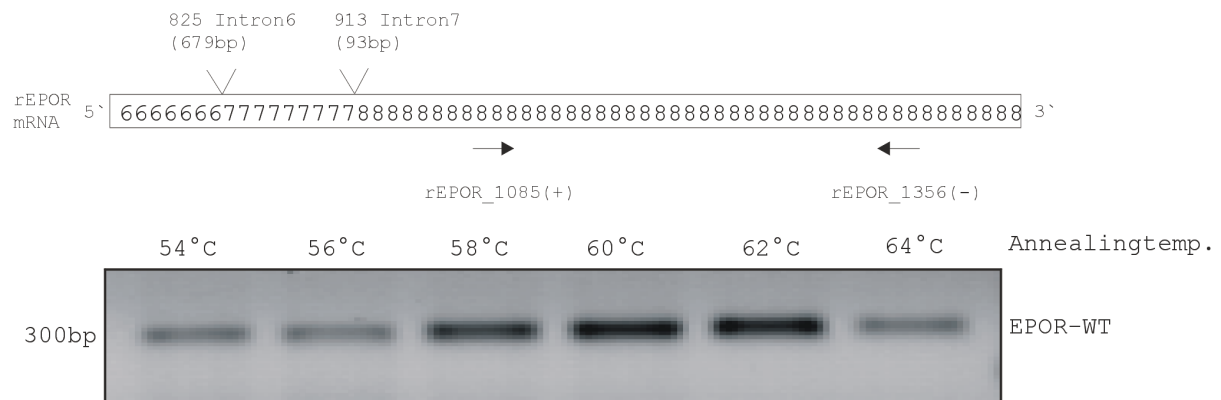
Neben dem erwarteten WT-spezifischen PCR-Produkt (ca. 600 bp) amplifizieren die in den Exons 6 und 8 lokalisierten Primer zusätzlich ein größeres Produkt.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 7: EPOR-spezifische Amplifikationsprodukte aus ST14A cDNA bei verschiedenen Annealingtemperaturen [Primer rEPOR\_783(+) und rEPOR\_1154(-)]**

Neben dem erwarteten WT-spezifischen PCR-Produkt (ca. 400 bp) amplifizieren die in den Exons 6 und 8 lokalisierten Primer zusätzlich ein größeres Produkt.



**Abbildung 8: EPOR-spezifische Amplifikationsprodukte aus ST14A cDNA bei verschiedenen Annealingtemperaturen [Primer rEPOR\_1085(+) und rEPOR\_1356(-)]**

Neben dem erwarteten WT-spezifischen PCR-Produkt (ca. 300 bp) amplifizieren die im Exon 8 lokalisierten Primer kein zusätzliches Produkt.

Aufgrund dieser Daten wurde eine alternative Spleißform postuliert, in der Intron Nr.7 im Transkript verbleibt. Primer, welche flankierend zum 7. Intron lagen, amplifizierten ein 100 bp größeres Fragment, wohingegen Primer, die das Intron nicht flankierten, ein Fragment normaler Größe produzierten. Mehrfache Sequenzierungen der beschriebenen alternativen Produkte bestätigten die oben genannte Vermutung. Um die Existenz des alternativen Transkriptes und die quantitativen Verhältnisse zwischen alternativem und Wildtyp-Transkript zu klären, wurden RNase Protection Assays durchgeführt (siehe Kapitel 5.1.2.2.).

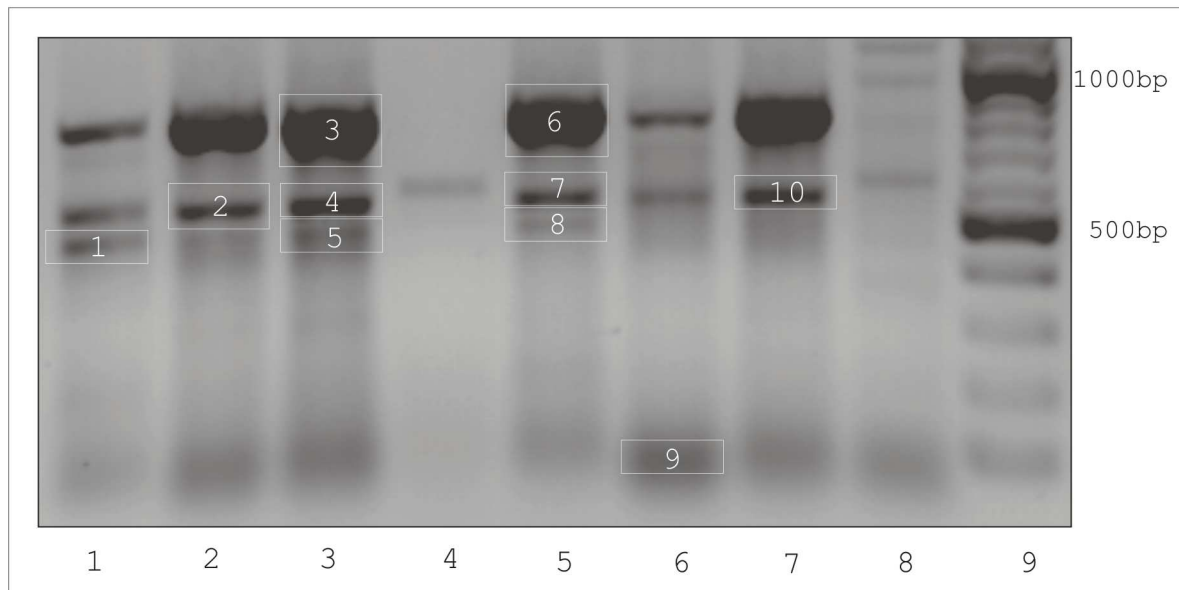
## 5. Ergebnisse

---

### **5.1.1.1.3. Suche nach verkürzten mRNA Transkripten**

Nachdem der Wildtyprezeptor amplifiziert und eine alternative Spleißform nachgewiesen werden konnte, wurde versucht, durch Erhöhung der Anzahl der PCR-Reaktionszyklen auf 40 und Absenkung der Annealingtemperatur auf 57°C (restliche Bedingungen nach Standard) in den nativen ST14A Zellen zusätzlich verkürzte alternative EPOR Transkripte nachzuweisen. Als Ausgangsprimer wurden wiederum rEPOR\_723(+) und rEPOR\_1524(-) verwendet. Für diese cDNA-Amplifikation wurde statt der herkömmlichen Taq-Polymerase (Quiagen®) die PfuTurbo®-Hotstart Polymerase (Agilent Technologies®, Böblingen, Deutschland) verwendet. Dieses Enzym besitzt im Vergleich zur Taq- Polymerase eine 3'-5' Exonukleaseaktivität wodurch die Fehlerwahrscheinlichkeit auf 1,6 pro 10<sup>6</sup> Nukleotide und damit auf ein Sechstel reduziert wird. Mögliche Punktmutationen können so sicherer detektiert werden und die Wahrscheinlichkeit polymerasebedingter Artefakte in der Basenfolge sinkt. Die Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe der Ethidiumbromidgelelektrophorese aufgetrennt und im UV-Licht sichtbar gemacht (Abbildung 9). Aus der Reaktion resultierten reproduzierbar mehrere verschieden große PCR Produkte. Die Banden 3 und 6 entsprechen der erwarteten Größe des Wildtyprezeptors von ca.800bp. (Die Rezeptorvariante mit verbleibendem 7. Intron ist aufgrund der Signalintensität nicht vom Wildtyp zu trennen.) Die weiteren in der Abbildung gekennzeichneten Produkte (Nr. 2,4,7 und 10 mit ca.550 bp; Nr. 1,5 und 8 mit ca.500 bp) wurden eluiert, in den Vektor pCR® 2.1 TOPO® ligiert und in kompetente E.coli transformiert.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 9: PCR Ergebnisse der ST14A cDNA mit den Primer rEPOR\_723(+) und rEPOR\_1524(-)**

Bahn 1-3: PCR Ergebnis der cDNA aus Probenansatz1, Bahn 5-7: PCR Ergebnis der cDNA aus Probenansatz2, Bahn 4, 8: Kontrollansätze ohne cDNA, Bahn 9: Bandenmarker (2Log Ladder NEB®)

Rekombinante Klone wurden in Flüssigkulturen kultiviert, die jeweilige Plasmid-DNA isoliert und anschließend sequenziert. Die dem Wildtyp des Rezeptors entsprechenden PCR-Produkte waren der Sequenz des publizierten EPO-Rezeptors völlig identisch. Der überwiegende Teil der anderen PCR-Produkte zeigte keine Homologie zur EPO-Rezeptor-Sequenz (Produkte 1,4,5,7,9,10). Die Sequenz des PCR-Produkts 2 entsprach der EPOR-Wildtypsequenz, wies jedoch eine Deletion von 313 bp und damit eine Größe von ca. 500 bp auf. Eine ähnliche Deletion konnte bei PCR-Produkt 8 festgestellt werden. Hier lag eine Verkürzung von 327 bp vor. Darüber hinaus wiesen beide Transkriptvarianten keine weiteren Veränderungen der Basensequenz im Vergleich zum Wildtyp auf. Nachfolgende Versuche, diese verkürzten Varianten mithilfe weiterer PCR Ansätze und anschließender Sequenzbestimmungen nachzuweisen, blieben ohne bestätigendes Resultat. Als mögliche Erklärung für die Detektion dieser verkürzten Varianten fiel in der Analyse kurz vor und kurz nach der Deletion eine Sequenzhomologie von 6 Basenpaaren auf, welche vermutlich bei der gewählten niedrigen Annealingtemperatur zur Bildung einer Haarnadelstruktur der DNA-Matrize führte und damit die Produktion des verkürzten DNA-Fragments bewirkte.



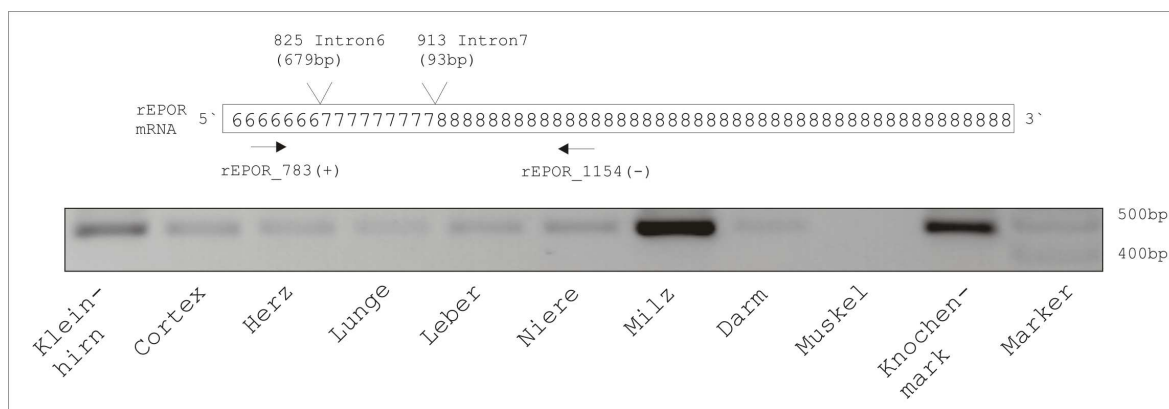
## 5. Ergebnisse

### **5.1.1.2. Identifikation der intrazellulären Domäne des EPOR in primären Rattengeweben**

Kulturen permanenter Zelllinien sind für viele Fragestellungen eine ideale Basis, besitzen aber den Nachteil, dass zur Immortalisierung genetische Veränderungen notwendig sind und damit Abweichungen von den *in vivo* vorkommenden Zellen entstehen. Aus diesem Grund war es sinnvoll, die Ergebnisse aus den Versuchen mit ST14A Zellen an primären Rattenzellen zu verifizieren und damit deren biologische Relevanz zu bestätigen. Dazu wurden Gewebe aus adulten Inzuchtratten (Wistar) verwendet.

#### **5.1.1.2.1. Nachweis des EPOR-WT in diversen Geweben**

Nach Gewinnung der Gewebe, RNA-Isolierung und anschließender cDNA Synthese wurden PCR-Versuche mit den Primern rEPOR\_783(+) und rEPOR\_1154(-) durchgeführt. Im Ergebnis konnte die intrazelluläre Domäne des EPOR-Wildtyps in Proben aus dem Cortex cerebri, Kleinhirn, Lunge, Herz, Leber, Niere, Milz, und Knochenmark nachgewiesen werden, wobei in der Expressionsstärke, wie aus Abbildung 10 zu erkennen, deutliche Unterschiede bestanden. In den Gewebeproben aus Darm und Skelettmuskulatur konnte unter den Bedingungen der Standard Taq-PCR mit 42 Reaktionszyklen und 66°C Annealingtemperatur der EPOR-Wildtyp nicht oder nur sehr schwach nachgewiesen werden.



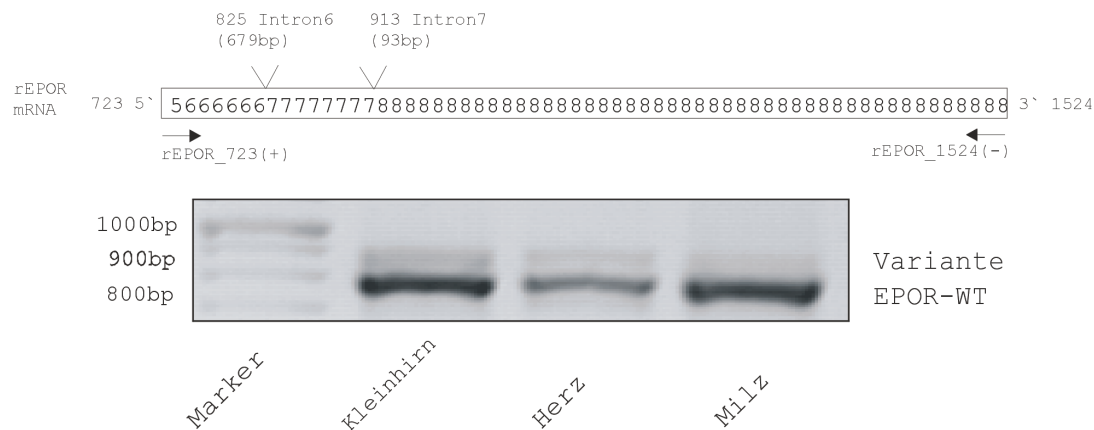
**Abbildung 10: EPOR-spezifische Amplifikationsprodukte aus verschiedenen primären Rattengeweben [Primer rEPOR\_783(+) und rEPOR\_1154(-)]**

#### **5.1.1.2.2. Nachweis alternativer Transkripte in Primärzellen**

Die im Folgenden beschriebenen Experimente dienen dem Ziel, alternative Transkripte auch in primären Zellen nachzuweisen und damit weitere Hinweise auf deren biologische Relevanz zu finden. Dazu wurde die gewonnene cDNA unter den gleichen Reaktionsbedingungen einer

## 5. Ergebnisse

PCR unterzogen wie bei den Experimenten mit den ST14A Zellen. Die entsprechenden Reaktionsprodukte sind in Abbildung 11 dargestellt. Offensichtlich existiert in Primärzellen verschiedener Quellen ebenso wie in ST14A-Zellen ein alternatives Transkript mit variabler gewebespezifischer Expression.



**Abbildung 11: EPOR-spezifische Amplifikationsprodukte aus verschiedenen primären Rattengeweben [Primer rEPOR\_723(-) und rEPOR\_1524(+)]**

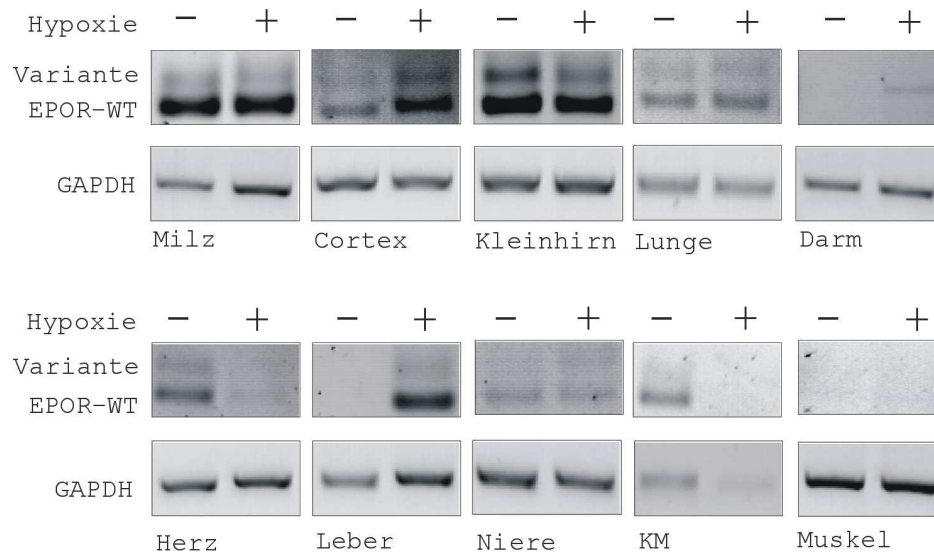
Neben dem erwarteten WT-spezifischen PCR-Produkt (ca. 800 bp) amplifizieren die in Exons 5/6 und 8 lokalisierten Primer ein zusätzliches Produkt.

### 5.1.1.2.3. Vergleich der Expression des EPOR *in vivo* bei Normoxie und Hypoxie

Durch eine intraperitoneale Phenylhydrazinbehandlung wurden Ratten künstlich in einen Zustand der hämolytischen Anämie versetzt und ihre Organe dadurch einem akuten Sauerstoffmangel unterzogen, als Kontrollen dienten unbehandelte Ratten. Die Blutbildparameter der Ratten *intra vitam* kurz vor der Probengewinnung stellt Tabelle 1 (Material und Methoden) dar. Mit den Primern rEPOR\_723(+) und rEPOR\_1524(-) wurde wie in den Vorversuchen die Expression des rEPOR-WT und des alternativen rEPOR untersucht. Dabei wurden identische cDNA-Mengen eingesetzt und zur Kontrolle auch die cDNA des „house keeping“ Gens GAPDH amplifiziert. In den verschiedenen Geweben zeigten sich deutliche Expressionsveränderungen der rEPOR. Die Proben aus dem Cortex cerebri, Darm und Leber zeigten eine Zunahme der rEPOR mRNA, in Herz, Knochenmark und Kleinhirn war eine Abnahme zu verzeichnen, Lunge, Niere und Milz erbrachten keine wesentliche Veränderung. Abbildung 12 stellt diese Ergebnisse dar. Zur Verifizierung und besseren quantitativen Beurteilung der Expressionsveränderungen wurde zu diesem Versuch ebenfalls ein RNase Protection Assay durchgeführt (siehe Kap. 5.1.2.3).

