

**Zell- und molekularbiologische Untersuchungen eines EPO-
mimetischen Peptides während der präklinischen Phase der
Arzneimittelentwicklung**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Alexandra Greindl
aus Düren

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Ralf Weiskirchen
Universitätsprofessor Dr. techn. Werner Baumgartner

Tag der mündlichen Prüfung:
03. November 2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I-II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungen	IV
Zusammenfassung	V
Summary	VI
1 Einleitung	1
1.1 Erythropoetin (EPO)	1
1.2 Blut: Zusammensetzung und Funktionen	2
1.3 Hämatopoese	2
1.4 Erythropoese	4
1.5 JAK-STAT-Signalweg.....	6
1.6 EPO als Therapeutikum	9
1.7 Nebenwirkungen von EPO	10
1.8 EPO-Präparate.....	11
1.9 AGEM400-HES: ein EPO-mimetisches Peptid.....	13
1.10 Ziel der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien, Chemikalien.....	17
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Identifizierung von AGEM400.....	19
2.2.2 Synthese EPO-mimetischer Peptide (EMP).....	19
2.2.2.1 Synthese des linearen AGEM400-Peptides	20
2.2.2.2 Einführung der ersten Disulfid-Bindung	21
2.2.2.3 Einführung der zweiten Disulfidbrücke.....	21
2.2.2.4 Entschützung der endständigen Cysteine.....	22
2.2.2.5 Konjugation an HES (Hydroxyethylstärke)	22

2.2.3	Allgemeine Zellkultur: Medien und Kultivierung tierischer Zelllinien	23
2.2.3.1	Bestimmung der Gesamtzellzahl	23
2.2.3.2	Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau	23
2.2.3.3	Auftauen von Zellen	23
2.2.3.4	Einfrieren von Zellen	24
2.2.3.5	Responsivitätstest.....	24
2.2.4	Verwendete Zellen und Zelllinien	24
2.2.4.1	TF-1	24
2.2.4.2	UT-7/EPO	25
2.2.4.3	M07e	25
2.2.4.4	SupT1	25
2.2.4.5	Mononukleäre Zellen (MNC)	25
2.2.5	Ficoll Dichtegradienten: Separation mononukleärer Zellen aus Knochenmark	26
2.2.6	Proliferationsnachweis mittels MTS-Assay	26
2.2.7	Durchflusszytometrie: FACS-Analyse	28
2.2.8	Detektion des EPO-Rezeptors (EPO/R) und des IL-3-Rezeptors (CD131) auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien.....	28
2.2.9	Untersuchung apoptotischer Prozesse	29
2.2.9.1	Nachweis von Annexin V	30
2.2.9.2	Nachweis aktiver Caspasen.....	30
2.2.10	Differenzierungsnachweise	30
2.2.10.1	Nachweis der CD34-Abnahme bei TF-1-Zellen	30
2.2.10.2	CFU-(Colony-Formation-Unit-) Assay	32
2.2.10.3	Nachweis von CD36 und GlycophorinA (CD235a).....	34
2.2.10.4	Herstellung von Zellextrakten aus Methylcellulose-Kulturen zur Hämoglobinbestimmung	36
2.2.10.5	Hämoglobin-Bestimmung nach Luftig (1977)	36
2.2.11	Untersuchungen zur Rezeptorbindung.....	38
2.2.11.1	Kompetitionsassay mit einem löslichen EPO/R (sEPO/R) in TF-1 und UT-7/EPO	38
2.2.11.2	Qualitative Bestimmung des Antagonismus zwischen transmembranem (endogenem) und löslichem EPO/R.....	38
2.2.11.3	Radioliganden-Bindungsassay.....	38

2.2.12	Untersuchungen zur Signaltransduktion	39
2.2.12.1	Aktivierung von STAT5	39
2.2.12.2	Aktivierung von ERK1/2	40
2.2.12.3	Herstellung von Zellextrakten.....	40
2.2.12.4	Diskontinuierliche SDS-PAGE	40
2.2.12.5	Coomassie-Färbung	41
2.2.12.6	Western Blotting.....	41
2.2.12.7	Immunodetektion von STAT5, Phospho-STAT5, ERK1/2 und P-ERK1/2 aus Zellextrakten.....	41
2.2.13	Immunologische Untersuchungen.....	43
2.2.13.1	Eurogentec: Immunisierung von Kaninchen.....	43
2.2.13.2	Immunodetektion von Erypo® und EMPs mit Antiseren	44
2.2.13.3	Charles River: Immunisierung von Schafen	44
2.2.13.4	Sandwich-ELISA: Konzentrationsbestimmung von EMPs in verschiedenen Verdünnungsmedien.....	45
2.2.14	Auswertung und Präsentation der Daten	46
2.2.14.1	Dosis-Wirkungskurven	47
2.2.14.2	Signal-Rausch-Verhältnisse.....	48
2.2.14.3	Bestimmung der intrinsischen Agonisten-Aktivität a	48
2.2.14.4	FACS-Analysen	49
2.2.14.5	CFU-Assays.....	50
2.2.14.6	Schild Plot Analyse: UT-7/EPO-Zellen.....	50
2.2.14.7	ELISA: untere Nachweisgrenze	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Gelelektrophoretische Analysen von AGEM400-HES.....	52
3.2	EPO/R und CD131 auf der Oberfläche hämatopoetischer Zelllinien	54
3.3	Responsivität von UT-7/EPO und TF-1-Zellen in Zytokin-Assays	56
3.4	MTS-Proliferationsassays mit den Zelllinien TF-1 und UT-7/EPO.....	58
3.4.1	TF-1-Zellen.....	58
3.4.2	UT-7/EPO-Zellen.....	62
3.4.3	Interassay-Vergleich der EC50-Werte bzw. der relativen Effizienz	66
3.5	Apoptose	67
3.5.1	Aktivierung von Caspase-3, -7 und -8 in TF-1-Zellen.....	67
3.5.2	Annexin V-Nachweis früh apoptotischer Zellen.....	70