## 5. Ergebnisse

---

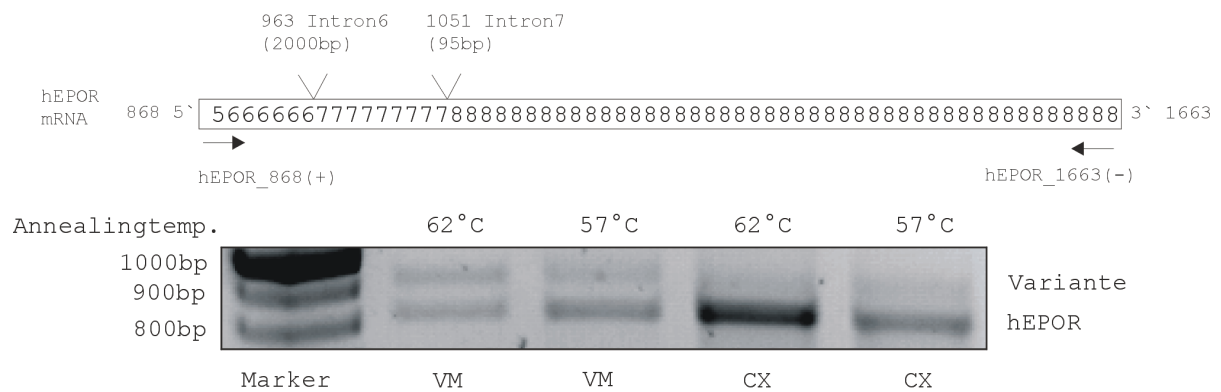


**Abbildung 12: EPOR-spezifische Amplifikationsprodukte aus verschiedenen primären Rattengeweben [Primer rEPOR\_723(-) und rEPOR\_1524(+)], vergleichende Darstellung von hypoxischen und normoxischen Geweben**

### 5.1.1.3. Nachweis von EPOR-Transkripten in murinen und humanen Zellen

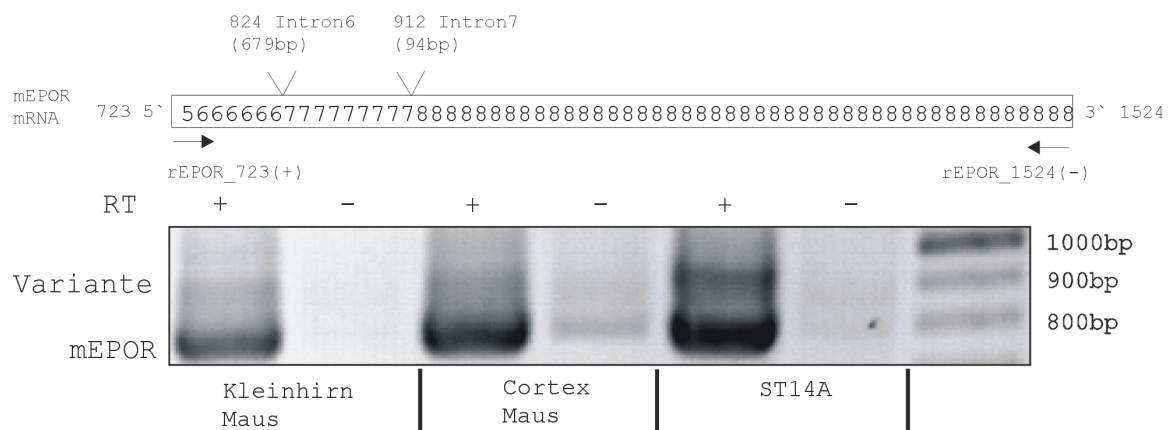
Nachdem die intrazelluläre Sequenz des EPOR und einer alternativen Variante in ST14A Zellen und in diversen Rattengeweben nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob dieses Phänomen auch bei anderen Spezies auftritt. Für die Gewinnung muriner RNA standen primäre Zellen aus dem Großhirn und Kleinhirn der adulten Maus zu Verfügung. Um die Vergleichbarkeit zu den Versuchen mit den Rattenzellen zu gewährleisten, wurden ebenfalls die Primer rEPOR\_723(+) und rEPOR\_1524(-) verwendet, die bis auf zwei Basen bei rEPOR\_723(+) bzw. eine Base bei rEPOR\_1524(-) homolog zur murinen Sequenz sind. Als Zellmodell für humane neuronale Zellen wurden die Zellen CX und VM für die Experimente verwendet. Analog zu den Untersuchungen an Rattenzellen wurden spezifische Primer entwickelt, wobei der upstream-Primer die Exon5/Exon6 Grenze überspannte und der downstream-Primer mit dem Stopcodon endete. Diese Primer wurden hEPOR\_884(+) bzw. hEPOR\_1663(-) benannt. Die entsprechenden PCR Ergebnisse sind in Abbildung 13 und Abbildung 14 dargestellt und zeigen, dass in beiden Spezies alternative Transkripte nachweisbar sind.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 13: EPOR-spezifische Amplifikationsprodukte aus humanen neuronalen Kulturzellen CX und VM cDNA bei verschiedenen Annealingtemperaturen [Primer hEPOR\_868(+) u. hEPOR\_1663(-)]**

Neben dem erwarteten WT-spezifischen PCR-Produkt amplifizieren die in Exons 5/6 und 8 lokalisierten Primer ein zusätzliches Produkt.



**Abbildung 14: EPOR-spezifische Amplifikationsprodukte aus primären murinen Zellen und ST14A [Primer rEPOR\_723(+) u. rEPOR\_1524(-)]**

Neben dem erwarteten WT-spezifischen PCR-Produkt amplifizieren die in Exons 5/6 und 8 lokalisierten Primer ein zusätzliches Produkt.

### 5.1.2. Identifikation von EPOR-Transkripten mittels RPA

Für einen direkten Nachweis der beiden EPOR-Transkripte in der RNA-Population und die Aufklärung der quantitativen Verhältnisse bietet der RNase Protection Assay gute Voraussetzungen. Durch den Einsatz spezifischer RNA-Hybridisierungs sonden können hierbei mit hoher Sensitivität Transkripte direkt quantifiziert werden.

## 5. Ergebnisse

---

### **5.1.2.1. Prinzip der Durchführung des RPA zur Quantifizierung von EPOR-Transkripten**

Aus genomischer DNA der Ratte (ST14A) wurde nach Amplifikation und Restriktionsspaltung ein DNA-Fragment gewonnen, welches zu 88 Basen aus Intron 7 und zu 208 Basen aus Exon 8 des EPOR bestand. Nach Ligation dieses Fragmentes in einen Vektor entstand durch *in vitro* Transkription mit gleichzeitiger radioaktiver Markierung eine antisense-RNA Sonde aus 296 Basen des EPOR Genoms mit 69 zusätzlichen Basen des Vektors. Diese zusätzlichen Basen wurden später zur Kontrolle der RNase Verdauung genutzt.

Die Sonde sollte bei Hybridisierung mit der Gesamt-RNA Komplexe mit zwei verschiedenen Bindungspartnern liefern, zum einen die EPOR-WT mRNA mit 208 passenden Basen und darüber hinaus mit dem alternativen Transkript (296 komplementäre Basen). Nach einer RNase Behandlung (Abbau einzelsträngiger RNA) verbleiben geschützte (doppelsträngige) Bereiche, die für die entsprechenden Transkripte charakteristisch sind.

Aus diesen Überlegungen folgt, dass nach der RNase Behandlung und der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung und Darstellung der radioaktiven Banden zwei unverdaute Reaktionsprodukte zu erwarten sind, zum einen ein 208 bp großes Produkt für den EPOR-WT und ein 296 bp großes Produkt für die Spleißvariante mit verbleibendem 7. Intron. Die gesamte Sonde müsste des Weiteren ohne RNase-Behandlung nur eine 365 bp große Bande liefern. Abbildung 15 stellt die Lage der Sonde und die resultierenden Hybridisierungsmöglichkeiten dar. Zur Kontrolle des Versuchsverlaufs wurde darüber hinaus eine  $\beta$ -Aktin Sonde verwendet, welche unverdaut, d.h. ohne RNase Behandlung, eine Größe von 255 bp und nach Hybridisierung und RNase Behandlung eine Größe von 228 bp aufwies.

## 5. Ergebnisse

---

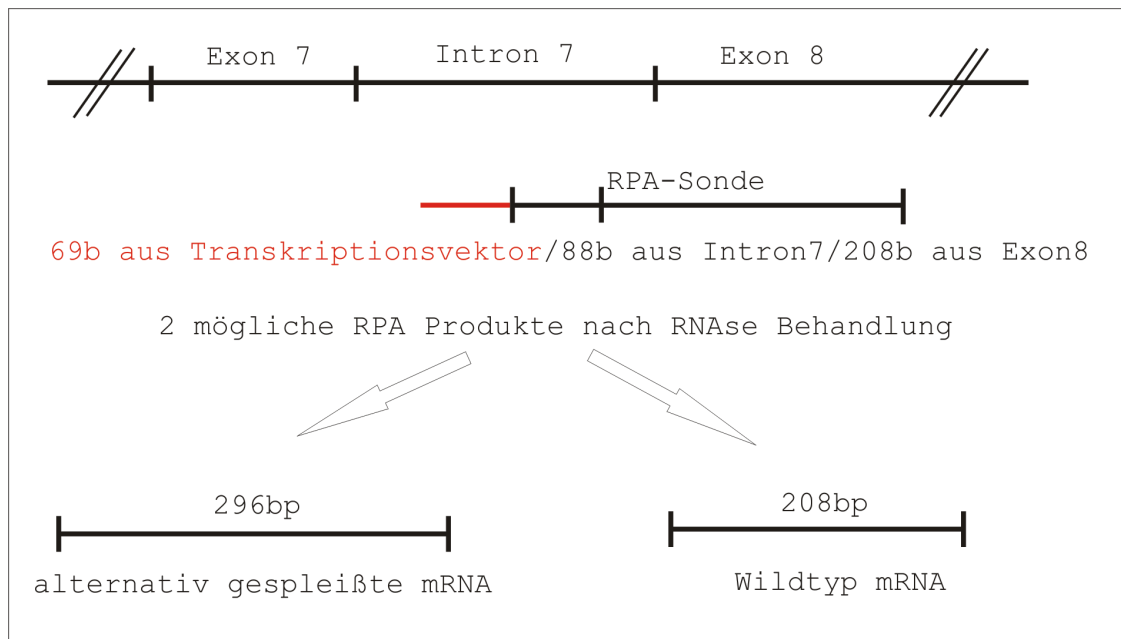


Abbildung 15: Prinzip des Nachweises der alternativen Spleißform des EPOR mittels RPA

### 5.1.2.2. Nachweis des EPOR-WT und Bestätigung der alternativen Spleißvariante

Zunächst wurden Experimente durchgeführt, die zur Überprüfung der oben beschriebenen theoretischen Erwartungen dienen. In Abbildung 16 sind zusammenfassend die eingesetzten RPA-Sonden und entsprechende Hybridisierungsprodukte gezeigt. Neben dem erwarteten EPOR-Transkript ist nach Hybridisierung mit RNA aus ST14A-Zellen ebenso ein größeres unverdautes Fragment sichtbar. Die zur Kontrolle des Systems zusätzlich verwendete  $\beta$ -Aktin-Sonde erbrachte nach der RNase-Behandlung das dargestellte geschützte Fragment. Hybridisierungen, in denen statt der ST14A-RNA Hefe-RNA zum Einsatz kam, zeigen keine geschützten EPOR-Sequenzen, das System produziert also keine unspezifischen Produkte.

## 5. Ergebnisse

---

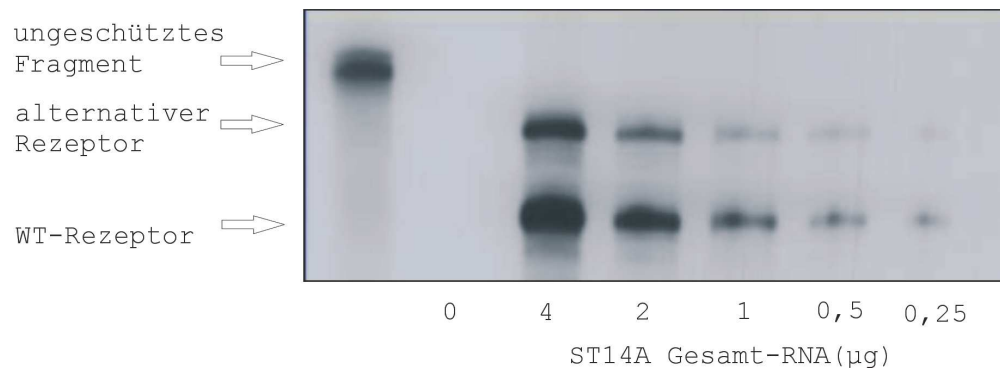


**Abbildung 16: Ribonuklease-Protektion-Assay**

Darstellung der RPA-Sonden und entsprechende Hybridisierungsprodukte des EPOR und  $\beta$ -Aktin

Für die Ermittlung der Nachweisgrenze wurden der RPA mit unterschiedlichen Mengen (250 ng- 4  $\mu$ g) Gesamt-RNA aus ST14A-Zellen durchgeführt. Auch bei nur 250 ng RNA können bei relativ kurzer autoradiographischer Exposition (16 Stunden) noch Transkripte gezeigt werden (Abbildung 17). Für weitere Experimente wurden jeweils 2  $\mu$ g der aus Geweben isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Dazu wurde Ratten simultan Gewebe entnommen und Gesamt-RNA präpariert.

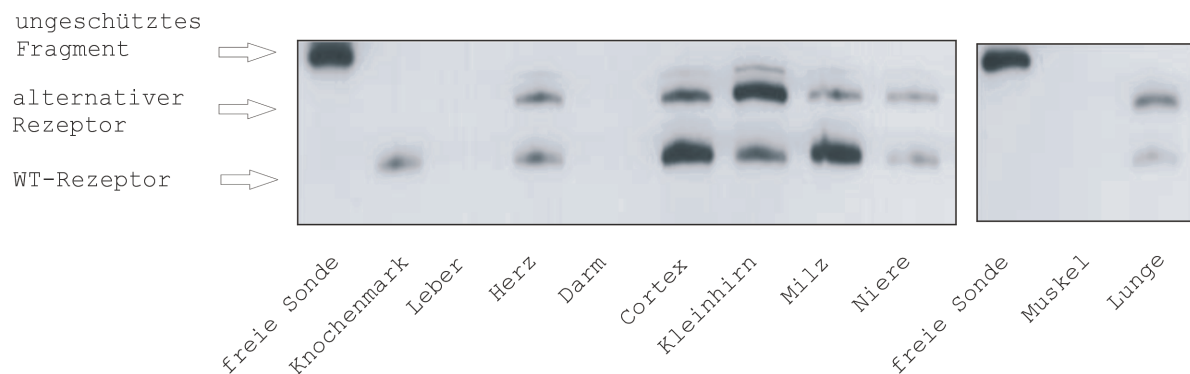
## 5. Ergebnisse



**Abbildung 17: Nachweisgrenzen für EPOR-Transkripte**

in Gesamt-RNA Verhältnis WT zu alternativem Rezeptor 2,36:1

EPOR-Transkripte konnten, abgesehen vom Skelettmuskel, der Leber und dem Darm, in allen anderen Geweben nachgewiesen werden (Abbildung 18). Das quantitative Verhältnis der beiden Transkripte zueinander ist in den Geweben jedoch sehr verschieden. Während im Kleinhirn und in der Lunge besonders das alternativ gespleißte Produkt dominiert, finden sich in anderen Geweben etwa identische (Niere, Herz) oder deutlich höhere Mengen des Wildtyprezeptors (Milz, Knochenmark, Cortex cerebri).



**Abbildung 18: Nachweis von EPOR-Transkripten in Geweben der Ratte durch RPA**

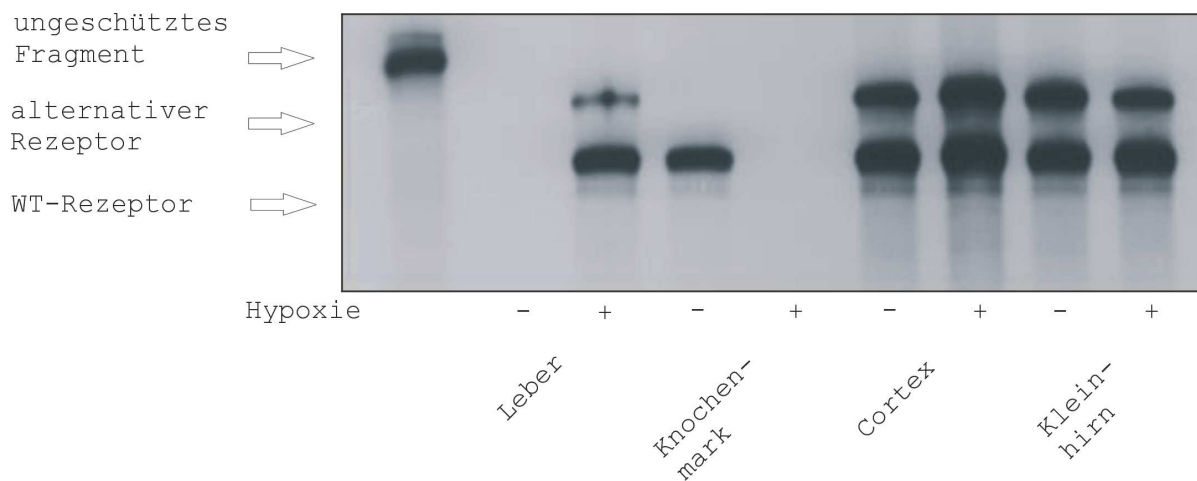
Ratio WT-Rezeptor zu alternat. Rezeptor wie folgt: Knochenmark 1:0; Herz: 1:0,82; Cortex: 1: 0,21; Kleinhirn: 1:2,74; Milz 1: 0,13; Niere: 1:1,09; Lunge 1:2,43

### 5.1.2.3. Vergleich der Expression des EPOR *in vivo* bei Normoxie und Hypoxie

Um mögliche Veränderungen in Verhältnis der EPOR-Transkripte bzw. ihrer Expression bei hypoxischen Bedingungen zu untersuchen wurde durch Behandlung mit Phenylhydrazin eine Anämie induziert. In den Abbildungen 19 und 20 sind für eine Reihe von Rattengeweben die Verhältnisse unter normoxischen Bedingungen denen bei Hypoxie gegenübergestellt.

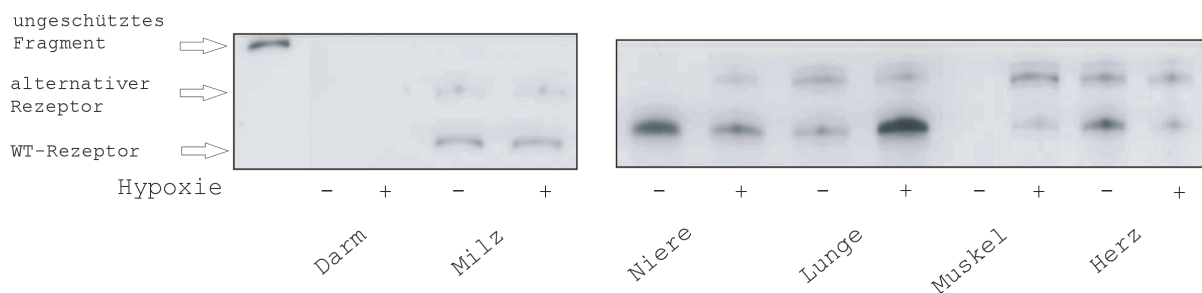


## 5. Ergebnisse



**Abbildung 19: EPOR-Transkripte in Geweben der Ratte- Einfluss phenylhydrazininduzierter Anämie**

Nachweis von EPOR-Transkripten durch RPA in normoxischen/hypoxischen Rattengeweben; folgende Verhältnisse WT:alternat.Rez. wurden gemessen: Leber+ (1: 0,14), Knochenmark-(1:0), Cortex-( 1:0,54), Cortex+(1:0,62), Kleinhirn-(1:0,78), Kleinhirn+(1:0,48)



**Abbildung 20: EPOR-Transkripte in Geweben der Ratte- Einfluss phenylhydrazininduzierter Anämie**

Nachweis von EPOR-Transkripten durch RPA in normoxischen/hypoxischen Rattengeweben; folgende Verhältnisse WT:alternat.Rez. wurden gemessen: Milz-(1:0,29, Milz+(1:0,22) Niere-(1:0), Niere+(1:0,29), Lunge-(1:0,83), Lunge+(1:0,12), Muskel +(1:2,41), Herz-(1:0,39),Herz+(1:1,52),

Die Daten zeigen, dass hypoxische Verhältnisse die Expression des EPOR maßgeblich beeinflussen. In zwei Geweben, in Leber und dem Skelettmuskel wird der EPOR offensichtlich erst unter hypoxischen Bedingungen induziert. Dabei dominiert im Muskel das alternativ gespleißte Transkript. Im Darm ist auch bei Phenylhydrazinbehandlung kein Transkript nachweisbar. Im Knochenmark ist bei hypoxischen Tieren kein EPOR mehr detektierbar. Leichte Verschiebungen im Verhältnis der beiden Transkripte zueinander sind in Niere, Herz und Cortex (Zunahme alternatives Transkript), sowie in der Lunge und im Kleinhirn (Abnahme alternatives Transkript) zu finden. Diese Versuchsergebnisse bestätigen

## 5. Ergebnisse

die Daten aus den vorher durchgeführten Untersuchungen mit der PCR-Methode. Tabelle 9 stellt nocheinmal zusammenfassend die EPOR-Expression sowie die Induktion/Inhibition bei Hypoxie dar.

| Gewebe/Rezeptor |           | PCR      |         | RPA      |         |
|-----------------|-----------|----------|---------|----------|---------|
|                 |           | Normoxie | Hypoxie | Normoxie | Hypoxie |
| Herz            | WT        | +        | ↓       | +        | ↓       |
|                 | +Intron 7 | +        | ↓       | +        | ↓       |
| Niere           | WT        | +        | ↑       | +        | ↓       |
|                 | +Intron 7 | +        | ↑       | -        | ↑       |
| Kleinhirn       | WT        | +        | ↓       | +        | ↓       |
|                 | +Intron 7 | +        | ↓       | +        | ↓       |
| Cortex          | WT        | +        | ↑       | +        | ↑       |
|                 | +Intron 7 | +        | ↑       | +        | ↑       |
| Milz            | WT        | +        | ↓       | +        | ↓       |
|                 | +Intron 7 | +        | ↓       | +        | ↓       |
| Leber           | WT        | -        | ↑       | -        | ↑       |
|                 | +Intron 7 | -        | ↑       | -        | ↑       |
| Darm            | WT        | -        | ↑       | -        | -       |
|                 | +Intron 7 | -        | -       | -        | -       |
| Muskel          | WT        | -        | -       | -        | -       |
|                 | +Intron 7 | -        | -       | -        | ↑       |
| Knochenmark     | WT        | +        | -       | +        | -       |
|                 | +Intron 7 | -        | -       | -        | -       |
| Lunge           | WT        | +        | ↑       | +        | ↑       |
|                 | +Intron 7 | +        | ↑       | +        | ↑       |

**Tabelle 9: Zusammenfassung Ergebnisse RPA und RT-PCR aus primären Rattengeweben**

+ = nachweisbar, - = nicht nachweisbar, ↑ = Induktion, ↓ = Inhibition

### 5.1.3. Sequenzanalyse der PCR-Produkte

Die Primer rEPOR\_723(+) und rEPOR\_1524(-) flankieren beim Wildtyp des EPOR einen Sequenzbereich von 801bp. Dieser Bereich codiert die carboxyterminalen 267 Aminosäuren, also Aminosäure 215 bis zur Aminosäure 482. Diese Sequenz beinhaltet 8 phosphorylierbare Tyrosinreste, welche zu kurzen Sequenzmotiven gehören, die in phosphorylierter Form mit

## 5. Ergebnisse

einer Reihe von Proteinen mit SH2 Domänen interagieren können (Pawson T. et al. 1993), und ein Tryptophan-Rest an Position 282, der für die Bindung und Aktivierung der Tyrosinkinase JAK2 verantwortlich ist. Die funktionellen Domänen sind ausnahmslos im Exon 8 des EPOR-Gens codiert. Diese Aminosäurereste vermitteln *in vivo* die biologische Funktion des EPOR. Sie befinden sich an den Positionen 343, 401, 429, 431, 443, 460, 464, 479 der Aminosäureabfolge des Rezeptors, dessen Gesamtsequenz aus 507 AS (inklusive Signalpeptid) besteht.

### **5.1.3.1. Alternativ gespleißtes Intron 7 im Speziesvergleich**

Im Vergleich der Struktur des EPOR-WT von Ratte, Mensch und Maus ist festzustellen, dass die Gesamtlänge identisch ist und die Abfolge der Aminosäuren zu ca. 80% homolog. Im Falle eines ungespleißten 7. Introns sind die Folgen für die Struktur des EPOR bei den von uns untersuchten Spezies allerdings sehr unterschiedlich. Wie Abbildung 21 darstellt, ist die Insertion der Intronsequenz in die mRNA zwar im Leserahmen, jedoch weicht in Folge deutlich differierender Intronsequenzen der Spezies die resultierende AS-Sequenz und EPOR-Struktur stark ab. Bei humanen Zellen folgt ein Stop-Codon an der 24. Position des Introns, so dass ein EPOR resultiert, dem praktisch eine signalkompetente intrazelluläre Domäne fehlt. Bei der murinen Sequenz tritt das Stop-Codon bereits nach 18 aus dem Intron stammenden Aminosäuren auf und hat ebenso eine Rezeptorform ohne signaltransduktionsvermittelndes Potential zur Folge.

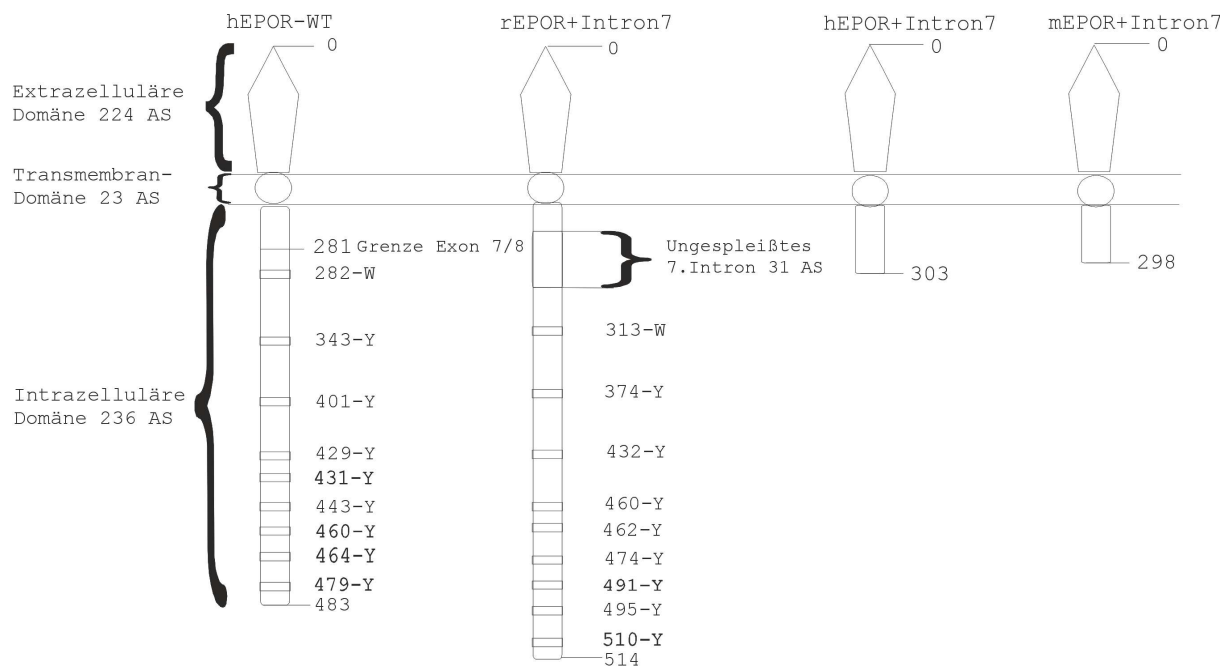
Beim Transkript der Ratte tritt im Gegensatz dazu kein Stop-Codon auf, so dass 31 Aminosäuren in die WT-Sequenz eingefügt werden und der gesamte weitere intrazelluläre Rezeptorteil unverändert erhalten bleibt (Abbildung 22).

```
Ratte   gta|ggt|aac|ctg|ttt|gtc|ttc|tct|ggt|cct|ggg|gct|gcc|tgc|tgc|cac|atg|ctg|gag|ccc|atg|cct|ctg|agc|cca|cag|gca|ttc|tct|ttc|cag|
Mensch  gta|ggt|ggc|ctg|ggt|gtc|ccc|tca|gtg|cct|ggg|ctt|ccc|tgc|ttc|ttg|cag|cca|aac|tgc|agg|cct|ctc|tga|gca|ggt|tgg|tgc|tat|ttc|ttc|ag
Maus    gta|ggt|gac|ctg|ttt|gtg|ttc|tct|att|ctg|ggg|gct|gct|gct|gcc|gct|gca|cac|tga|agg|tgc|ctc|tga|gcg|cag|gtg|ttc|ttt|ttc|cag

Ratte   V|G|N|L|F|V|F|S|V|P|G|A|A|C|C|H|M|L|E|P|M|P|S|P|Q|A|F|S|F|Q
Mensch  V|G|G|L|V|V|P|S|V|P|G|L|P|C|F|L|Q|P|N|C|R|P|L|Stop
Maus    V|G|D|L|F|V|F|S|I|L|G|A|A|A|A|A|A|H|Stop
```

**Abbildung 21: Basen- und Aminosäuresequenz von Intron 7 im Falle eines alternativen Spleißvorgangs**

## 5. Ergebnisse



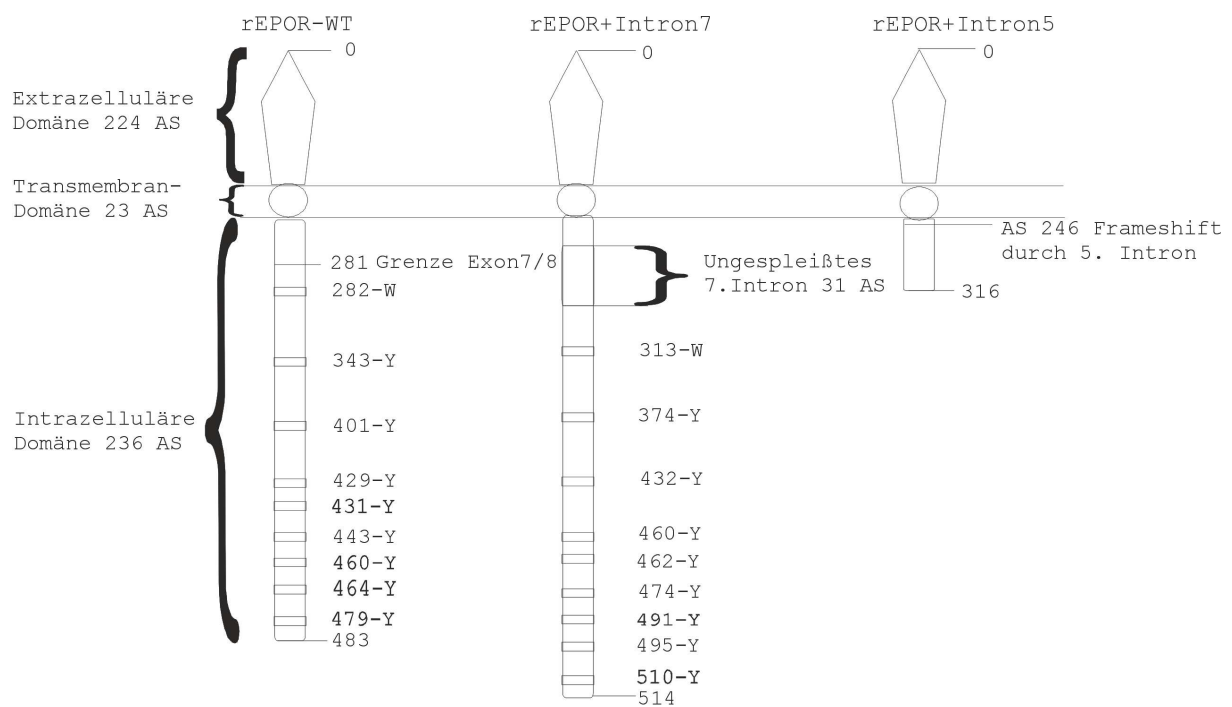
**Abbildung 22: Schematische Darstellung des EPOR-Wildtyp und dessen alternativer Spleißformen im Speziesvergleich**

### 5.1.3.2. Alternativ gespleißtes Intron 5

Bei den PCR-Versuchen zur Klonierung des rEPOR mit Intron 7 wurde auch eine EPOR Sequenz mit alternativ gespleißtem Intron 5 identifiziert. In der Literatur wurde eine solche Rezeptorform in murinen Zellen bereits beschrieben (Arcasoy M.O. et al. 2003), hier wurden auch weiterführende Untersuchungen zu dieser Form durchgeführt.

Falls Intron 5 des Ratten-EPOR alternativ gespleißt wird und in der cDNA verbleibt, kommt es bei der Translation zu einem Frameshift durch die zusätzlichen Basen. Ab Aminosäure 246 ändert sich die Abfolge der Aminosäuren, aus der Aminosäure Tryptophan (der JAK2 Bindungsstelle) wird ein Serinrest und an Stelle 316 folgt ein STOP-Codon, Abbildung 23 stellt den Rezeptor nach dieser Modifikation schematisch dar. Diesem Rezeptor fehlen alle funktionellen intrazellulären Domänen, die Transmembrandomäne bleibt erhalten. Auch diese Rezeptorvariante wurde in funktionellen Studien weiter untersucht.

## 5. Ergebnisse

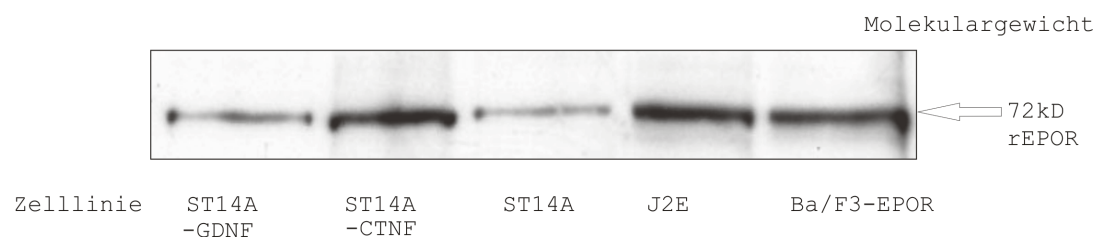


**Abbildung 23: Der Ratten-EPOR Wildtyp und zwei veränderte Formen durch alternatives Spleißen**

v.l.n.r. rEPOR-WT, rEPOR +Intron7, rEPOR +Intron5

### 5.1.4. Nachweis des EPOR-Proteins

Zur Untersuchung des EPOR in ST14A Zellen auf Proteinebene wurde in einem ersten Versuch eine vergleichende Westernblotanalyse mit J2E Zellen durchgeführt. Die J2E Zellen wurden hierbei als Positivkontrolle verwendet, da sie bekanntermaßen den EPOR exprimieren, eine weitere Positivkontrolle stellten Ba/F3 Zellen aus Vorversuchen dar, welche den EPOR stabil überexprimieren. Wie Abbildung 24 zeigt, konnte in den verschiedenen ST14A Zelllinien ein Protein nachgewiesen werden, welches das erwartete relative Molekulargewicht von 72 kD aufwies und mit den spezifischen EPOR-Antikörpern reagierte.



**Abbildung 24: Westernblot des EPOR in ST14A, J2E und Ba/F3-EPOR Zellen**

Eine dem EPOR entsprechende Bande ist in allen untersuchten Zelllinien nachweisbar. Ba/F3-EPOR ist eine stabil mit dem EPOR transfizierte Zelllinie.

## 5. Ergebnisse

### 5.2. Untersuchung der Signalübertragung des EPOR in ST14A Zellen

Um die Funktion des EPOR zu überprüfen wurden Experimente zum Nachweis EPO-induzierter Signalwege ausgeführt. Dazu wurde den ST14A Zellen das für die Proliferation essentielle FCS entzogen, um die Mitogenese der Zellen auf ein Minimum zu reduzieren. Nachfolgend wurde EPO zu den Kulturen gegeben und nach 30 Minuten eine Extraktion der Kernproteine durchgeführt.

Anschließend wurden mit Hilfe des „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSA) Transkriptionsfaktoren untersucht, die typischerweise nach EPO Stimulation Veränderungen ihrer DNA-Bindungsaktivität zeigen. Die Aktivierung dieser Faktoren ist nur bei Existenz eines intakten EPO/EPOR-Systems nachweisbar. Die Ergebnisse für die Transkriptionsfaktoren STAT-5 und AP-1 sind in Abbildung 25 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass besonders in den nativen und GDNF-überexprimierenden Zellen nach EPO-Stimulation die Signalstärke für die untersuchten Faktoren von einem niedrigen Niveau kommend stark zunimmt. Diese Daten sprechen für die Existenz eines funktionstüchtigen EPOR-Systems und einer intakten Signaltransduktion.