3.5.3	Detektion toter Zellen mit Propidiumiodidfärbung.....	73
3.6	Differenzierung.....	74
3.6.1	CD-34 Verlust in TF-1-Zellen	74
3.6.2	CFU-Assays	77
3.6.3	CD36/GlycophorinA (CD235a)	80
3.6.4	Nachweis der Hämoglobinbildung in Affenzellen	81
3.7	Untersuchungen zur Rezeptorbindung.....	83
3.7.1	Kompetitionsassays	83
3.8	Aktivierung von STAT5 und ERK1/2 in UT-7/EPO	89
3.9	Immunologische Untersuchungen.....	91
3.9.1	Nachweis von Kreuzreaktionen zwischen anti-EPO-Antikörpern und EPO-mimetischen Peptiden	91
3.10	ELISA: Nachweis von AGEM400 und AGEM400-HES in verschiedenen Verdünnungsmedien	93
4	Diskussion.....	95
5	Literatur	102
6	Veröffentlichungen	107
7	Anhang	108

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abb. 1.1: Hämatopoese	3
Abb. 1.2: Erythropoese (Knochenmark)	5
Abb. 1.3: Aktivierung von STAT5 über den JAK-STAT-Signalweg	7
Abb. 1.4: Aktivierung von ERK1/2 über den Ras-Raf-Signalweg.....	8
Abb. 1.5: Bindung eines EPO-Moleküls bzw. eines EMP-Dimers an den EPO- Rezeptor	12
Abb. 1.6: Sequenz- und Strukturoptimierung eines EPO-mimetischen Peptides.....	15

Material und Methoden

Abb. 2.1: Aufreinigung des bizyklischen AGEM400 mittels HPLC-MS an einer C18-Säule	22
Abb. 2.2: Digitalaufnahmen verschiedener Kolonietypen (CFU-Assay).....	33

Ergebnisse

Abb. 3.1: SDS-Gelelektrophorese von BB68 und AGEM400.....	53
Abb. 3.2: SDS-Gelelektrophorese von AGEM400 und AGEM400-HES	53
Abb. 3.3: Expression von EPO/R und CD131 auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien.	55
Abb. 3.4: UT-7/EPO; MTS-Assay: Responsivität auf Zytokine	56
Abb. 3.5: TF-1; MTS-Assay: Responsivität auf Zytokine	57
Abb. 3.6: TF-1; MTS-Assay: Dosis-Wirkungsprofil	58
Abb. 3.7: TF-1; MTS-Assay: nicht-lineare Regression.....	60
Abb. 3.8: TF-1; MTS-Assay: normierte Werte.....	61
Abb. 3.9: UT-7/EPO; MTS-Assay: Dosis-Wirkungsprofil	62
Abb. 3.10: UT-7/EPO; MTS-Assay: nicht-lineare Regression.....	63
Abb. 3.11: UT-7/EPO; MTS-Assay: normierte Werte.....	64
Abb. 3.12: TF-1; FACS-Analyse: Inhibierung von Caspasen.....	68
Abb. 3.13: TF-1; Inhibierung von Caspasen: nicht-lineare Regression.....	69
Abb. 3.14: Annexin V: Inhibition apoptotischer Prozesse in TF-1	71
Abb. 3.15: Detektion toter Zellen mit Propidiumiodid.....	73
Abb. 3.16: CD34-Verlust auf TF-1-Zellen	74
Abb. 3.17: TF-1; CD34-Verlust: normierte Werte.....	75

Abb. 3.18: TF-1; CD34-Verlust: nicht-lineare Regression.....	76
Abb. 3.19: CFU-Assay; Differenzierung von Knochenmarkzellen (Mensch, Cynomolgus).....	78
Abb. 3.20: Prozentuale erythroide Differenzierung von Knochenmarkzellen im CFU-Assay	79
Abb. 3.21: CD36 und GlycophorinA auf der Oberfläche humaner MNCs aus Knochenmark.....	80
Abb. 3.22: Erythropoese von Knochenmarkzellen (MNC) aus Cynomolgus und Pavian.....	82
Abb. 3.23: Bindung von AGEM400-HES an den EPO/R von TF-1 und UT-7/EPO...	84
Abb. 3.24: Radioliganden-Bindungsassay.....	85
Abb. 3.25: UT-7/EPO, MTS-Assay: Konkurrenz des membranständigen EPO/R....	87
Abb. 3.26: UT-7/EPO, Schild-Plot-Analyse: kompetitiver Antagonismus.....	88
Abb. 3.27: UT-7/EPO, lineare Regression: Abnahme EPO-induzierter Proliferation durch kompetitiven Antagonisten.....	88
Abb. 3.28: Western Blot Analyse: Aktivierung von STAT5 in UT-7/EPO	89
Abb. 3.29: Western Blot Analyse: Aktivierungsdauer von STAT5 in UT-7/EPO	90
Abb. 3.30: Western Blot Analyse: Aktivierungsdauer von ERK1/2 in UT-7/EPO	90
Abb. 3.31: Western Blot Analyse: immunologische Divergenz zwischen EPO und EPO-mimetischen Peptiden.....	91
Abb. 3.32: TF-1, MTS-Assay: immunologische Divergenz zwischen EPO und AGEM400-HES.....	92
Abb. 3.33: ELISA: Detektion von AGEM400 und AGEM400-HES.....	94

Diskussion

Abb. 4.1: Modell: Bindungsarten von AGEM400-Peptiden an den EPO/R	97
---	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Berechnung der intrinsischen Agonisten-Aktivität	59
Tabelle 3.2:	Vergleich der Effekte von AGEM400-HES in TF-1 und UT-7/EPO	65
Tabelle 3.3:	MTS-Interassay-Vergleich: EC50-Werte	66
Tabelle 3.4:	FACS-Analyse: Inhibierung von Caspasen in TF-1-Zellen.....	70
Tabelle 3.5:	Annexin V: Inhibition apoptotischer Prozesse in TF-1.....	72
Tabelle 3.6:	EC50-Werte (TF-1, CD34-Verlust).....	76
Tabelle 3.7:	Hämoglobinwerte erythroider Zellen aus Cynomolgus und Pavian....	81
Tabelle 3.8:	Radioliganden-Bindungs-Assay; IC50-Werte.....	85
Tabelle 3.9:	EC-50-Werte: kompetitive Abnahme der Proliferation in UT-7/EPO ..	87
Tabelle 3.10:	ELISA: Detektion von AGEM400 und AGEM400-HES	93