Transkriptionsfaktor

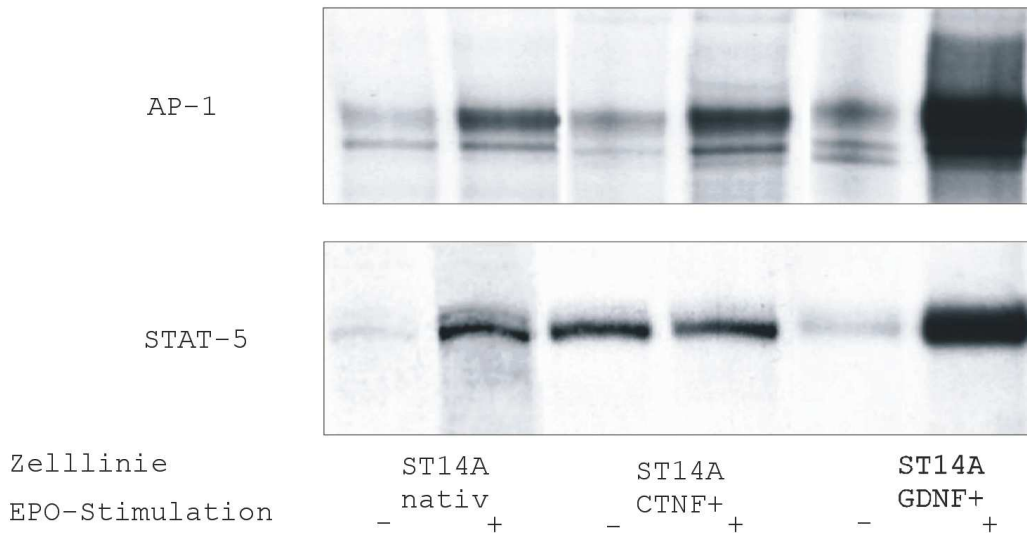


Abbildung 25: Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und STAT-5 nach EPO-Stimulation

### 5.3. EPO-Hybridrezeptor

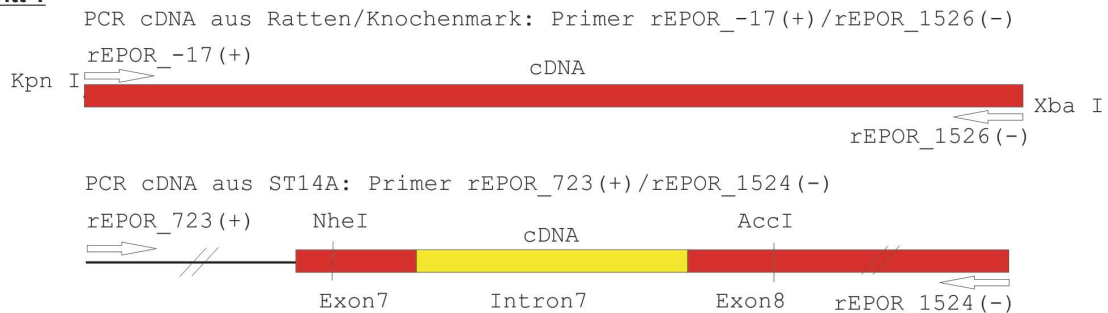
#### 5.3.1. Synthese des Hybridrezeptorgens

Im Anschluss an den Nachweis einer alternativ gespleißten Rezeptorvariante auf mRNA-Ebene sollte mittels zellulärer Überexpression die funktionelle Bedeutung dieses Rezeptors untersucht werden. Der aus der Literatur bekannte und bereits funktionell untersuchte

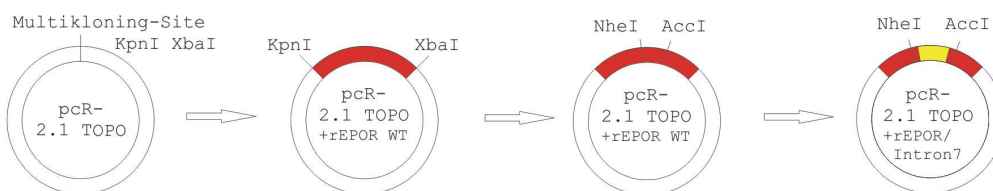
## 5. Ergebnisse

alternative Rezeptor mit verbleibendem Intron 5 wurde ebenfalls kloniert und vergleichend betrachtet. Mittels cDNA-Synthese und PCR wurden die veränderten mRNA Sequenzen amplifiziert. Nach spezifischer Restriktionsspaltung wurden diese Rezeptorteile in den WT-Rezeptor einkloniert. Danach folgte die Überführung in den Expressionsvektor pcDNA 3.1. Abbildung 26 stellt den Versuchsablauf schematisch dar.

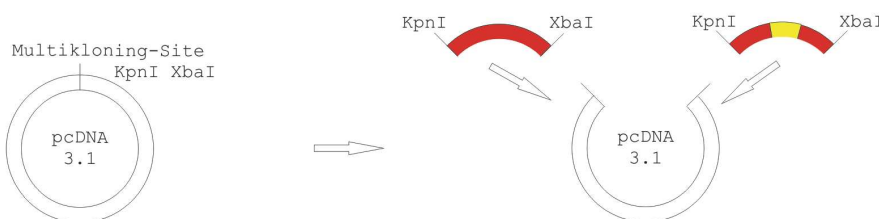
### Schritt 1



### Schritt 2



### Schritt 3

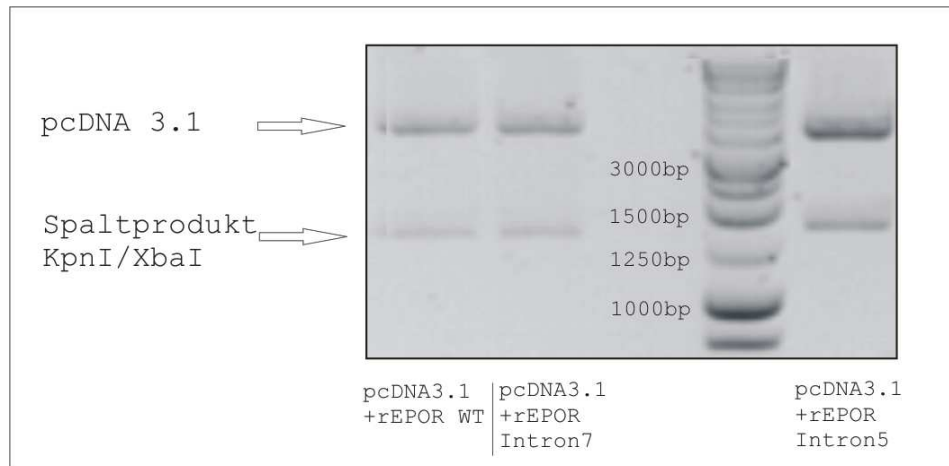


**Abbildung 26: Klonierungsstrategie zur Herstellung alternativer Rezeptoren**

**1.** Amplifikation der vollständigen cDNA Sequenz des Ratten EPO-Rezeptors mit Primern, die Restriktionsschnittstellen flankierend enthielten. Amplifikation von Intron 7. **2.** Einklonierung in pcR 2.1 TOPO. Spaltung dieses Vektors und Einfügen von Intron7 mit überhängenden Exonteilen7/8. **3.** Anschließend Umklonierung in Expressionsvektor pcDNA 3.1. Nicht dargestellt die Einklonierung von Intron5, die analog erfolgte.

Nach diesen Klonierungsreaktionen standen drei verschiedene Expressionsvektoren für weitere Versuche zur Verfügung: pcDNA 3.1 mit rEPOR-Wildtyp, rEPOR Intron5 enthaltend und rEPOR Intron7 enthaltend. Abbildung 27 zeigt eine Kontrollspaltung der genannten Vektoren.

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 27: Kontrolle der Expressionsvektoren durch Restriktionsspaltung**

Erwartete Fragmentlängen 5400bp Vektor und ca. 1500bp Insert

### 5.3.2. Überexpression des Hybridrezeptors in Ba/F3 Zellen

Die dargestellten Konstrukte wurden nach Transformation in *E. coli* präpariert und durch Dideoxysequenzierung verifiziert. Die Plasmide wurden dann mittels Elektroporation in Ba/F3 Zellen eingebracht. Nach Selektion der transfizierten Zellen durch Einsatz von G418 wurden durch Einzelzellklonierung monoklonale Kulturen hergestellt und durch RT-PCR hinsichtlich ihrer Rezeptorexpression getestet.

### 5.3.3. Nachweis verschiedener EPOR-Subtypen nach stabiler Expression in Ba/F3-Zellen mittels RT-PCR

Zur Kontrolle der stabil transfizierten Klone auf RNA- Ebene wurde aus monoklonalen Zellkulturen RNA präpariert, durch reverse Transkription in cDNA überführt und anschließend zur PCR verwendet. Die für diese Versuche verwendeten Primer [(rEPOR\_635(+)) und rEPOR\_1091(-)] hatten ihre Bindungsstellen im Bereich von Exon 5 bzw. Exon 8, so dass die Introns 5 und 7 bei Verbleib in der mRNA bzw. cDNA amplifiziert wurden. Die erwartete Länge der Amplifikate betrug 457 bp für den Wildtyp, zusätzliche 81 bp für Intron 5 bzw. 93 bp für Intron 7. Zur Kontrolle der Integrität der cDNAs wurde das „Housekeeping-Gen“ GAPDH ebenfalls durch PCR detektiert (siehe Abbildung 28).



## 5. Ergebnisse



**Abbildung 28: Amplifikation EPOR-spezifischer Sequenzen aus cDNA stabil transfizierter bzw. parentaler Ba/F3-Zellen**

Obere Reihe: Primer für rEPOR spezifisch, WT(457bp), +Intron5 (538bp), +Intron7 (550bp)

Untere Reihe: Positivkontrolle der Zellen/GAPDH Expression

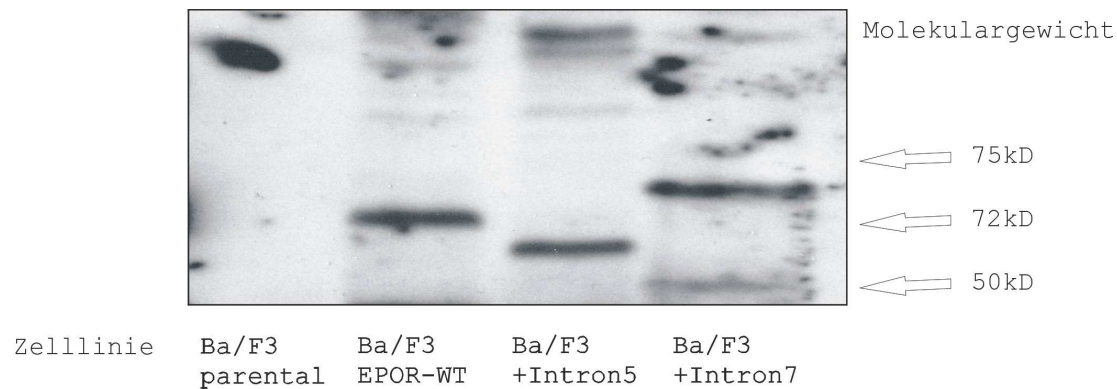
Für die transfizierten Zellen sind jeweils drei verschiedene Einzelzellklone dargestellt.

### 5.3.4. Nachweis verschiedener EPOR-Subtypen nach stabiler Expression in Ba/F3-Zellen mittels Immunoblotting

Aus stabil transfizierten Klonen wurden Zellysate hergestellt. Zum Nachweis des rEPOR wurden polyklonale Antikörper (H-194; Santa Cruz Biotechnol.) gegen die extrazelluläre Domäne des EPOR verwendet und Immunoblots hergestellt. Wie in Abbildung 29 dargestellt, konnte sowohl der WT-Rezeptor als auch beide alternativen Rezeptorformen nachgewiesen werden. Der Antikörper reagiert mit Teilen der extrazellulären Rezeptordomäne, die bei den hier überexprimierten Varianten identisch war. Beim EPOR-WT detektiert der Antikörper erwartungsgemäß ein Protein von 72 kDa. Darüber hinaus wurde bei den beiden alternativen Rezeptoren eine leichtere bzw. schwerere Bande nachgewiesen, deren Größe mit den theoretisch erwarteten Rezeptorstrukturen in Übereinstimmung steht.

## 5. Ergebnisse

---



**Abbildung 29: Westernblot der transfizierten Ba/F3 Klone**

Erwartete Molekulargewichte: rEPOR-WT bei 72kDa, verkürzter Rezeptor mit alternativ gespleißtem Intron 5 entspricht leichterem Bande, 31 AS längerer Rezeptor mit alternativ gespleißtem Intron 7 entspricht der schwereren Bande

### 5.3.5. Funktionelle Untersuchung der Rezeptorvarianten in Ba/F3 Zellen

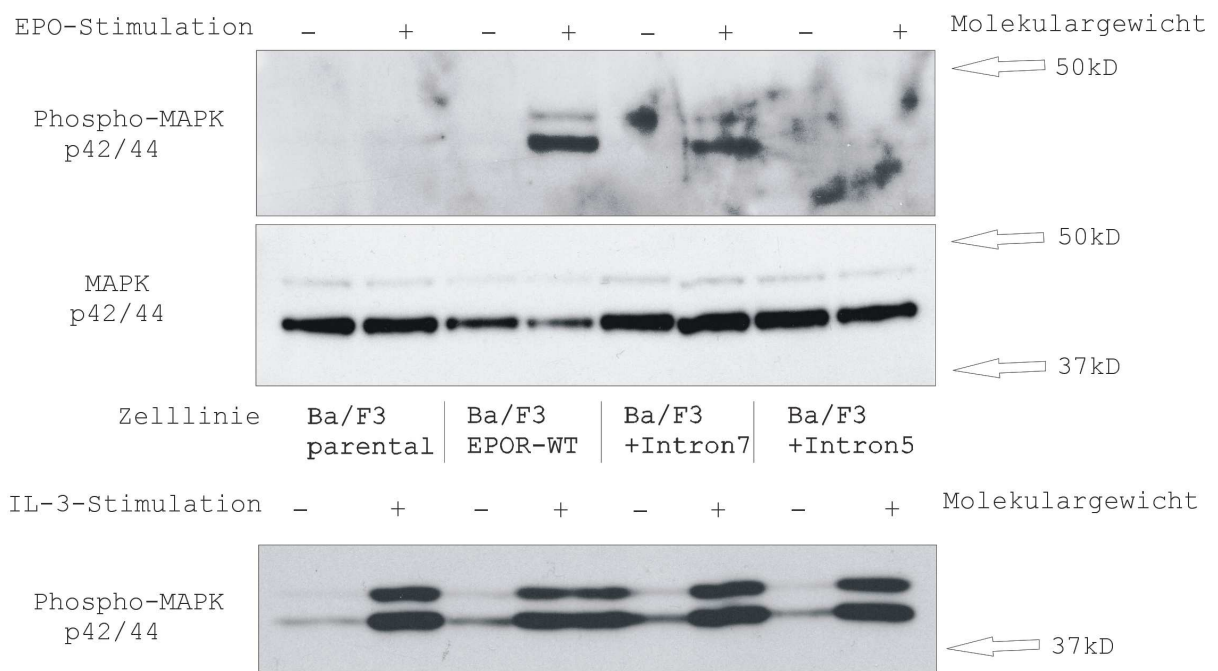
#### 5.3.5.1. Regulation EPOR-abhängiger cytosolischer Signalkaskaden

Nachdem nachgewiesen wurde, dass der EPOR-WT und die zu untersuchenden alternativen Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene stabil exprimiert werden, sollte die funktionelle Kompetenz hinsichtlich der Aktivierung cytosolischer Signalwege analysiert werden. Dazu wurde den IL3-abhängig wachsenden Ba/F3 Zellen für 5 Stunden der Wachstumsfaktor entzogen, anschließend für 30 Minuten mit EPO (5U/ml) restimuliert und Zelllysate bzw. Kernextrakte hergestellt. In den Ergebnissen wird deutlich, dass das Potential zur Aktivierung zellulärer Signalwege über die exprimierten Rezeptoren stark differiert.

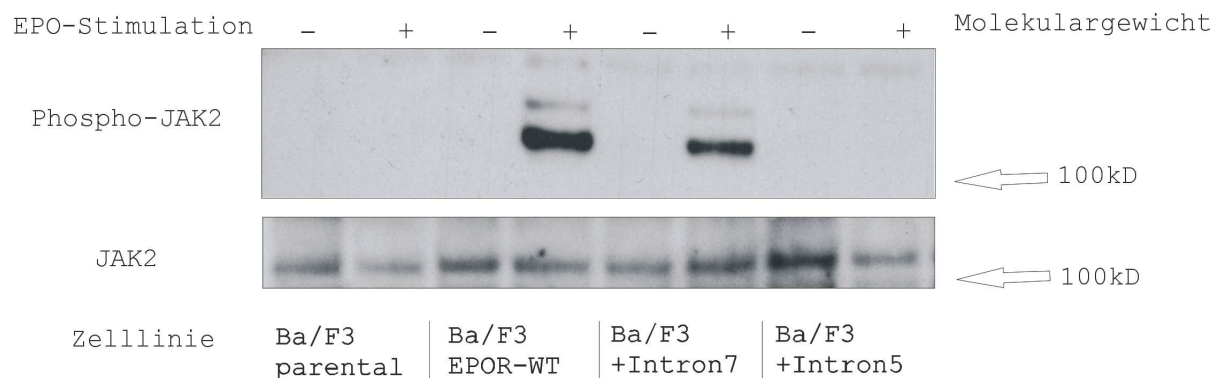
In den Proben nach Stimulation zeigten sich eine Phosphorylierung/Aktivierung von MAPK, JAK2, STAT5, AP-1 und NF- $\kappa$ B bei den Zellen mit Wildtyprezeptor und dem verlängerten alternativen Rezeptor. Der Zellklon mit der verkürzten Rezeptorform zeigte nach EPO-Stimulation keine Aktivierung der untersuchten Signalproteine (siehe Abbildung 30/31/32).

Als Positivkontrolle wurde eine IL3-Stimulation durchgeführt, die ebenfalls eine Phosphorylierung dieser Proteine zeigte (nur MAPK in Abbildung 30 dargestellt).