Abkürzungen

Abb.	: Abbildung
BSA	: Bovine Serum Albumin
DMSO	: Dimethylsulfoxid
DTT	: Dithiothreitol
EC50	: <i>Effective Concentration 50</i>
EDTA	: Ethylendiamintetraacetat
ELISA	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPO	: Erythropoetin
EPO/R	: Erythropoetin-Rezeptor
ESA	: Erythropoiesis stimulating agents
FCS	: Fetal Calf Serum
FITC	: Fluoresceinisothiocyanat
HBSS	: Hanks Buffered Saline Solution
HES	: Hydroxyethylstärke
HRP	: Horseradish-Peroxidase
IgG	: Immunglobulin G
JAK	: Janus Kinase
kD	: kiloDalton
MNC	: Mononuclear Cells
PAGE	: Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PE	: Phycoerythrin
PEG	: Polyethylenglycol
PI	: Propidiumiodid
PRCA	: Pure Red Cell Anemia
PVDF	: Polyvinylidenfluorid
rhEPO	: rekombinantes humanes EPO
rpm	: rounds per minute
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfat
sEPO/R	: soluble EPO-receptor
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
TBS(T)	: Tris Borat EDTA Puffer (inkl. Tween-20)

Zusammenfassung:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde BB68 als potentes EPO-mimetisches Peptid identifiziert. Sein Wirkprofil wurde *in vitro* als monomeres Peptid (BB68), als homodimeres Peptid (AGEM400) bzw. als ein an Hydroxyethylstärke (HES) gekoppeltes Multimer (AGEM400-HES) charakterisiert. Der Schwerpunkt der Analyse wurde auf AGEM400-HES gesetzt, das aus einem HES-Molekül besteht, an das durchschnittlich fünf dimere AGEM400-Peptide multivalent gekoppelt wurden.

Für alle untersuchten Parameter zeigte AGEM400-HES eine sehr effiziente EPO-mimetische Wirkung. Es wurde vergleichend die Wirkung von AGEM400-HES und rekombinantem EPO auf die Proliferation, Apoptose und Differenzierung von hämatopoetischen Zelllinien untersucht.

AGEM400-HES induzierte je nach Zelllinie mit gleicher Effizienz wie EPO, die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung in einer konzentrationsabhängigen Weise. Versuche mit Primärzellen aus dem Knochenmark von Mensch bzw. Affen bekräftigten diese Befunde.

Weiterhin ergaben die Untersuchungen zur Rezeptorbindung, dass die Wirkung von AGEM400-HES spezifisch über den EPO-Rezeptor verläuft und EPO-spezifische Signalwege induziert. In hämatopoetischen Zelllinien wurde gezeigt, dass AGEM400-HES die Phosphorylierung von STAT5 (JAK/STAT-Signalweg) und ERK1/2 (Ras/Raf-Signalweg) bewirkt.

Antikörper gegen EPO, BB68 und AGEM400 wurden generiert und auf Kreuzreaktionen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass EPO und die EPO-mimetischen Peptide immunologisch divergent sind.

Es wurde ein ELISA entwickelt, mit dessen Hilfe AGEM400 und AGEM400-HES in Human- und Rattenserum detektiert werden kann. Die Sensitivität liegt vermutlich in einem klinisch relevanten Konzentrationsbereich. Damit steht bereits ein Nachweisverfahren von AGEM400 bzw. AGEM400-HES für folgende pharmakokinetische und klinische Studien zur Verfügung.

AGEM400-HES ist ein potenter und vielversprechender Kandidat für eine neuartige „EPO-Therapie“, deren Vorteile u.a. in der chemischen Synthese, der Biodegradierbarkeit des Carriers (HES) und der immunologischen Divergenz liegen. Letzteres würde besonders für Patienten, die Antikörper gegen das endogene und rekombinante Protein Erythropoetin während der EPO-Therapie generiert haben, einen wichtigen Vorteil darstellen.

Ein mimetisches Peptid könnte für diese Patienten eine alternative Behandlungsmöglichkeit der Anämie sein.

Summary:

In this doctoral thesis BB68 was identified as a potent monomeric EPO-mimetic peptide. One of the main tasks was to characterize the *in vitro* effects of the monomeric peptide (BB68), of the homodimeric peptide (AGEM400) and of the multimeric form AGEM400-HES. The centre of the analysis was focused on AGEM400-HES where on the average of five peptide dimers are coupled multivalent to hydroxyethylstarch (HES).

AGEM400-HES showed strong EPO-mimetic effects for all investigated parameters. The effects of AGEM400-HES on proliferation, apoptosis and differentiation of hematopoietic cells were analysed and compared to the EPO-induced effects.

Dependent on the cell line AGEM400-HES induced proliferation, survival and differentiation in a dose-dependent manner and with an efficacy which is comparable to that of EPO.

Experiments with primary cells of bone marrow from human and monkey confirmed the results.

Further on investigations of the receptor binding showed that AGEM400-HES bound specifically to the EPO-receptor and induced same signaling pathways as EPO. AGEM400-HES caused the phosphorylation of STAT5 (JAK/STAT-signaling pathway) and of ERK1/2 (Ras/Raf-signaling pathway) in hematopoietic cell lines.

After the generation of antibodies against EPO, BB68 and AGEM400 it was analysed if there were any crossreactions between the different antibodies and antigens. But no crossreactions could be detected. Both mimetic peptide forms were immunological completely different from EPO.

A very sensitive ELISA for detecting AGEM400 and AGEM400-HES in human serum and rat serum respectively was developed. The detectable concentration range supposable may be in a clinical relevant range and it could be used as a verification procedure for further pharmacokinetic and clinical studies.

AGEM400 is a potent and a promising candidate for a novel "EPO-therapy". The main advantages are the possibility of a chemical synthesis, the biodegradable carrier molecule (HES) and the immunological diversity to EPO. The latter is a very interesting point regarding patients who had developed antibodies against the endogenous and the recombinant protein EPO during application of EPO. A mimetic peptide could be an alternative to correct anemia in these patients.

1 Einleitung

1.1 Erythropoetin (EPO)

EPO ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 34 kD. Die Bezeichnung Erythropoetin kommt aus dem Altgriechischen (*erythros* = rot; *poiein* = machen).