## 5. Ergebnisse

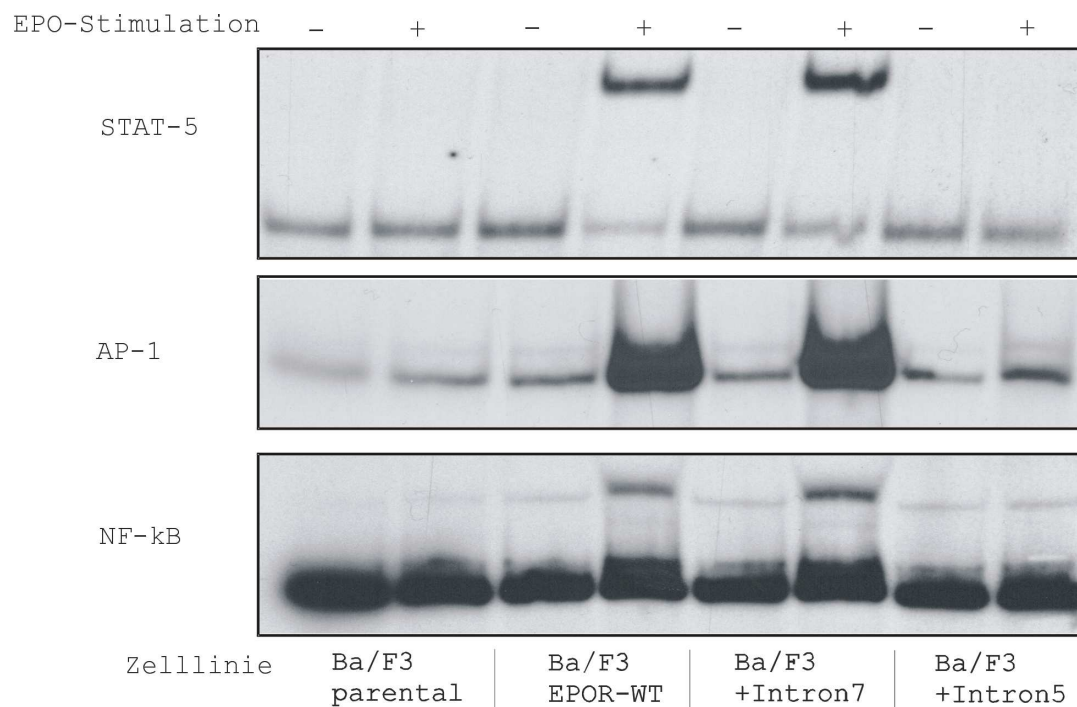


**Abbildung 30: Western-Blot MAP-Kinase Phosphorylierung nach EPO Stimulation in Ba/F3 Zellen und transfizierten Klonen, IL-3 Stimulation zur Positivkontrolle**



**Abbildung 31: Western-Blot JAK-Phosphorylierung nach EPO Stimulation in Ba/F3 Zellen und transfizierten Klonen**

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 32: Mittels EMSA Nachweis der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, STAT-5, NF-κB nach EPO Stimulation in Ba/F3 Zellen und transfizierten Klonen**

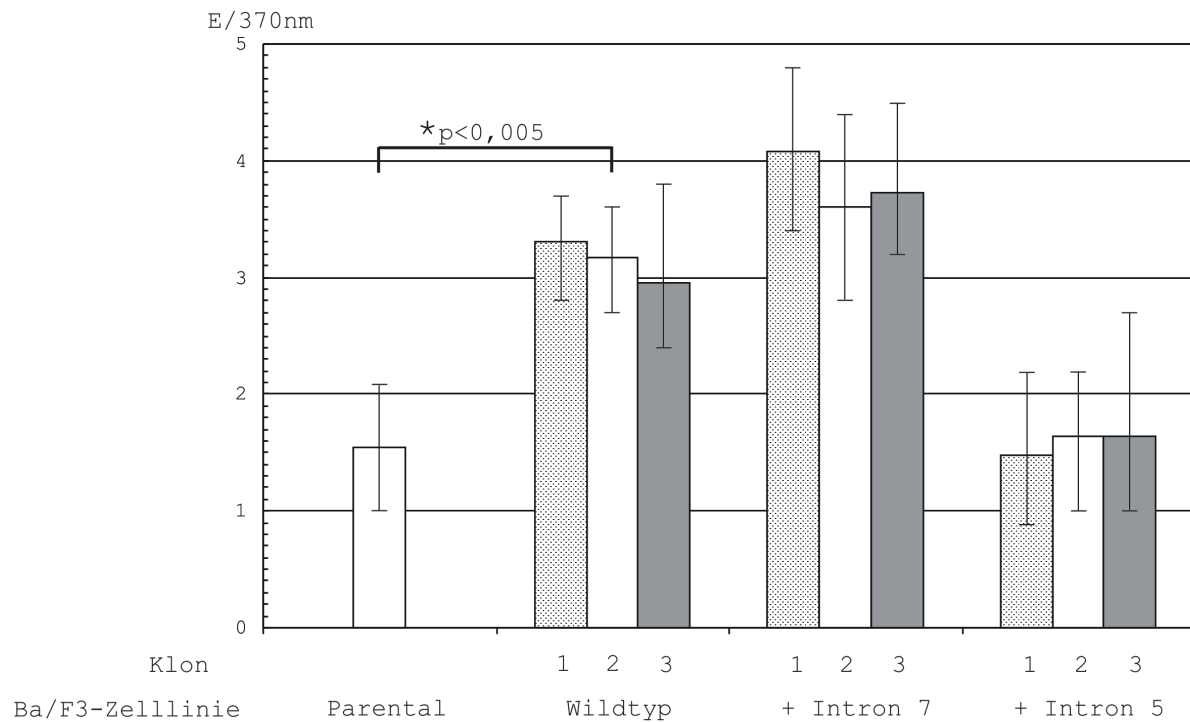
Bei Ba/F3 EPOR-WT und Ba/F3+Intron 7 sieht man nach EPO-Stimulation eine deutliche Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit (Shift) der untersuchten Transkriptionsfaktoren.

### 5.3.5.2. EPOR-vermittelte Proliferation

In den oben beschriebenen funktionellen Untersuchungen stabil transfizierter Ba/F3 Klone wurden die EPO-vermittelte Aktivierung potentiell mitogener Signalwege festgestellt. Im Anschluss sollte mit Hilfe von Proliferationsassays geklärt werden, ob die Aktivierung dieser Signalproteine in dem gewählten Zellmodell auch zu einer messbaren Wachstumserhöhung führt. Hierzu wurde der BrdU-Proliferationsassay ausgewählt, der die DNA-Neusynthese proliferierender Zellen detektiert.

Die verschiedenen Ba/F3 Zelllinien, die den EPO-Wildtyp Rezeptor, den EPO-Rezeptor mit Intron 7 oder den EPO-Rezeptor mit Intron 5 enthielten, wurden vergleichend untersucht. Dazu wurden jeweils drei unabhängig etablierte Zellklone in insgesamt 5 Experimenten verwendet. Als „Negativkontrolle“ dienten parentale Ba/F3 Zellen, die keinen endogenen EPOR exprimieren. Die Proliferationsuntersuchungen wurden mit EPO-Dosierungen von 2,5 U/ml durchgeführt. Wie Abbildung 33 zeigt, konnte ein hochsignifikanter Wachstumsunterschied zwischen Zellen ohne EPOR und transfizierten Zellen mit EPOR-WT bzw. EPOR mit Intron7 nachgewiesen werden. Zu den transfizierten Klonen mit Intron 5 war keine Veränderung zu erkennen.

## 5. Ergebnisse

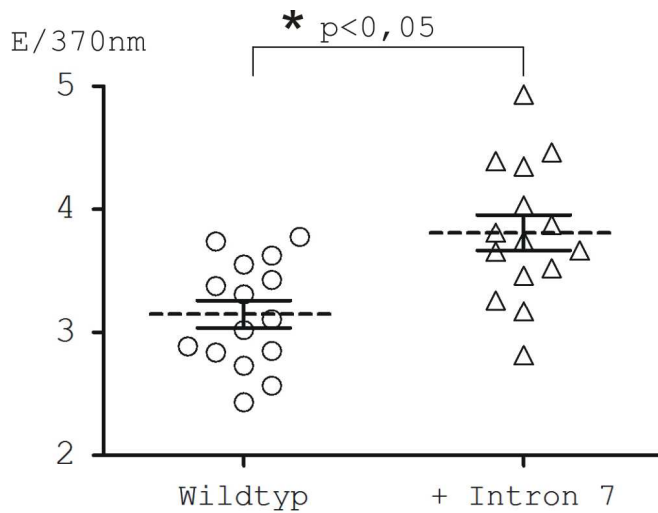


**Abbildung 33: Wachstum transfizierter Ba/F3 Zellklone und parentaler Zellen nach EPO-Stimulation im BrdU-Proliferationsassays**

Stimulation jeweils mit 2,5 U/ml (n=5 unabhängige Versuchsansätze, jeweils die Mittelwerte der Klone mit Standardabweichung dargestellt), statistisch hochsignifikanter Unterschied parentaler zu WT-EPOR-transfizierter Zellen

In den Versuchen fiel auf, dass bereits bei der Etablierung der stabil transfizierten Zellen die Zellen mit dem Intron7 enthaltenden EPOR besser und schneller wuchsen als die Zellen mit dem WT-Rezeptor. In dem daraufhin durchgeführten statistischen Vergleich (t-Test) der Proliferationsmessungen (Abbildung 34) konnte dieser Eindruck bestätigt werden. Es zeigte sich wiederum ein signifikanter Unterschied zwischen den Klonen mit EPOR-WT und der Variante mit Intron 7.

## 5. Ergebnisse

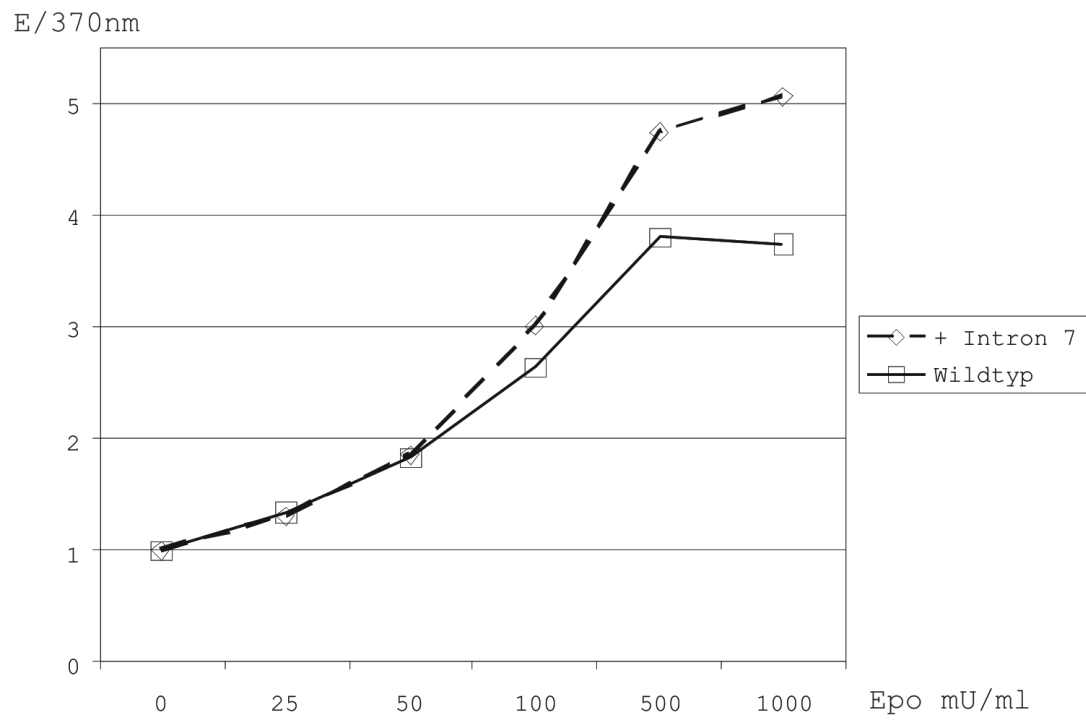


**Abbildung 34: Wachstum transfizierter Ba/F3 Zellklone nach EPO-Stimulation im BrdU-Proliferationsassay**

Stimulation jeweils mit 2,5 U/ml, statistisch signifikanter Unterschied bei transfizierten Zellen EPOR-WT und EPOR-Variante mit Intron 7 (Einzelmessungen, Mittelwert und Standardabweichung dargestellt).

Um nachzuweisen, dass auch bei physiologischen EPO-Konzentrationen Proliferationsänderungen ausgelöst werden, wurde die Dosisabhängigkeit des Zellwachstums genauer untersucht. Abbildung 35 stellt das Verhältnis von Zellproliferation und EPO-Dosis grafisch dar. Es ist ein deutlicher Anstieg des Wachstums der Zellen mit steigender EPO-Menge nachweisbar. Der dargestellte Unterschied zwischen EPOR-WT und Klonen mit Intron 7 war bei der Anzahl der durchgeführten Messungen (n=13) erst bei der Dosis von 1000 mU/ml statistisch hinweisend ( $p < 0,1$ )

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 35: Wachstum transfizierter Zellklone nach EPO-Stimulation im BrdU-Proliferationsassay**  
Stimulation in ansteigender EPO-Dosis (n=13 pro Stimulationsniveau),  $p < 0,1$  bei Stimulation mit 1000 mU/ml

## **6. Diskussion**

---

### **6. Diskussion**

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die Expression des EPOR in Zellen außerhalb des hämatopoetischen Systems verschiedener Spezies untersucht. Dabei wurden die Expression und die funktionelle Relevanz alternativ gespleißter Transkripte näher beleuchtet.

Die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. In neuronalen Progenitorzellen und primären Zellen konnten der EPOR-WT und zwei weitere alternative EPOR nachgewiesen werden.
2. Hypoxie führt in Rattengewebe zu einer veränderten Expression der EPOR-WT mRNA und einer Spleißvariante, die Intron 7 des EPOR-Gens enthält.
3. Der EPOR-WT ist bei Mensch, Ratte und Maus in der Struktur nahezu identisch, beim alternativen Spleißen von Intron 7 resultiert jedoch zwischen Ratte einerseits und Mensch bzw. Maus andererseits ein deutlicher Unterschied in der Proteinstruktur des EPOR.
4. Der strukturelle Unterschied alternativ gespleißter Rezeptoren hat einen deutlich nachweisbaren Einfluss auf die EPO-abhängige Signaltransduktion und das EPO-abhängige Wachstum bei Zellen, die diese Rezeptoren experimentell überexprimieren.

Die einzelnen Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

#### **6.1. Expression des EPOR in neuronalen Progenitorzellen**

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass der EPOR nicht nur in hämatopoetischen Vorläuferzellen, sondern auch in diversen anderen Geweben exprimiert wird. Seit Masuda S. et al. (1993) den EPOR in murinen neuronalen Zellen nachweisen konnten wurden von anderen Autoren, auch in anderen Spezies, ähnliche Daten publiziert. Die neuronale Expression ist besonders stark während der embryonalen Entwicklung (Liu C. et al. 1997) und unter Ischämiebedingungen (Sakanaka M. et al. 1998). In der neuronalen Zelllinie ST14A aus dem Striatum 14 Tage alter Rattenembryonen war daher eine Expression des EPOR ebenfalls zu erwarten.

Mit eigens generierten spezifischen Primern konnte auf Basis der RNA eine cDNA Sequenz amplifiziert werden, die dem EPOR entsprach. Die Primer waren dabei so konzipiert, dass eine Amplifikation aus genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte, da mehrere Introns zwischen den Primern lagen, bzw. die Primer Exon/Exon Grenzen der mRNA überspannten. Zur zusätzlichen Validierung der Ergebnisse wurden die PCR's mit einem Temperaturgradienten durchgeführt, um eventuelle falsch positive Amplifikate zu identifizieren. Versuche mit weiteren Geweben (primären Zellen) der Ratte lieferten



## **6. Diskussion**

---

vergleichbare Ergebnisse. Der EPOR wurde in folgenden Geweben gefunden: Kleinhirn, Cortex cerebri, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Knochenmark. Darm- und Muskelgewebe zeigten hingegen keine EPOR Expression. Hinsichtlich Cortex cerebri, Kleinhirn, Niere, Herz, Muskel und Knochenmark sind die Ergebnisse mit den aus der Literatur bekannten Daten vergleichbar (siehe Kap.2.2).

Die stärkste Expression fand sich in Knochenmark, Milz und neuronalen Geweben. In Knochenmark und Milz ist eine hohe Expression zu erwarten, da die embryonale Blutbildung in beiden Organen stattfindet und die klassischen EPO Zielzellen zu diesem System gehören. Die starke neuronale Expression in den adulten primären Zellen steht allerdings im Widerspruch zu den bekannten Daten, da die Rezeptordichte um den Faktor 100 niedriger sein sollte als im hämatopoetischen System (Juul S.E. et al 1998).

Zum Proteinnachweis wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Hier wurde in vergleichenden Untersuchungen zu Zelllinien mit bekannter EPOR-Expression ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht detektiert. Zu beachten ist dabei, dass die gegenwärtig kommerziell verfügbaren Antikörper gegen den EPOR häufig unspezifische Bindungen eingehen und Western-Blot Analysen daher kritisch zu bewerten sind (Elliott S. et al. 2006). In nachfolgenden EMSA-Analysen konnte die Funktionalität des EPOR durch Veränderungen in der DNA-Bindungsaktivität relevanter Transkriptionsfaktoren verifiziert werden.

Mit diesen Untersuchungen wurde deutlich gemacht, dass in ST14A Zellen das EPO/EPOR System vollständig funktionsfähig ist. Von der Transkription und Translation des EPOR-Gens über die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche, bis zur Stimulierbarkeit des EPO-Signalweges sind damit alle Voraussetzungen für die biologische Funktionalität des Systems gegeben.

### **6.2. Identifizierung alternativer EPOR in Rattenzellen**

Bereits beim Nachweis des EPOR-WT Rezeptors zeigte sich in den PCR-Analysen ein zusätzliches Amplifikationsprodukt, das sich als spezifisch und reproduzierbar erwies. Es drängte sich der Verdacht auf, dass es sich dabei um das Produkt einer alternativ gespleißten mRNA handelt. Durch Untersuchungen mit verschiedenen Primerkombinationen konnte dann nachgewiesen werden, dass zusätzlich zur Wildtyp-mRNA eine alternative Form vorliegt, in der das Intron 7 in der mRNA verbleibt. Aus murinen und humanen Tumorzellen und verschiedenen Geweben ist diese Isoform des EPOR bereits bekannt, ihr wird eine inhibitorische Funktion bei der Zellproliferation zugeschrieben (Chiba S. et al. 1997, Shimizu

## 6. Diskussion

---

R. et al. 1999). In Rattengewebe und speziell bei der ST14A Zelllinie existieren bisher keine publizierten Daten zu dieser Spleißvariante.

Ausgehend von den Ergebnissen in den ST14A- Zellen wurden an primären Rattenzellen, primären murinen Zellen und humanen neuronalen Progenitorzellen Transkriptanalysen mit der gleichen Fragestellung und Versuchsanordnung durchgeführt. Auch hier wurde neben dem EPOR-WT eine weitere Form detektiert, die ebenfalls einer Spleißvariante mit Intron 7 entsprach.

Zur weiteren Verifizierung der Existenz einer alternativen Spleißvariante wurden die PCR-Produkte kloniert und sequenziert. Nach Analyse der Sequenzdaten konnte für beide Rezeptorvarianten eine vollständige Übereinstimmung mit den publizierten Sequenzen festgestellt werden. Um falschpositive Ergebnisse der PCR-Analysen sicher auszuschließen (besonders bei niedrigen Annealingtemperaturen und einer hohen Anzahl von Reaktionszyklen, Kwok S. et al. 1989), wurde eine weitere Methode zur Verifizierung der Daten eingesetzt.

Mit Hilfe von RNase-Protection Assays sollte die Existenz der alternativen mRNA bestätigt, und Aussagen zu den quantitativen Verhältnissen gewonnen werden. Der RPA ist ein hochspezifisches und sehr sensitives Verfahren zur Suche nach alternativen Spleißvarianten (Rottmann J.B. 2002). Der Vorteil der Methode besteht darin, dass mRNAs direkt nachgewiesen werden, ohne dass diese z.B. durch eine Polymerasereaktion verändert werden können. Die aus den zu untersuchenden Zellen isolierte mRNA wird durch die Hybridisierung mit einer spezifischen, radioaktiv markierten Sonde detektiert. Die RPA-Untersuchungen reproduzierten die Ergebnisse aus den PCR-Versuchen. So wurden sowohl Transkripte des EPOR-WT als auch des alternativ gespleißten Rezeptors in ST14A Zellen sowie in primären Rattengewebe zweifelsfrei identifiziert. Durch die quantitative Analyse der Hybridisierungsprodukte konnte das Verhältnis von Wildtyp zu alternativem Rezeptor bestimmt werden. Während in ST14A Zellen das Verhältnis WT-Rezeptor zu alternativem Rezeptor 2,4:1 betrug, schwankte in den primären Zellen das Verhältnis von 1:0 im Knochenmark bis 1:2,8 im Kleinhirn.

In den Versuchen zur Klonierung des rEPOR-WT-Rezeptors und des Rezeptors mit Intron7 wurde eine weitere Spleißvariante identifiziert, in der Intron 5 als Sequenz in der mRNA verbleibt. Auch diese alternative Rezeptorvariante wurde bereits von anderen Autoren identifiziert (Shams I. et al. 2005), ohne jedoch auf ihre funktionelle Bedeutung hin untersucht worden zu sein. In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen zur Funktion der Rezeptoren wurde diese Variante deshalb mit eingeschlossen.

### **6.3. Einfluß von Hypoxie auf die Expression von EPOR-Varianten in Rattengeweben**

Aktuell gibt es viele Hinweise darauf, dass unter Hypoxiebedingungen eine vermehrte Aktivität des EPO/EPOR Systems in verschiedenen Geweben besteht (Sinor A.D. et al. 2000, Crivellato E. et al. 2004, Galeano M. et al. 2006). Untersuchungen an Zelllinien, Tierversuche, präklinische und auch klinische Studien erbrachten Daten, die eine Zunahme der Rezeptordichte, Signalverarbeitung und EPO-abhängigen Genaktivierung nachwiesen (Ehrenreich H. et al. 2002, Tsuchiya D. et al. 2001, Sadamoto Y. et al. 1998, Brines M.L. et al. 2000).

Zur Feststellung des Einflusses von Hypoxie auf den EPOR und die detektierte alternative Variante wurden Versuche mit sekundär anämischen Ratten durchgeführt. Die medikamentös ausgelöste Anämie führte zu einem generalisierten Gewebesauerstoffmangel.

Die Ergebnisse zeigen deutliche Expressionsunterschiede des EPOR-WT zwischen verschiedenen Geweben unter Normoxie und Hypoxie sowie Änderungen in der Relation zwischen Wildtyp und alternativem Transkript.

Eine Zunahme der Expression des WT-Rezeptors zeigte sich in Leber, Cortex cerebri, Kleinhirn, Lunge und Muskulatur, eine Abnahme hingegen bei Knochenmark, Milz, Niere und Herz. Grundsätzlich war in allen Organen, die den EPOR unter Normoxie exprimieren, eine Zunahme der EPOR-Expression unter Hypoxie zu erwarten, da in allen Organen Schutzmechanismen gegen eine hypoxische Gewebeschädigung zu postulieren sind. Die beschriebene Abnahme der Expression in einigen Geweben könnte durch eine Gewebeschädigung zustande gekommen sein. Wie am Beispiel der Knochenmark-Proben zu sehen, wurden durch die Phenylhydrazinbehandlung vermutlich alle EPOR tragenden Zellen eliminiert, unter Hypoxiebedingungen waren diese nachfolgend nicht mehr nachweisbar.

Wechselnde Verhältnisse von WT zu Spleißvarianten sind, wenn man den Überlegungen von Chin K. et al. (2000) folgt, darauf begründet, dass der EPOR in Geweben, in denen er essentiell für Proliferation und Differenzierung ist (z.B. Knochenmark) unter physiologischen Bedingungen effektiv prozessiert wird und der Wildtyp-Rezeptor deutlich dominiert. Andere Gewebe hingegen zeigen möglicherweise eine ineffektive Prozessierung mit alternativ gespleißten RNA's die sich nach hypoxischer Reizung, durch Aktivierung verschiedener Promotoren (z.B. GATA 3, Pandolfi M.E. et al. 1995), zu Gunsten der WT-Variante verschiebt. So wird vermutet, dass erst unter Hypoxiebedingungen in vielen Geweben eine nennenswerte Synthese des funktionell relevanten EPOR-WT stattfindet.

## **6. Diskussion**

---

Die Ergebnisse der Hypoxieversuche in den Geweben Kleinhirn, Lunge, Leber und Milz stützen diese Überlegungen. Gewebe, bei denen das Verhältnis gleich blieb, bzw. eine gegenläufige Veränderung zeigte waren Cortex cerebri, Niere, Muskel und Herz. Eine denkbare Erklärung für diese Daten wäre auch hier eine zu starke hypoxische Schädigung der genannten Organe, die zu einer verschlechterten Prozessierung führte. Weiterhin ist auch eine wirkliche Transkriptionverstärkung der alternativen EPOR mRNA möglich. Wie in den funktionellen Untersuchungen an dieser Rezeptorvariante gezeigt wäre dies sinnvoll, da der alternative Rezeptor wohl eine stärkere Fähigkeit zur Vermittlung proliferationsfördernder EPO-Signale hat. Über den zu Grunde liegenden Mechanismus ist hier keine Aussage möglich. Die gewonnenen Daten machen deutlich, dass alternativ gespleißte Rezeptorvarianten zum einen quantitativ durchaus Relevanz besitzen und darüber hinaus das Verhältnis zum Wildtyprezeptor Schwankungen unterworfen ist, die ebenfalls von funktioneller Bedeutung sein könnten.

### **6.4. Strukturelle Unterschiede alternativer Spleißprodukte**

Für die beschriebenen alternativen Rezeptoren wurden jeweils die Sequenzen ermittelt und der damit verbundene Einfluss auf die Aminosäureabfolge und Struktur dieser Varianten analysiert. Die detektierten alternativen Rezeptoren mit Intron 5 bzw. 7 sowie der Wildtyprezeptor der Rattenzellen zeigten Basensequenzen, die sich identisch zu den publizierten Daten darstellten. Obwohl die Exonsequenzen zwischen verschiedenen Spezies beim EPOR eine hohe Homologie aufweisen ist dies bei den Introns nicht der Fall. Dies führt dazu, dass sich bei alternativen Spleißvorgängen die resultierenden Proteine erheblich zwischen verschiedenen Spezies unterscheiden können.

Ein verbleibendes Intron 7 hat bei Maus und Mensch eine verkürzte intrazelluläre Rezeptordomäne mit dem Verlust aller für die Signaltransduktion relevanten Tyrosinreste zur Folge (Chiba S. et al. 1997, Arcasoy M.O. et al. 2003). Durch die zusätzlichen, aus dem Intron stammenden Basen, folgt bei der Maus ein Stopcodon nach 18 Basen, beim Mensch ein Stopcodon nach 24 Basen. Im Gegensatz dazu liegt bei der Rattensequenz das eingefügte 7. Intron im Leserahmen und führt zur Insertion von 31 Aminosäuren. Damit bleiben alle funktionellen Domänen des EPOR erhalten, ohne dass zusätzliche phosphorylierbare Aminosäurereste hinzukommen. Im Falle des Intron 5 sind die Auswirkungen auf die drei Spezies analog, es kommt zu einem Stop-Codon durch das eingefügte Intron, der Rezeptor behält seine extrazelluläre und Transmembrandomäne, die intrazelluläre Domäne wird nahezu komplett entfernt. Im Detail bedeutet das bei verbliebenem Intron 5 einen Frameshift ab

## 6. Diskussion

---

Aminosäure 246 und nachfolgend ein Stop-Codon an Position 316. Die bekannten phosphorylierbaren Aminosäurereste fehlen dem Rezeptor damit.

### **6.5. Vergleichende funktionelle Analyse der EPOR-Isoformen**

Die hier besprochenen Ergebnisse beziehen sich auf Ba/F3 Zellen, die in ihrer parentalen Form mit dem Ratten-EPOR-WT, der Variante mit Intron 7 oder der Variante mit Intron 5 stabil transfiziert und anschließend kultiviert wurden. Es erfolgten vergleichende Betrachtungen zwischen diesen Zellpopulationen. Parentale Ba/F3 Zellen exprimieren den EPOR nicht und sind somit durch EPO nicht stimulierbar.

Zu dem alternativen Transkript mit Intron 7, das bei Maus und Mensch zu einem verkürzten Rezeptor führt, gibt es Untersuchungen, die eine kompetitive biologische Funktion dieser Variante aufzeigen. Dem Rezeptor fehlt die signalvermittelnde Aktivität. Damit werden alle physiologischen EPO-Wirkungen reprimiert (Shimizu R. et al. 1999, Yakamura Y. et al. 1998). EPO wird zwar gebunden, löst aber keine Signale aus, zudem verbleiben weniger Cytokinmoleküle im System, die an WT-Rezeptoren binden können.

Durch ein strukturell verschiedenes Intron 7 bei der Spezies Ratte bleiben die intrazellulären signalvermittelnden Domänen des Rezeptors nach alternativem Spleißen weitestgehend unverändert. Es war daher zu erwarten, dass in den funktionellen Untersuchungen mit den entsprechenden stabil transfizierten Zellen, bei der Analyse von Signaltransduktionsereignissen und Proliferationsassays dem WT vergleichbare Ergebnisse auftreten.

Wie vermutet, konnten nach EPO-Stimulation bei Klonen mit EPOR-WT und Intron 7-Variante signifikante Effekte in der Signaltransduktion nachgewiesen werden. Typische Signalproteine des EPO/EPOR Transduktionsweges, die zur Apoptosehemmung, Differenzierung und Proliferation nötig sind, wurden bestimmt und zeigten eine starke Aktivierung. In den Proliferationsassays bestand ein hochsignifikanter Unterschied der DNA-Synthese zwischen Zellen ohne transfizierten Rezeptor und Zellen mit dem WT bzw. Intron 7 EPOR. Diese Effekte waren auch mit physiologischen EPO-Konzentrationen zweifelsfrei nachweisbar.

Bei diesen funktionellen Untersuchungen fiel ein nicht erwarteter, statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Proliferationsverhalten der transfizierten Zellen auf. Dabei hatten die Zellen mit dem veränderten Rezeptor (+Intron 7) einen Wachstumsvorteil gegenüber der Wildtyp-Form. Warum ein solcher Unterschied zu verzeichnen war kann nicht zweifelsfrei geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.


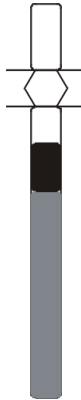

## **6. Diskussion**

---

Mit diesen Ergebnissen konnte ein bisher nicht bekannter Unterschied im EPOR-System zwischen Rattenzellen und murinen/humanen Zellen aufgezeigt werden. Bei einer relevanten Expression der Rezeptorvariante mit Intron 7 ist eine funktionelle Bedeutung durchaus anzunehmen. Da in vielen experimentellen EPO/EPOR Modellen hinsichtlich Neuroprotektion und anderer klinisch relevanter Probleme Ratten als Versuchsobjekte verwendet werden stellt sich die Frage, ob die bisher gewonnenen Ergebnisse und Schlussfolgerungen insbesondere hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die Anwendung beim Menschen neu bewertet werden müssen.

Bei der Variante mit ungespleißtem 5. Intron resultiert bei Maus, Mensch und Ratte ein Rezeptor ohne intrazelluläre signalvermittelnde Domäne, ein „truncated receptor“. Nach den theoretischen Überlegungen zur Rezeptorstruktur war ein schlechtes Wachstum der transfizierten und überexprimierenden Zellen, eine schlechte oder fehlende EPO-Stimulierbarkeit der Signalwege und ebenso eine fehlende Aktivierung wichtiger Transkriptionsfaktoren zu erwarten. Die Ergebnisse bestätigen diese Hypothesen, es waren keine Unterschiede zwischen den transfizierten und parentalen Zellen nachweisbar. Im Vergleich zu den vorher besprochenen Mutanten waren diese Zellen nicht durch EPO stimulierbar, die Zellen starben bei Entzug von IL-3 und Exposition mit EPO als einzigem Wachstumsfaktor im Kulturmedium.

## 6. Diskussion

| Funktion                                     | Ba/F3 Zellen<br>transfiziert mit rEPOR<br>Wildtyprezeptor<br>(grau△funktionelle Domäne) | Ba/F3 Zellen<br>transfiziert mit rEPOR<br>Variante Intron7<br>(grau△funktionelle Domäne,<br>schwarz△Intron7) | Ba/F3 Zellen<br>transfiziert mit rEPOR<br>Variante Intron5<br>(schwarz△Intron5)     |
|--|---|--|---|
|  |        |                            |  |
| MAPK Aktivierung(EPO)                        | +   | +  |   |
| JAK-2 Aktivierung(EPO)                       | +   | +  | -   |
| STAT-5 Aktivierung(EPO)                      | +   | +  | -   |
| AP-1 Aktivierung(EPO)                        | +   | +  | -   |
| NF-kB Aktivierung(EPO)                       | +   | +  | -   |
| Proliferationsstärke nach<br>EPO-Stimulation | +   | ++   | -   |

**Tabelle 10 Zusammenfassende Darstellung der Unterschiede zwischen verschiedenen transfizierten Ba/F3 Zellen**

### 6.6. Potentielle medizinische Bedeutung alternativer EPOR

Dass die dargestellten Ergebnisse praktische Relevanz besitzen zeigt sich an den Untersuchungen zu den Krankheiten Polyzythämia vera und myelodysplastisches Syndrom. Verkürzte Rezeptoren ohne signalvermittelnde Funktion können hierbei ein Einflussfaktor sein, der bei der empfindlichen Steuerung von blutbildenden Prozessen im Körper von entscheidender Bedeutung ist. So führt eine Überexpression dieser inhibitorischen Rezeptoren zu einer Synthese/Differenzierungsstörung (Yakamura Y. et al. 1998) und eine verminderte Expression zur Überaktivität dieses Systems (Chiba S. et al. 1997). In beiden Fällen ist die Folge für den Organismus beträchtlich, es entstehen die genannten lebensbedrohlichen Erkrankungen.

Ursächlich für diese Veränderungen sind Intronsequenzen, die in der mRNA verbleiben und dadurch zu den alternativen Rezeptorproteinen führen. Dies wurde im Mausmodell und beim Menschen nachgewiesen. In der vorgelegten Arbeit werden diese alternativen Spleißvorgänge auch in Rattenzellen verifiziert und die Unterschiede zu den anderen Spezies aufgezeigt.

## 6. Diskussion

---

Intronsequenzen haben in der Natur eine hohe Variabilität und sind weitaus weniger konserviert als die kodierenden Exons. Auch wenn sie im Regelfall keinen Einfluss auf die spätere Proteinsequenz besitzen sind sie durch alternative Spleißvorgänge bzw. regulatorische Funktionen von Bedeutung (Willingham A.T. et al. 2006). Es ist daher denkbar, dass durch sequenzabhängige Spleißveränderungen humane Individuen oder Gruppen existieren, die strukturell veränderte Rezeptoren exprimieren. Es ist nachvollziehbar, dass die Überexpression eines Rezeptors, der anstelle einer inhibitorischen Wirkung eine dem WT entsprechende, aber verstärkte Wirkung zeigt, die Zellbiologie deutlich verändert. Ebenso wäre eine Überexpression der Rezeptorvariante mit Intron 5 von klinischer Bedeutung, da hier wiederum die inhibitorischen Wirkung des veränderten Rezeptors zum tragen kommt.

In neuronalen Zellen ist die Funktionsweise des EPOR noch deutlich weniger verstanden. Die cytoprotektive EPO-Funktion beim ischämischen Insult, traumatischen Hirnverletzungen, entzündlichen Nervenerkrankungen und degenerativen Störungen ist nachgewiesen (Agnello D. et al. 2002, Sattler M.B. et al. 2004 Gorio A. et al. 2002 Bianchi R. et al. 2004 Ehrenreich H. et al. 2002, Tsuchiya D. et al. 2001, Sadamoto Y. et al. 1998, Brines M.L. et al. 2000 u.a.). Ob in Nervenzellen diese EPO-Wirkungen über einen in Molekulargewicht, Affinität und Proteinassoziation abweichenden Rezeptor vermittelt werden (Fischer J.W. et al. 2003), einen Heterorezeptor mit  $\beta$ cR und EPOR (Brines M. et al. 2004) oder eine völlig andere Struktur dieses Rezeptors vorliegt, bleibt abzuwarten. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass alternative Spleißvarianten oder auch Regulationsmechanismen durch Intronvariabilitäten zu diesem außerordentlich komplexen System der Signalverarbeitung über den EPOR beitragen können. Diese Variabilität könnte auch eine Ursache der sehr widersprüchlichen Forschungsergebnisse in diesem Bereich sein. Weiterführende Untersuchungen bei den genannten neurologischen Erkrankungen sollten insbesondere deshalb vorgenommen werden, wenn man diese Krankheiten mit EPO bzw. strukturverändertem EPO behandeln möchte. Die strukturellen EPOR-Variationen können somit von therapeutischer Relevanz sein und ein Therapieansprechen bzw. Therapieversagen teilweise mitbegründen.



## **7. Zusammenfassung**

---

### **7. Zusammenfassung**

EPO besitzt als hämatologischer Wachstumsfaktor einen festen Stellenwert in der Therapie verschiedener Erkrankungen, die mit einer Anämie einhergehen. Da sein Einsatz auch in der Behandlung von Erkrankungen anderer Organsysteme angestrebt wird, ist es nötig, die cytoprotektiven, differenzierungsfördernden und proliferativen Effekte in diesen Geweben besser zu verstehen.