EPO gehört zu den Wachstumsfaktoren (Zytokinen) und reguliert als Hormon u.a. die Bildung von Erythrozyten (ESA= *erythropoiesis stimulating agents*) [1]. Die EPO-Synthese ist an eine erniedrigte Sauerstoffsättigung des Blutes (Hypoxie) [2-4] gekoppelt. Diese entsteht aufgrund von hypoxischem Stress oder von Anämien entsteht und wird durch den „Hypoxie-induzierten Faktor“ (HIF) aktiviert [5-9]. EPO wird im Menschen zu 90% von den peritubulären interstitiellen Zellen der Niere [1,2,8,10,11] und zu etwa 10% in den Hepatozyten der Leber synthetisiert. Darüber hinaus konnte eine EPO-Synthese auch im Gehirn [12], im Hoden [13], in der Milz [14] und in maligne transformierten Geweben [15,16] nachgewiesen werden.

EPO wandert von der Niere aus in Milz und Knochenmark und fördert dort die Synthese, das Überleben und die Differenzierung von Erythrozyten (roten Blutkörperchen) als Antwort auf einen verminderten Sauerstoffgehalt im Blut. Durch den Anstieg der Erythrozytenzahl bzw. der Hämoglobinkonzentration kann mehr Sauerstoff aus der Lunge in die Gewebe transportiert und auf die hypoxische Situation reagiert werden.

Die Wirkung von EPO wird durch den EPO-Rezeptor (EPO/R) vermittelt. Durch die Bindung von EPO an EPO-Rezeptoren auf der Zelloberfläche werden Signalwege aktiviert, die dazu führen, dass pro-apoptotische Prozesse herunterreguliert und im Gegenzug anti-apoptotische Prozesse hochreguliert werden. Ein funktionaler EPO/R wurde nicht nur im hämatopoetischen Gewebe gefunden, sondern in vielen verschiedenen Geweben wie z.B. auf der Oberfläche von Endothelzellen [18], neuronalen Zellen [19,21], Muskelzellen [17], Herzgefäßzellen [20] und Nierenzellen. Ebenso wurden oftmals funktionsfähige EPO-Rezeptoren auf der Oberfläche von Krebszellen beschrieben [15,22].

Zahlreiche Studien unterstützen mittlerweile die Tatsache, dass EPO über eine pleiotrope Wirkung verfügt, die weit über seine Funktion als Differenzierungs- und Überlebensfaktor ausschließlich erythroider Vorläuferzellen hinausgeht [23,29].

1.2 Blut: Zusammensetzung und Funktionen

Blut kann als eine Sonderform des Bindegewebes mit vielfältigen Aufgaben betrachtet werden. Es setzt sich für Frauen und Männern mit unterschiedlichen Volumenanteilen aus dem Blutplasma und dem Hämatokrit (Blutzellen) zusammen.

Der Hämatokrit besteht zu 99% aus Erythrozyten. Die restlichen 1% setzen sich aus Leuko- (weiße Blutkörperchen) und Thrombozyten (Blutplättchen) zusammen.

Zu den Aufgaben des Blutes gehört u.a. der An- bzw. Abtransport von Sauerstoff, Nährstoffen, Kohlendioxid und anderen Stoffwechselprodukten. Das Blut ist weiterhin ein Transportmedium für Hormone und dient dem Körper damit als Kommunikationsmöglichkeit zur Aufrechterhaltung des gesamten Organismus. Blut erfüllt wichtige Abwehrfunktionen z.B. durch Leukozyten oder Antikörper. Der Wärmehaushalt des Körpers wird durch die regulierte Durchblutung von Geweben, Organen und der Haut gewährleistet. Ebenso ist die Blutgerinnung durch Thrombozyten und andere Blutbestandteilen eine wichtige Funktion des Blutes, um vor Blutverlust zu schützen.

1.3 Hämatopoese

Die Bildung und Entwicklung der Blutzellen (Hämatopoese) ist *in vivo* ein sehr dynamischer und kontrolliert regulierter Prozess. Die Zellen des Blutes entwickeln sich aus hämatopoetischen Progenitorzellen im Knochenmark. Die Blutbildung findet beim erwachsenen Menschen hauptsächlich im roten Knochenmark statt.

Die Hämatopoese wird je nach Entwicklungsrichtung der Zellen in Erythropoese (Bildung roter Blutkörperchen), Leukopoese (Bildung von Abwehrzellen) und Thrombopoese (Bildung von Thrombozyten) unterteilt.

In einem semisoliden Kulturmedium bilden sich *in vitro* aus differenzierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen sog. CFUs (*Colony Formation Units*) als abgrenzbare Kolonien. Ausgangspunkt dieser Koloniebildung sind die sog. CFU-GEMM (CFU-Granulozyten/Erythrozyten/Monozyten/Megakaryozyten). Die CFU-GEMM-Fraktion ist eine heterogene Gruppe aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, die für verschiedene Entwicklungsrichtungen geprägt sind. Diese Vorläuferzellen besitzen noch eine hohe Teilungsfähigkeit, die sie mit zunehmender Differenzierung verlieren. Die Bildung der verschiedenen Vorläufer-Zelltypen ist zunächst ein

stochastischer Prozess. Das weitere Schicksal dieser Zellen wird durch Zytokine reguliert.

Zytokine sind Wachstumsfaktoren, die spezifisch Proliferation, Differenzierung bzw. das Überleben einer Zellgruppe nach Bedarf regulieren können. Zu diesen Zytokinen gehören neben vielen anderen IL-3, IL-5, GM-CSF, G-CSF, M-CSF und Erythropoetin (EPO).

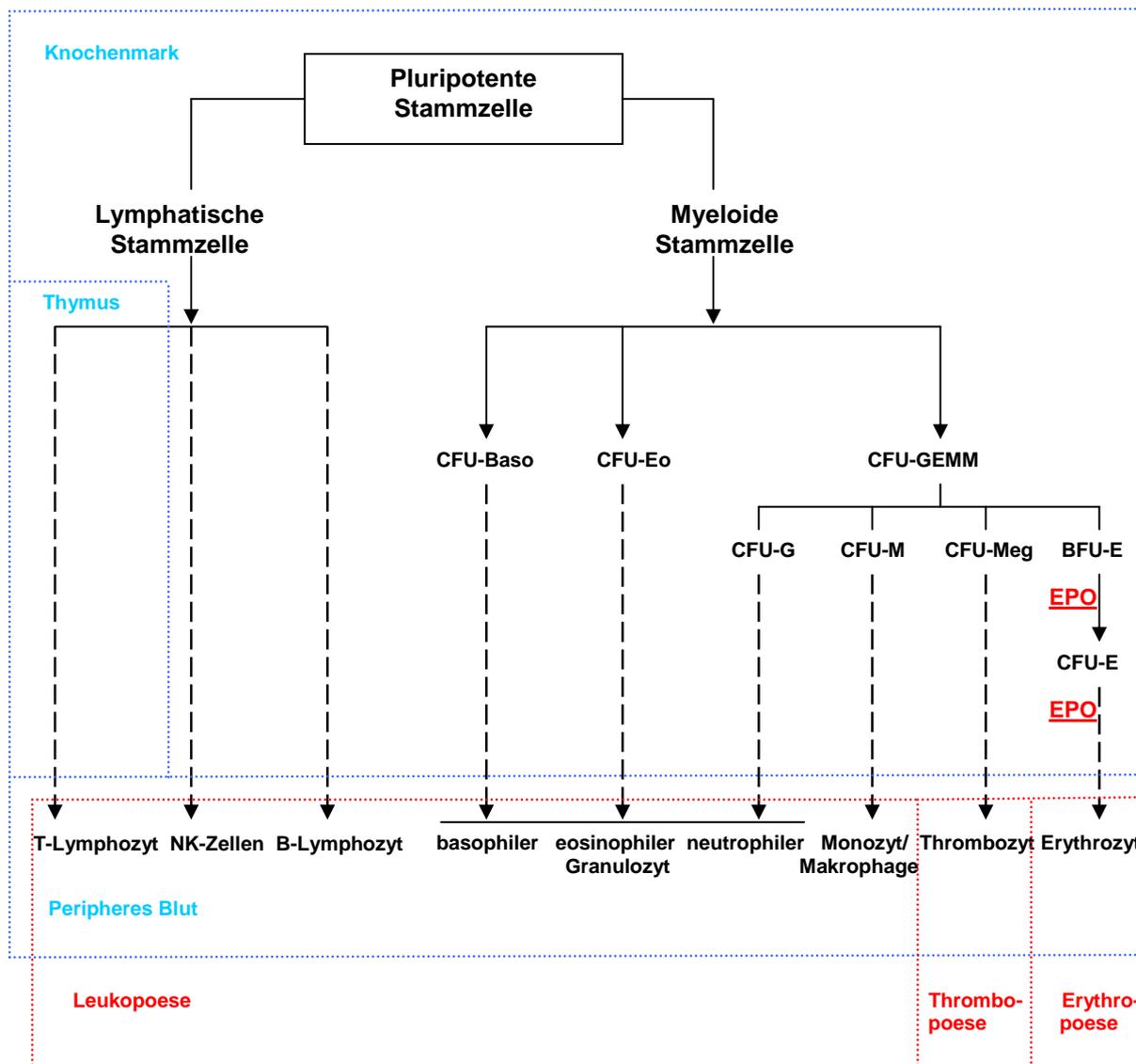


Abb. 1.1: Hämatopoese

1.4 Erythropoese

Die Erythropoese ist die Bildung und Entwicklung von roten Blutkörperchen (Erythrozyten) aus erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark. Nach Kultivierung in einem semisoliden Medium mit spezifischen Zytokinen differenzieren pluripotente Vorläuferzellen zum sog. BFU-E-Stadium (*burst forming unit-erythroid*). Dabei differenzieren die Zellen zu monopotenten erythroiden Vorläuferzellen.

Innerhalb des Knochenmarks liegen die hämatopoetischen Vorläuferzellen abgesondert in spezifischen Inseln und eingebettet in einem Netzwerk sinusförmiger Gefäßkanäle. Dort wird ihre Entwicklung von Stromazellen, die entwicklungsrelevante Zytokine sekretieren, beeinflusst. Zu den Stromazellen gehören Fibroblasten, Makrophagen, dendritische Zellen, T-Zellen und Osteoblasten. Hämatopoetische Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche eine große Anzahl verschiedener Adhäsionsmoleküle, deren Dichte auf der Zelloberfläche im Laufe der Differenzierung deutlich abnimmt. Die Adhäsionsmoleküle interagieren mit Proteinen der extrazellulären Matrix und halten die Zellen im Knochenmark.

Die BFU-E-Kolonien (mehr als 200 Zellen/Kolonie) erscheinen in Form mehrerer großer Cluster, deren Ränder ausgefranst sind. Ab dem BFU-E-Stadium ist die Entwicklung dieser Zellen zum Erythrozyten determiniert.

Die BFU-E differenzieren weiter zu CFU-E (*colony forming unit-erythroid*). Die CFU-E bilden *in vitro* kleine einzelne abgegrenzte Kolonien (weniger als 200 Zellen/Kolonie). Man spricht nun von CFU-E-Kolonien. Die CFU-E-Zellen sind stark EPO-responsiv. EPO begünstigt die Proliferation und das Überleben dieser Zellen.

Im Knochenmark ist der Proerythroblast die erste morphologisch erkennbare erythroide Zelle. Aus dem Proerythroblasten entwickelt sich über den Erythroblasten und den Normoblasten der Retikulozyt. Über diese Entwicklungsstufen hinweg nimmt die Zellgröße kontinuierlich ab, die Zahl der Mitochondrien wird geringer, die Basophilie des Zytoplasmas nimmt durch den Verlust der Polyribosomen ab, während die Azidophilie durch beginnende Hämoglobinbildung zunimmt. Die Teilungsfähigkeit geht mit Erreichen der Differenzierungsstufe des Normoblastens verloren. Das Chromatin verdichtet sich stark und wird letztlich beim Übergang vom Normoblasten zum Retikulozyten ausgestoßen. Der Retikulozyt verlässt das Knochenmark und reift weiter zum kernlosen, RNA-freien Erythrozyten.