Ziel dieser Arbeit war es, in neuronalen und anderen nicht-hämatopoetischen Rattenzellen den EPOR-WT und andere mögliche alternative Rezeptoren zu identifizieren, quantitative Bestimmungen dieser Rezeptoren und hypoxiebedingte Expressionsveränderungen zu untersuchen. Abschließend sollte danach durch Überexpressionsuntersuchungen die mögliche biologische Bedeutung dieser Rezeptoren aufgeklärt werden.

Neben dem Wildtyprezeptor ließen sich mit verschiedenen Methoden zwei weitere alternative Rezeptoren in ST14A Zellen nachweisen. Dies waren jeweils Rezeptoren, in denen durch alternative Spleißvorgänge ein Intron als zusätzliche Sequenz verbleibt. Es handelte sich dabei um die Introns 5 und 7, die nach Klonierung und Sequenzierung sicher identifiziert werden konnten. Um mit einer zweiten Methode die durch PCR-Amplifikation gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren, wurden RNase protection assays durchgeführt. Beide Methoden wurden ebenso zur Bestimmung der Rezeptoren in primären Rattenzellen herangezogen, auch hier konnte der EPOR-WT und die alternativen Rezeptoren in vielen Geweben gezeigt werden. Nach einer medikamentös ausgelösten Anämie wurden vergleichende Expressionsbestimmungen in den verschiedenen primären Rattengeweben vorgenommen. Es waren deutliche Expressionsunterschiede nachweisbar, dabei dominierte in den meisten Geweben eine Induktion des EPOR.

Bei der Analyse der resultierenden Proteinstruktur der alternativen Transkripte zeigte sich nach Verbleib des Introns 5 im Transkript ein verkürzter Rezeptor, ein membrangebundenes Molekül ohne intrazelluläre, signalkompetente Domäne. Bei Verbleib des Introns 7 resultierte eine Baseninsertion, die zu einem um 31 Aminosäuren verlängerten Rezeptor führt und eine vollständig erhaltene signalvermittelnde Domäne enthält. Im Speziesvergleich fiel auf, dass bei der Variante mit Intron 5 ein vergleichbarer Rezeptor bei Mensch, Maus und Ratte resultiert. Bei der Variante mit Intron 7 sind die zusätzlichen Aminosäuren nur bei der Ratte zu finden, bei Mensch und Maus würde hier ebenfalls ein Rezeptor ohne funktionelle intrazelluläre Domäne entstehen.

Zur Bestimmung der biologischen Relevanz dieser Ergebnisse wurden stabil transfizierte Zellen hergestellt, die den EPOR-WT und jeweils die alternativen Rezeptoren

## **7. Zusammenfassung**

---

überexprimieren. Hier konnte gezeigt werden, dass ein verkürzter Rezeptor nach EPO-Stimulation keinen nachweisbaren Effekt auf die Zellen auslöst. Bei dem Rezeptor mit der Aminosäureinsertion hingegen zeigte sich eine gute Stimulierbarkeit der Zellen, die nach genauerer Analyse der Daten sogar einen signifikanten Proliferationsvorteil gegenüber den Zellen mit dem Wildtyprezeptor erbrachte.

### **8. Literaturverzeichnis**

- (1) Acs G., Acs P., Beckwith S.M. et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in expression in human cancer. *Cancer Res* 61: 3561-3565, 2001
- (2) Acs G., Zhang P.J., Rebbeck T.R. et al. Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. *Cancer* 95: 969-981, 2002
- (3) Agnello D., Bigini P., Ghezzi P. et al. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 952: 128-134, 2002
- (4) Altschul S.F, Koonin E.V. Iterated profile searches with PSI-BLAST--a tool for discovery in protein databases. *Trends Biochem Sci.*;23(11):444-7, 1998.
- (5) Anagnostou A., Liu Z., Steiner M. et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3974-3978, 1994
- (6) Andratschke N., Schnaiter A., Nieder C. et al. Preclinical evaluation of erythropoietin administration in a model of radiation-induced kidney dysfunction. *International Journal of radiation Oncology, Biology, Physics*, 64: 1513-1518, 2006
- (7) Arcasoy M.O. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol.* 141:14-31, 2008
- (8) Arcasoy M.O., Jiang X., Haroon Z.A. Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem Biophys Res Com* 307: 999-1007, 2003
- (9) Bachmann S., Le Hir M., Eckhardt K.U. Co-localisation of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem* 41: 335-341, 1993
- (10) Bagnis C., Beaufils H., Deray G. et al. Erythropoietin enhances recovery after cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 16: 932-938, 2001
- (11) Baldino F. Jr, Ruth J.L., Davis L.G. Nonradioactive detection of vasopressin mRNA with in situ hybridization histochemistry. *Exp Neurol.* Jun 104(3):200-71989.
- (12) Barbone F.P., Johnson D.L., Farrel F.X. et al. New epoetin molecules and novel therapeutic approaches. *Nephrol Dial Transplant* 14: 80-84, 1999
- (13) Barber D.L., Beattie B.K., Mason J.M. et al. A common epitope is shared by activated signal transducer and activator of transcription-5(STAT5) and the phosphorylated erythropoietin receptor: implications for the docking model of STAT activation. *Blood* 97: 2230-2237, 2001

## **8. Literaturverzeichnis**

---

- (14) Barber D.L. et al. Erythropoietin activates Raf1 by an Shc-independent pathway in CTTL-Epo-R cells. *Blood* 89: 55-64, 1997
- (15) Beleslin-Cokic B.B. et al. Erythropoietin and hypoxia stimulates erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* 104: 2073-2080, 2004
- (16) Berdel W.E., Oberberg D., Reufi B., Thiel E., Studies on the role of recombinant human erythropoietin in the growth regulation of human nonhematopoietic tumour cells in vitro. *Ann Hematol* 63: 5-8, 1991
- (17) Bernaudin M., Marti H.H., Roussel S. et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 643-651, 1999
- (18) Bianchi R. et al. Erythropoietin both protects from and reverse experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 823-828, 2004
- (19) Birnboim H.C, Doly J.A Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*;7(6):1513-23, 1979.
- (20) Böttcher T., Mix E., Koczan D., Bauer P., Pahnke J., Peters S., Weinelt S., Knoblich R., Strauss U., Cattaneo E., Thiesen H.J., Rolfs A. Gene expression profiling of ciliary neurotrophic factor-overexpressing rat striatal progenitor cells (ST14A) indicates improved stress response during the early stage of differentiation. *J Neurosci Res.* 73(1):42-53, 2003
- (21) Bittorf T, Buechse T, Sasse T, Jaster R, Brock J. Activation of the transcription factor NF-kappaB by the erythropoietin receptor: structural requirements and biological significance. *Cell Signal.*;13(9):673-81, 2001
- (22) Buemi M., Vaccaro M., Sturiale A., Galeano M.R., Sansotta C., Cavallari V., Vermiglio G. et al. Recombinant human erythropoietin influences revascularisation and healing in a rat model of random ischemic flaps. *Acta Derm Venerol* 82: 411-417, 2002
- (23) Brines M., Ghezzi P., Keenan S. et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury, *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10526-10531, 2000
- (24) Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., Cerami A. et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14907-14912, 2004
- (25) Brines M., The therapeutic potential of erythropoiesis-stimulating agents for tissue protection: a tale of two receptors. *Blood Purif.*;29: 86-92. 2010
- (26) Calvillo L., Latini R., Kajstura J., Leri A., Anversa P., Ghezzi P., Salio M., Cerami A., Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-

## **8. Literaturverzeichnis**

---

reperfusion injury an promotes beneficial remodelling Proc Natl Acad Sci USA 100: 4802-4806,2003

- (27) Cattaneo E., Conti L. Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells. *J Neurosci Res.* 53(2):223-34, 1998
- (28) Celik M., Gokmen N., Erbayraktar S., Akhisaroglu M., Konakc S., Ulukus C., Genc S., Brines M. et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2258-2263, 2002
- (29) Chiba S., Takahashi T., Hirai H. et al. Selective expression of mRNA coding for the truncated form of erythropoietin receptor in hematopoietic cells and its decrease in patients with polycythemia vera. *Blood* 90: 97-104, 1997
- (30) Chin K, Oda N, Shen K, Noguchi C.T. Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor gene by proteins binding to GATA-1 and Sp1 motifs. *Nucleic Acids Res.* 23(15):3041-9, 1995.
- (31) Chin K., Yu X., Noguchi C.T. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Mol Brain Res* 81: 29-42, 2000
- (32) Chong Z.Z., Kang J. Q., Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cystein proteases. *Circulation* 106: 2973-2979, 2002
- (33) Chong Z.Z., Kang J. Q., Maiese K. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, AKT1, BAD, and caspase-mediated pathways. *Br J Pharmacol* 138: 1107-1118, 2003
- (34) Chong Z.Z., Li F., Maiese K. et al. Erythropoietin requires NF-kappaB and his nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity.
- (35) Chu G, Hayakawa H, Berg P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res.*15(3):1311-26, 1987.
- (36) Crivellato E. Nico B., Vacca A., Djonov V., Presta M., Ribatti D. Recombinant human erythropoietin induces intussusceptive microvascular growth in vivo. *Leukemia.* 18(2):331-6, 2004.
- (37) Damen J.E., Cutler R.L., Jiao H., Yi T., Krystal G. Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI 3-kinase activity. *J Biol Chem* 270: 23403-23408, 1995

## **8. Literaturverzeichnis**

---

- (38) D'Andrea A.D., Zon L.I. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J Clin Invest* 86: 681-687, 1990
- (39) Davis J.M., Arakawa T., Strickland T.W., Yphantis D.A., Characterisation of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 26: 2633-2638, 1987
- (40) De la Chapelle A., Träskelin A.L., Juvonen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrozytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4495-4499, 1993
- (41) Digicaylioglu M., Bichet S., Marti H.H., et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3717-3720, 1995
- (42) Digicaylioglu M., Lipton S.A. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between JAK2 and NF- $\kappa$ B signalling cascades. *Nature* 412: 641-647, 2001
- (43) Ehrenreich H. et al. Erythropoietin a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9: 42-54, 2004
- (44) Ehrenreich H., Hasselblatt M., Dembrowski C. et al. Erythropoietin therapie for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 8: 495-505, 2002
- (45) Elliott S., Busse L., Bass M.B., Lu H., Sarosi I., Sinclair A.M., Spahr C., Um M., Van G., Begley C.G.. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood* 107(5):1892-5, 2006
- (46) Erbayraktar S. et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotektive activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6741-6746, 2003
- (47) Fenjves E.S., Ochoa M.S., Cabrera O. et al. Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptor. *Transplantation* 75: 1356-1360, 2003
- (48) Fisher J.W. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* 228:1-14, 2003
- (49) Fraser J.K., Tan A.S., Lin F.K. et al. Expression of specific high affinity binding sites for erythropoietin on rat and mouse megacaryocytes. *Exp Hematol* 17: 10-16, 1989
- (50) Fried M.G., Crothers D.M. Equilibria and Kinetics of Lac Repressor-Operator Interactions by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Nucl Acids Res*;9:6505-6525, 1981
- (51) Furukawa T. et. al. Primary familial polycythaemia associated with a novel point mutation in the erythropoietin receptor. *Br J Haematol.* 99(1):222-7, 1997

## **8. Literaturverzeichnis**

---

- (52) Galeano M., Altavilla D., Squadrito F. et al. Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Critical Care Med.* 34: 1139-1146, 2006
- (53) Garner M.M., Revzin A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon system. *Nucl Acids Res*;9:3047–3060, 1981
- (54) Genc S., Akhisaroglu M., Kuralay F., Genc K. Erythropoietin restores glutathione peroxidase activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in C57BL mice and stimulates murine astroglial glutathione peroxidase production in vitro. *Neurosci Lett* 321: 73-76, 2002
- (55) Gilman M. Ausubel E.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Siedman J.G., Smith J.A., Struhl K. Ribonuclease protection assay. *Cur Protoc Mol Biol* Ch4, 4.7, 2001
- (56) Gorio A., Gokmen N., Brines M. et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9450-9455, 2002
- (57) Gosset W.S. (Student) The probable error of an mean. *Biometrika* 6: 1-25, 1908
- (58) Gouilleux F., Pallard C., Dusanter-Fourt I., Wakao H., Haldosen L.A., Norstedt G., Levy D., Groner B. *EMPO J* 14: 2005-2013, 1995
- (59) Gregory C.J., Eaves A.C. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: Definition of three erythroid colony responses. *Blood* 49: 855, 1977
- (60) Hansen J.A., Lindberg K., Hilton D.J., Nielson J.H., Billestrup N. Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. *Mol Endocrinol* 13: 1832-1843, 1999
- (61) Hirata A., Minamino T., Hori M. et al. Erythropoietin enhances neovascularisation of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. *Journal of the American college of cardiology*, 48: 176-184, 2006
- (62) Imai N., Kawamura A., Higuchi M., Oh-eda M., Orita T., Kawaguchi T., Ochi N. Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin. *J Biochem(Tokio)* 1077: 352-359, 1990
- (63) Jaquet K., Krause K., Kuck K.H. et al. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Micovasc. Research*, 64: 326-333, 2002
- (64) Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 72: 449-489, 1992

## **8. Literaturverzeichnis**

---

- (65) Jelkmann W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rHuEPO and NESP. *Eur J Haematol* 69:265-274, 2002
- (66) Junk A.K., Mammis A., Savitz S.I., Singh M., Roth S., Brines M., Rosenbaum D.M. et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10659-10664, 2002
- (67) Juul S.E., Yachnis A.T., Christensen R.D. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum. Dev.*52: 235-249, 1998.
- (68) Kawakami M., Iwasaki S., Sato K., Takahashi M. Erythropoietin inhibits calcium-induced neurotransmitter release from clonal neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 293-297, 2000
- (69) Kilic U. et al. Erythropoietin protects from axotomy induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2. *FASEB J* 19: 249-251, 2004
- (70) Klingmüller U., Lorenz U., Cantley L.C., Neel B.G., Lodish H.F. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 80: 729-738, 1995
- (71) Klinken S.P., Nicola N.A. and Johnson G.R. In vitro-derived leukemic erythroid cell lines induced by a raf- and myc-containing retrovirus differentiate in response to erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(22):8506-10, 1988
- (72) Koshimura K., Murakami Y., Sohmiya M., Tanaka J., Kato Y. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem* 72: 2565-2572, 1999
- (73) Koury M.J., Bondurant M.C. The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem* 210: 649-663, 1992
- (74) Kwok S., Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 339(6221):237-8, 1989
- (75) Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*;227(5259):680-5, 1970.
- (76) Lee S.M. et al. EPO receptor-mediated ERK kinase and NF- $\kappa$ B activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 1087-1095, 2004
- (77) Lee S.H., Li C., Yang C.W. et al. Attenuation of interstitial inflammation and fibrosis by recombinant human erythropoietin in chronic cyclosporine nephropathy. *American Journal of Nephrology* 25: 64-76, 2005



## **8. Literaturverzeichnis**

---

- (78) Leist M. et al. Derivates of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 305: 239-242, 2004
- (79) Leverrier Y., Thomas J., Mathieu A.L., Low W., Blanquier B., Marvel J. Role of PI3-kinase in Bcl-xl induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. *Cell Death Differ* 6: 290-296, 1999
- (80) Lin Y., Benchimol S. Cytokines inhibit p53-mediated apoptosis but not p53-mediated a G1 arrest. *Mol Cell Biol.*: 6045-54, 1995
- (81) Liu C., Shen K., Liu Z., Noguchi C.T. Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *Journal of Biol. Chem.*, 272: 32395-32400, 1997.
- (82) Livnah O., Stura E.A., Middleton S.A., Johnson D.L., Jolliffe L.K., Wilson I.A. Crystallographic evidence for performed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 283: 987-990, 1999
- (83) Lundberg C., Winkler C., Whittemore S.R., Bjorklund A. Conditionally immortalized neural progenitor cells grafted to the striatum exhibit site-specific neuronal differentiation and establish connections with the host globus pallidus. *Neurobiol Dis.* 3(1):33-50, 1996
- (84) Macdougall L., Bailon P., Tare N., Pahlke W., Pill J., Brandt M. CERA(Continuous Erythropoiesis Receptoe activator) for the treatment of renal anemia: an innovative agent with unique receptor binding characteristics and prolonged serum half-life. *J Am Soc Nephrol* 14: 769A, 2003
- (85) Manchini D.M., Katz S.D., Androne A.S. et al. Effect of erythropoietin on exercise capacity patients with moderate to severe chronic heart failure. *Circulation* 107: 294-299, 2003
- (86) Martinez-Estrada O.M., Rodriguez-Millan E., Gonzales-De Vincente E., Fabre M. et al. Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci* 18: 2538-2544, 2003
- (87) Masuda S., Nagao M., Takahata K. et al. Functional erythropoietin receptor of the cells with neuronal characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 268: 11208-11216, 1993
- (88) Mioni R., Gottardello F., Bordon P. et al. Evidence for specific binding and stimulatory effects of recombinant human erythropoietin on isolated adult rat Leydig cells. *Acta Endocrinol(Copenh)* 127: 459-465, 1992
- (89) Mitsuma W., Ito M., Aizawa Y. et al. Cardioprotective effects of recombinant erythropoietin in rat with experimental autoimmune myocarditis. *Biochemical and biophysical research communications*, 344: 987-994, 2006

## **8. Literaturverzeichnis**

---

- (90) Miyajima A. Molecular structure of the IL-3, GM-CSF and IL-5 receptors. *Int J Cell Cloning*. 10(3):126-34, 1992
- (91) Morishita E., Masuda S., Nagao M., Yasuda Y., Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 76: 105-116, 1997
- (92) Mundt D., Berger M.R., Bode G., Effect of recombinant erythropoietin on the growth of human tumor cell lines in vitro. Microtiter-tetrazolium assay, *Arzneimittelforschung* 42: 92-95, 1992
- (93) Nagai A., Nakagawa E., Choi H.B., Hatori K., Kobayashi S., Kim S.U. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes growth in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 386-392, 2001
- (94) Nakamura Y., Takano H., Nakauchi H. Et al. Impaired erythropoiesis in transgenic mice overexpressing a truncated erythropoietin receptor. *Exp. Hematol.* 26: 1105-10, 1998.
- (95) Nakano M., Satoh K., Shimokawa H. et al. Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice. *Circ. Res.* 100: 662-669, 2007.
- (96) Ogilvie M., Yu X., Nicolas-Metral V. et al. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem* 275: 39754-39761, 2000
- (97) Palacios R., Henson G., Steinmetz M., McKearn J.P. Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature*. 309(5964):126-31, 1984
- (98) Pandolfi M.E., Roth A., Lindenbaum M.H. et al. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis . *Nat Genet* 11: 40-44, 1995
- (99) Pawson T., Gish O.D., SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 71(3): 359-62, 1992
- (100) Pei D., Wang J., Walsh C.T. Differential functions of the two Src homology 2 domains in protein tyrosine phosphatase SH-PTP1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(3):1141-5. 1996
- (101) Pollock K., Stroemer P., Patel S. et al. A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol* 199: 143-55, 2006.
- (102) Prunier F., Pfister O., Hajjar R.J. et al. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *Am J of Phys. Heart and Circ Phys* 292: 522-529, 2007

## **8. Literaturverzeichnis**

---

- (103) Prutchi-Sagiv S., Golishevsky N., Mittelman M. et al. Erythropoietin treatment in advanced multiple myeloma is associated with improved immunological function: could it be beneficial in early disease? *British journal haematology*, 135: 660-672, 2006
- (104) Quelle F.W., Wang D., Nosaka T., Thierfelder W.E., Stravopolis D., Weinstein Y., Ihle J.N. *Mol Cell Biol* 16: 1622-1631, 1996
- (105) Ren H.Y., Komatsu N., Shimizu R., Okada K., Miura Y. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 in a human erythropoietin-dependent cell line. *J Biol Chem* 269: 19633-19638, 1994
- (106) Rosenberger C., Mandriota S., Jurgensen J.S., et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 13: 1721-1732, 2002
- (107) Rosti V., Pedrazzoli P., Ponchio L. et al Effekt of recombinant erythropoietin on hematopoietic and non-hematopoietic malignant cell growth in vitro. *Haematologica* 78: 208-212, 1993
- (108) Rotter R, Menshykova M, Winkler T, Matziolis G, Stratos I, Schoen M, Bittorf T, Mittlmeier T, Vollmar B. Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue. *J Orthop Res.* 26(12):1618-26, 2008.
- (109) Rottman J.B. The ribonuclease protection assay: a powerful tool for the veterinary pathologist. *Vet Pathol* 39, 2-9, 2002.
- (110) Ruscher K., Freyer D., Karsch M., Isaev N., Megow D., Sawitzki B., Priller J., Dirnagl U., Meisel A. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* 22: 10291-10301, 2002
- (111) Rush R.S., Derby P.L., Smith D.M., Merry C., Rogers G., Rohde M.F., Katta V. Microheterogeneity of erythropoietin carbohydrate structure. *Anal Chem* 67: 1442-1452, 1995
- (112) Sadamoto Y., Igase K., Sakanaka M. et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 26-32, 1998
- (113) Sakanaka M., Wen T.C., Matsuda S., Masuda S., Morishita E., Nagao M., Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4635-4640, 1998
- (114) Sanger F, Nicklen S, Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.*;74(12):5463-7, 1977.