Das folgende Schema stellt die einzelnen Entwicklungsstadien vom CFU-GEMM-Stadium hämatopoetischer Vorläuferzellen bis zum Erythrozyten graphisch dar.

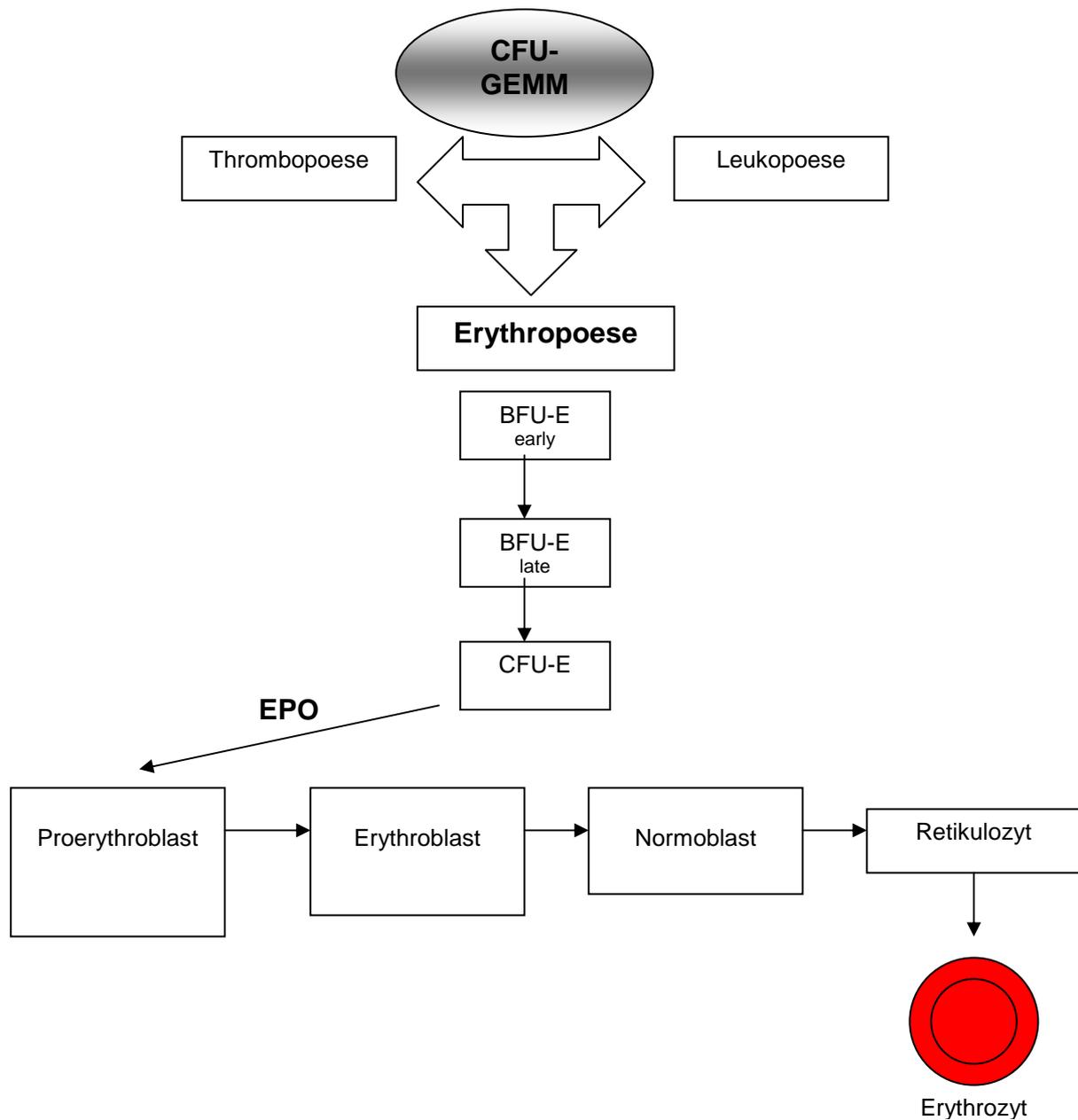


Abb. 1.2: Erythropoese (Knochenmark)

Die Entwicklung eines Erythrozyten dauert etwa sieben Tage. Die Lebensdauer von Erythrozyten währt durchschnittlich 120 Tage. Pro Tag werden bis zu 200 Milliarden rote Blutkörperchen im Körper produziert.

1.5 JAK-STAT-Signalweg

EPO-responsive Zellen besitzen einen transmembranen EPO-Rezeptor (EPO/R). Der humane EPO/R ist ein etwa 60 kD großes Membranprotein. Ein EPO-Molekül bindet in asymmetrischer Weise zwei EPO/R-Moleküle, die gemeinsam einen homodimeren Rezeptorkomplex bilden. Es gibt Hinweise darauf, dass es nach EPO-Bindung auch zur Bildung eines heteromeren Rezeptorkomplexes, bestehend aus dem EPO/R und der β -Untereinheit des IL-3-Rezeptors (CD131) kommen kann [24]. Durch die Liganden-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, die die Apoptose erythroider Vorläufer hemmen und deren Proliferation und Differenzierung fördern. Einer dieser Signalwege ist der JAK-STAT-Signalweg [33]. Der EPO/R ist Mitglied der Zytokinrezeptor-Superfamilie ohne intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Die Kinaseaktivität wird von JAK2 (*Janus Kinase*), einer rezeptorassoziierten Kinase, bereitgestellt. JAK2 bindet konstitutiv an die zytoplasmatische Rezeptordomäne. Nach Ligandenbindung führt die damit verbundene Konformationsänderung der Rezeptormoleküle dazu, dass die JAK-Kinasen nahe genug zusammen kommen, um sich gegenseitig zu phosphorylieren (Transphosphorylierung). Anschließend phosphoryliert JAK2 Tyrosin-Reste am Rezeptor. Die Phospho-Tyrosine des Rezeptors sind entscheidend für die Fortsetzung der Signalkaskade. STAT (*signal transducers and activator of transcription*)-Proteine werden an den phosphorylierten Rezeptor rekrutiert. Diese Proteine besitzen Src-homology 2 (SH2)-Domänen über die sie an die Phospho-Tyrosine des Rezeptors binden [34]. Dort werden sie dann selbst von JAK2 an einem Tyrosin phosphoryliert. An ein Phospho-Tyrosin eines STAT5-Proteins bindet ein weiteres STAT5-Protein über die SH2-Domäne. Aufgrund der gegenseitigen Phospho-Tyrosin-SH2-Domänen-Interaktion zweier STAT-Proteine kommt es zur Dimerisierung und zur Dissoziation der STAT-Dimere vom Rezeptor [33]. STAT-Dimere zeichnen sich dadurch aus, dass sie das Signal von der Zelloberfläche nicht nur ins Zellinnere weiterleiten, sondern selbst als Transkriptionsfaktoren in den Zellkern wandern und durch hochaffine Bindung an spezifische DNA-Elemente die Genexpression direkt regulieren. Die Familie der STAT-Proteine besteht aus sieben Mitgliedern. Abb. 1.3 zeigt eine schematische Darstellung des JAK-STAT-Signalweges.

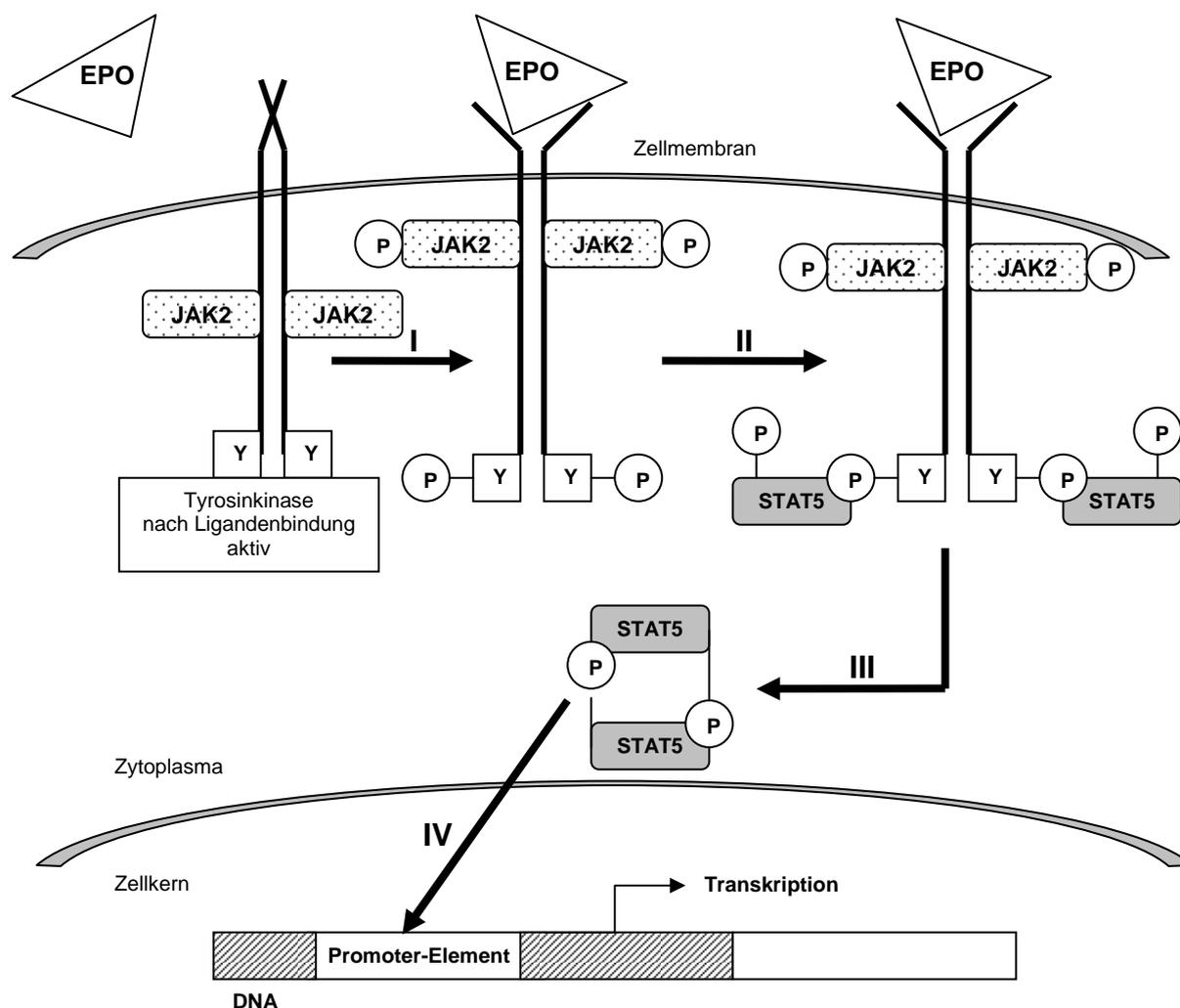


Abb. 1.3: Aktivierung von STAT5 über den JAK-STAT-Signalweg.

Nach der asymmetrischen Bindung von EPO an den EPO/R kommt es zur Konformationsänderung eines dimeren Rezeptor-Moleküls (I). Daraufhin erfolgt die Phosphorylierung des Rezeptors durch transphosphorylierte JAK2-Kinasen und anschließender STAT5-Bindung (II). JAK2-bedingte Phosphorylierung von STAT5 führt zur Dissoziation der STAT5-Moleküle von Rezeptor und Bildung von STAT5-Dimeren (III), die als Transkriptionsfaktoren in den Zellkern wandern und dort die Transkription der Zielgene durch Bindung spezifischer Promoterregionen aktivieren (IV).

Darüber hinaus induziert ein aktivierter (Liganden-gebundener) EPO/R noch andere Signalwege z.B. über die Aktivierung von PI3K (Phospho-Inositol-3-Kinase) oder die Aktivierung des Ras-Raf-Signalweges. Abb. 1.4 zeigt einen schematischen Auszug des Ras-Raf-Signalweges und eine mögliche Aktivierung von sog. MAP-Kinasen (*Mitogen activated Proteinkinases* ERK1/2), die u.a. *downstream* Komponenten dieses Signalweges sind. Typisch für diese Art Signalübertragung ist, dass mindestens drei MAP-Kinasen hintereinander geschaltet sind.