## **8. Literaturverzeichnis**

---

- (115) Saiki R.K., Walsh P.S., Levenson C.H., Erlich H.A. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(16):6230-4, 1989
- (116) Sasaki H., Bothner B., Dell A., Fukuda M. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem* 262: 12059-12076, 1987
- (117) Sasaki H., Ochi N., Dell A., Fukuda M., Site-specific glycosilation of human recombinant erythropoietin: analysis of glycopetides or peptides at each glycosilation site by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biochemistry* 27: 8618-8626, 1988
- (118) Schorle H., Meier P., Buchert M., Jaenisch R., Mitchel P.J. Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381: 235-238, 1996
- (119) Selzer E., Wacheck V., Kodym R. et al. Erythropoietin receptor expression in human melanoma cells. *Melanom Res* 10: 421-426, 2000
- (120) Shams I., Nevo E., Avivi A., Erythropoietin receptor spliced forms form differentially expressed in blind subterranean mole rats. *Faseb* 19 (12): 1749-51, 2005.
- (121) Shimizu R., Komatsu N., Miura Y. et al. Dominant negative effect of truncated erythropoietin receptor (EPOR-T) on erythropoietin-induced erythroid differentiation, possible involvement of EPOR-T in ineffective erythropoiesis of myelodysplastic syndrome. *Exp. Hematol.* 27: 229-33, 1999.
- (122) Shingo T., Sorokan S.T., Shimazaki T., Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 21: 9733-9743, 2001
- (123) Silva M., Benito A., Sanz C., Prosper F., Ekhterae D., Nunez G., Fernandez-Luna J.L. Erythropoietin can induce the expression of Bcl-xl through STAT5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem* 274: 22165-22169, 1999
- (124) Silverberg D.S., Wexler D., Iaina A. et al. The effect of correction of anaemia in diabetics and non-diabetics with severe resistant congestive heart failure and chronic renal failure by subcutaneous erythropoietin and intravenous iron. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 18: 141-146, 2003
- (125) Sinor A.D., Greenberg D.A. Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci, Lett* 290: 213-215, 2000
- (126) Siren A.L., Fratelli M., Brines M., Goemans C., Ghezzi P. et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4044-4049, 2001

## **8. Literaturverzeichnis**

---

- (127) Skibeli V., Nissen-Lie G., Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* 98: 3626-3634, 2001
- (128) Socolovsky M., Fallon A.E., Wang S., Brugnara C., Lodish H.F. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in STAT5a<sup>-/-</sup>5b<sup>-/-</sup> mice: a direct role for STAT5 in Bcl-xl induction. *Cell* 98: 181-191, 1999
- (129) Spandou E., Tsouchnikas I., Tsakiris D. et al. Erythropoietin attenuates renal injury in experimental acute renal failure ischaemic/reperfusion model. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 21: 330-336, 2006
- (130) Suzuki N., Ohneda O., Takahashi S., Higuchi M., Mukai H.Y., Nakahata T., Imagawa S., Yamamoto M. Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood*; 100(7): 2279-88, 2002
- (131) Syad R.S., Reid S.W., Stroud R.M. et al. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* 395: 511-6 1998
- (132) Tauchi T., Feng G.S., Shen R. et al. Involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp in erythropoietin receptor signal transduction pathways. *J Biol Chem* 270: 5631-5635, 1995
- (133) Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*. 1992;24:145-9, 1979
- (134) Tsuchiya D., Hong S., Rajdev S., Panter S., Weinstein P. Evaluation of the neuroprotective effect of erythropoietin in cerebral ischemia produced by the intraluminal suture model. *Soc Neurosci Abstr* 764.17, 2001
- (135) Um M., Gross A.W., Lodish H.F. et al. A "classical" homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cell Signal*, 2006
- (136) Van der Meer P., Lipsic E., Schoemaker R.G. et al. Erythropoietin induces neovascularisation and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *Journal of the American college of cardiology* 46: 125-133, 2005
- (137) Vesey D.A., Cheung C., Pat B., Endre Z., Gobe G., Johnson D.W. Erythropoietin protects against ischemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 19: 348-355, 2004
- (138) Villa P., Bigini P., Mennini T., Ghezzi G. et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* 198: 971-975, 2003

## **8. Literaturverzeichnis**

---

- (139) Vogelstein B., Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;76(2):615-9, 1979.
- (140) Wagner K.U., Claudio E., Rucker E.B., Riedlinger G., Hennighausen L. et al. Conditional deletion of the Bcl-xl-gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development* 127: 4949-4958, 2000
- (141) Wang G.L., Semenza G.L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4304-4308, 1993
- (142) Watanabe D., Suzuma K., Takagi H. et al. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *New Engl. Jou. of Med.* 353: 782-792, 2005
- (143) Weinelt S., Peters S., Bauer P., Mix E., Haas S.J., Dittmann A., Petrov S., Wree A., Cattaneo E., Knoblich R., Strauss U., Rolfs A. Ciliary neurotrophic factor overexpression in neural progenitor cells (ST14A) increases proliferation, metabolic activity, and resistance to stress during differentiation. *J Neurosci Res.* 71(2):228-36, 2003
- (144) Wen T.C., Sadamoto Y., Tanaka J., Zhu P.X., Nakata K., Ma Y.J., Hata R., Sakanaka M. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xl expression. *J Neurosci Res* 67: 795-803, 2002
- (145) Westenbrink B.D., Lipsic E., Schoemaker R.G. et al. Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularisation. *Eur Hearth Journal* 28: 2018-2027, 2007.
- (146) Westenfelder C., Biddle D.L., Baranowski R.L. Human, rat and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int* 55: 808-820,1999
- (147) Westenfelder C., Baranowski R.L. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int* 58: 647-657, 2000
- (148) Willingham A.T., Gingeras T.R. TUF love for "junk" DNA. *Cell.* 125(7):1215-20, 2006.
- (149) Witthuhn B.A., Quelle F.W., Silvennoinen O., et al. Jak2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74: 227-236, 1993
- (150) Wojchowski D.M., Gregory R.C., Miller C.P., Pandit A.K., Pircher T.J. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 253: 143-156, 1999
- (151) Wu H., Lee S.H., Gao J., Liu X., Iruela-Arispe M.L. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 126: 3597-3605, 1999
- (152) Yamaji R., Murakami C., Nakano Y. et al. The intron 5-inserted form of rat erythropoietin receptor is expressed as a membrane-bound form. *Bioch. Et Biophys. Acta* 1403: 169-178, 1998.

## **8. Literaturverzeichnis**

---

- (153) Yang C.W., Li C., Bang B.K. et al. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB Journal* 17: 1754-1755, 2003
- (154) Yasuda Y., Fujita Y., Matsuo T. et al. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 24: 1021-1029, 2003
- (155) Yoder M.C., Mead L.E., Ingram D.A. et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 109: 1801-1809, 2007.
- (156) Youssoufian H., Longmore G., Neumann D., Yoshimura A., Lodish H.F. Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 81:2223-2236, 1993
- (157) Yu X., Shacka J.J., Eells J.B., Noguchi C.T. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 129: 505-516, 2002
- (158) Zhang J., Li Y., Chopp M. et al. Erythropoietin treatment improves neurological function recovery in EAE mice. *Brain research* 1034: 34-39, 2005.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

---

### 9. Abkürzungsverzeichnis

|                 |   |
|-----------------|---|
| AKT             | Proteinkinase B                                   |
| amol/l          | Atto/Trillionstel/SI Einheit Stoffmenge pro Liter |
| AP              | Inhibitor-of-apoptosis protein                    |
| AP-1            | Activating protein 1                              |
| AS              | Aminosäure  |
| ATP             | Adenosin Triphosphat                              |
| Ba/F3           | B-cell activating factor 3(=Interleukin 3)        |
| BAD             | Bcl-2-antagonist-of-cell-death                    |
| BALB/c          | Bagg albino/line c                                |
| βcR             | Beta-common receptor                              |
| Bcl-2           | B-cell lymphoma/leukemia-2                        |
| Bcl-xl          | Member of the Bcl-2 family of proteins            |
| bp              | Basenpaare  |
| BPV-Zellen      | Bovine papillomavirus type                        |
| BrdU            | 5-bromo-2'-deoxyuridine                           |
| BSA             | Bovine serum albumin                              |
| cDNA            | Complementary deoxyribonucleic acid               |
| CFU-E           | Colony-forming units-erythroid                    |
| CIS 1           | Cytokine inducible SH2-containing protein 1       |
| CNTF            | Ciliary neuronotrophic factor                     |
| CO <sub>2</sub> | Kohlendioxid                                      |
| CTP             | Cytidinetriphosphate                              |
| CX              | Cortex  |
| D-MEM           | Dulbecco's modified Eagle's medium                |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid                                  |
| DNA             | Deoxyribonucleic acid                             |
| dNTP            | Desoxyribonukleosidtriphosphate                   |
| DTT             | Dithiothreitol                                    |
| ECL             | Enhanced chemiluminescence                        |
| EDTA            | Ethylendiamintetraacetat                          |
| EMBL            | European molecular biology laboratory             |
| EMSA            | Electrophoretic mobility shift assay              |
| EPC's           | Endothelial progenitor cells                      |



## 9. Abkürzungsverzeichnis

---

|                  |  |
|------------------|--|
| EPO              | Erythropoetin                                    |
| EPOR             | Erythropoetinrezeptor                            |
| EPOR-WT          | Erythropoetinrezeptor-Wildtyp                    |
| ERK1/2           | Extracellular signal-regulated kinases (=MAPK)   |
| FCS              | Fetal calf serum                                 |
| G418             | Geneticin  |
| GAPDH            | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase         |
| GATA             | Transcription factor recognizes the motif WGATAR |
| G-CSF            | Granulocyte-colony stimulating factor            |
| GDNF             | Glial cell line-derived neurotrophic factor      |
| GM-CSF           | Granulocyte-macrophage colony stimulating factor |
| Gpt              | Giga-Parts                                       |
| Grb2             | Growth factor receptor-bound protein             |
| GTP              | Guanosintriphosphat                              |
| H <sub>2</sub> O | Wasser   |
| HCT              | Hämatokrit                                       |
| HEPES            | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-2-ethansulfonsäure |
| HGB              | Hämoglobin                                       |
| HIF              | Hypoxia induced factor                           |
| IAP              | Inhibitor of apoptosis                           |
| IL               | Interleukin                                      |
| J2E              | J2 retrovirus erythroid cells                    |
| JAK              | Januskinase                                      |
| kDa              | Kilodalton                                       |
| kHz              | Kilohertz  |
| LIF              | Leukemia inhibitory factor                       |
| MAP2             | Microtubule associated protein 2                 |
| MAPK             | Mitogene activated protein kinase                |
| MAPKK            | Mitogene activated protein kinase kinase         |
| MCH              | Mean corpuscular haemoglobin                     |
| MCHC             | Mean corpuscular haemoglobin concentration       |
| MCV              | Mean corpuscular volume                          |
| mEPOR            | Muriner Erythropoetinrezeptor                    |
| mM               | Millimolar                                       |

## 9. Abkürzungsverzeichnis

---

|              |  |
|--------------|--|
| M-MLV        | Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase                      |
| mmol         | Millimol   |
| mRNA         | Messenger ribonucleic acid   |
| NF-kB        | Nuclear factor kappa-B is a transcription factor                         |
| NIH          | National Institutes of Health  |
| NMDA         | N-Methyl-D-Aspartat  |
| NO           | Stickstoffmonoxid  |
| p70S6-Kinase | Proteinkinase (Molekulargewicht 70 kDA, Substrat S6 ribosomales Protein) |
| PBS          | Phosphat buffered saline   |
| PCR          | Polymerase chain reaction  |
| pH           | Potentia Hydrogenii  |
| PI3K         | Phosphoinositol-3-Kinase   |
| PLT          | Platelets  |
| PVDF         | Polyvinyliden-Difluorid  |
| RAF-1        | Murine leukemia oncogene homolog 1(MAP3K)                                |
| RAS          | Rat sarcoma proto-onkogen  |
| RBC          | Red bloodcell count  |
| rEPOR        | Ratten-Erythropotinrezeptor  |
| rHuEPO       | Rekombinantes humanes Erythropoetin                                      |
| RNA          | Ribonucleic acid   |
| RNAse        | Ribonuklease   |
| RPA          | RNAse protection assay   |
| RPMI         | Roswell Park Memorial Institute Kulturmedium                             |
| RT           | Raumtemperatur   |
| RT-PCR       | Reverse transkriptase-polymerase chain reaction                          |
| SDS          | Sodiumdodecylsulfat  |
| SH2          | Src homology 2   |
| SHP          | Src homolog phosphatase 2  |
| SHP1/2       | Src homology tyrosine phosphatase  |
| SOCS         | Suppressor of cytokine signalling  |
| SOD          | Superoxiddismutase   |
| SOS1         | Son of sevenless homolog 1   |
| SP6          | Plasmidpromotor SP6  |
| Src          | Sarcoma  |

## 9. Abkürzungsverzeichnis

---

|                |   |
|----------------|---|
| STAT           | Signal transducer and activator of transcription  |
| SV40           | Inactivator of tumor suppressor Simian virus SV40 |
| TAQ            | Thermus aquaticus                                 |
| TBE            | Tris-Borat-EDTA                                   |
| TE             | Tris-EDTA   |
| TEMED          | N,N,N',n',-Tetramethylethylenediamin              |
| T <sub>m</sub> | Melting temperature                               |
| TNF- $\alpha$  | Tumor necrosis factor- $\alpha$                   |
| UTP            | Uridintriphosphat                                 |
| VEGF           | Vascular endothelial growth factor                |
| VM             | Ventrales Mesenzephalon                           |
| v-myc          | Myelocytomatosis viral oncogene                   |
| WBC            | White blood cells                                 |
| X-gal          | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid   |
| ZNS            | Zentrales Nervensystem                            |

## **10. Thesen**

---

### **10. Thesen**

1. Das Cytokin Erythropoetin (EPO) wird in peritubulären Zellen der Niere produziert und ist essentiell für die Proliferation und Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen in reife Erythrozyten.
2. Der Erythropoetinrezeptor (EPOR) gehört zum Typ1 der Cytokinrezeptorsuperfamilie und wird auf erythroiden Vorläuferzellen (CFU-E) sowie nichterythroiden Zellen exprimiert.
3. Der EPOR wird im humanen und murinen System außerhalb des hämatopoetischen Systems auch auf neuronalen Zellen exprimiert.
4. Die aus Rattenhirn etablierte neuronale Progenitorzelllinie ST14A exprimiert den EPOR-WT, dies ist mittels PCR, RNase protection assay und Immunoblotting nachweisbar.
5. In neuronalen Kulturzellen und primären Zellen der Ratte sind darüber hinaus zwei alternative EPOR nachweisbar.
6. Die Varianten des EPOR entstehen durch alternatives Spleißen der Introns 5 bzw. 7.
7. Es bestehen deutliche Expressionsveränderungen nach hypoxischer Reizung beim EPOR-WT sowie den varianten EPOR.
8. Vergleichende Untersuchungen in humanen und murinen Zellen zeigen, dass auch hier die Spleißvariante mit Intron 7 nachweisbar ist.
9. Der alternativ gespleißte EPOR mit Intron 7 unterscheidet sich bei Mensch, Maus einerseits und Ratte andererseits deutlich in der Aminosäuresequenz.
10. Bei der Ratte entsteht durch alternatives Spleißen von Intron 5 ein verkürzter Rezeptor ohne funktionelle intrazelluläre Domänen, beim alternativen Spleißen von Intron 7 wird die intrazelluläre Domäne verlängert, die funktionellen AS-Reste bleiben erhalten.
11. Die Überexpression des EPOR und der beiden Spleißvarianten hat unterschiedliche Effekte auf die untersuchten Zellen.
12. Zellen, die den EPOR mit Intron 5 überexprimieren zeigen nach EPO-Stimulation kein gesteigertes Wachstum, Zellen die den EPOR mit Intron 7 überexprimieren proliferieren deutlich nach EPO-Stimulation.
13. Der proliferationsfördernde Effekt der EPO-Stimulation ist bei der alternativen Rezeptorvariante mit Intron 7 größer als beim EPOR-WT.

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Expression von Erythropoetinrezeptoren in Zellen außerhalb des hämatopoetischen Systems und deren funktioneller Relevanz“ im Institut für medizinische Biochemie Molekularbiologie der Universität Rostock unter Leitung von Prof. Dr. med. Markus Tiedge mit Unterstützung durch PD Dr. rer. nat Thomas Bittorf ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Rostock, 15.08.2010

Simon Bodganow