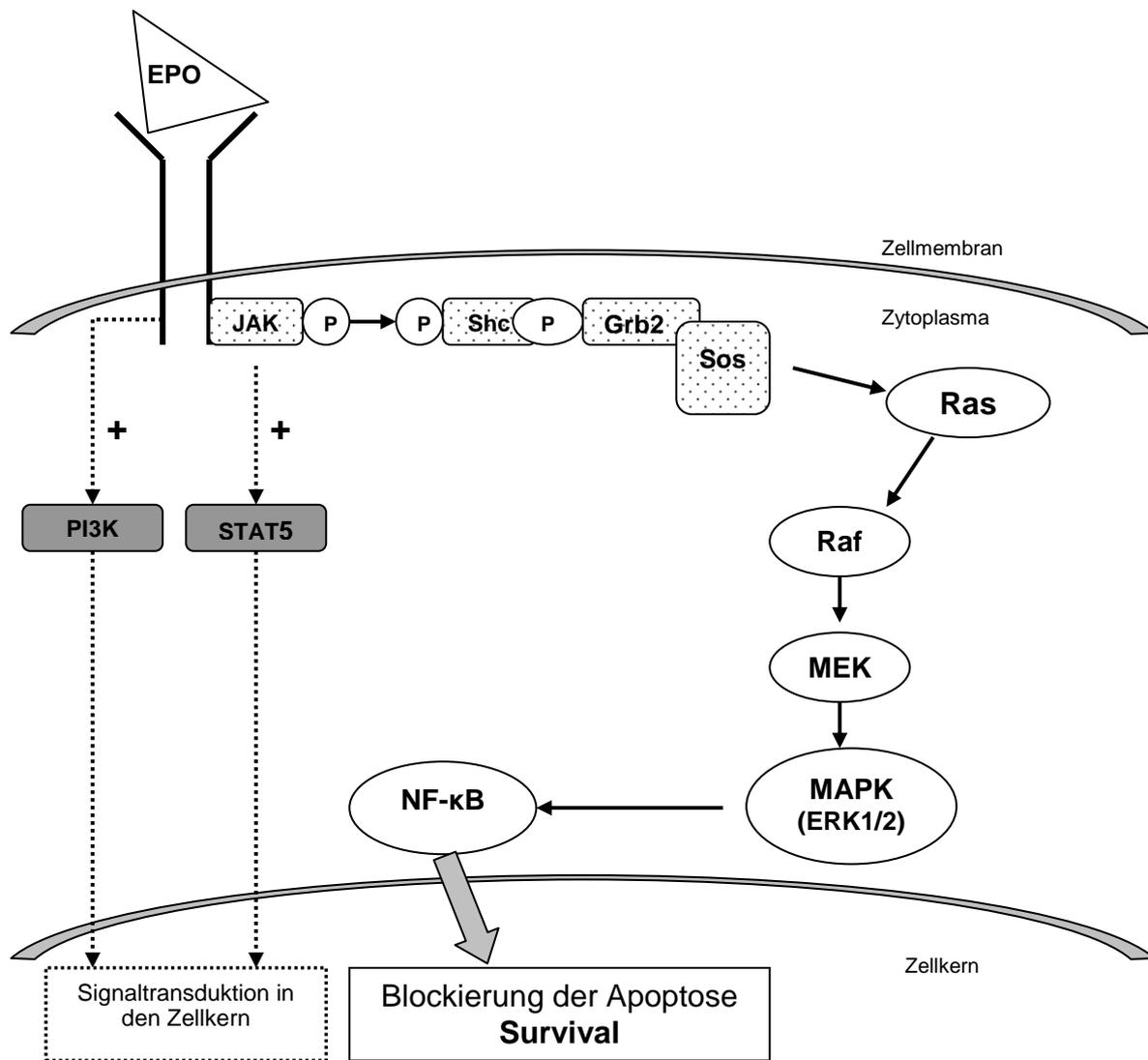


Abb. 1.4: Aktivierung von ERK1/2 über den Ras-Raf-Signalweg.

Nach der asymmetrischen Bindung von EPO an den EPO/R kommt es zur Konformationsänderung und Aktivierung des EPO/R durch Phosphorylierung. Der Rezeptorphosphorylierung folgt die Signalübertragung durch eine Phosphorylierungskaskade hintereinander geschalteter Komponenten des Ras-Raf-Signalweges. Diese Signalübertragung wirkt sich anti-apoptotisch aus und sichert das Überleben (*Survival*) der Zellen.

Der aktivierte Rezeptor induziert parallel auch andere Signalwege wie den JAK-STAT-Signalweg oder die Aktivierung der PI3-Kinase.

1.6 EPO als Therapeutikum

Die klassische Therapie mit EPO wird bei Patienten mit zu geringer Erythrozytenproduktion (Anämie) aufgrund von EPO-Mangel durch renale Insuffizienz [25], chronisch-entzündliche [26] bzw. tumorassoziierte Prozesse, AIDS [27] oder als Folge von Chemotherapien [28] eingesetzt. Sie verfolgt das Ziel, die Bildung von Erythrozyten zu initiieren bzw. zu unterstützen. Dadurch können Bluttransfusionen reduziert oder gänzlich umgangen werden. Die Niere ist die Hauptproduktionsstätte des Hormons EPO. Bei chronischem Nierenversagen kommt es zu einem progredienten Mangel an EPO. Aber auch eine verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten oder ein gestörter Einbau von Eisen in das Hämoglobin können Ursachen für eine Anämie sein.

In den letzten Jahren wurde EPO aufgrund seiner zytoprotektiven Eigenschaften auch im Bereich neurologischer (Schlaganfall), neurodegenerativer (Schizophrenie) und sogar neuropsychologischer (Depressionen) Erkrankungen immer interessanter [30,31,32]. Klinische Anwendungen von EPO in diesem Bereich sind jedoch noch nicht voll etabliert.

EPO gehört weltweit zu den zehn kommerziell erfolgreichsten Medikamenten. Die erste Generation der EPO-Präparate entstand nach der erfolgreichen Klonierung des EPO-Gens und der rekombinanten Expression von EPO-Varianten in CHO-(Hamster-Ovarialzelllinie) bzw. in BHK-(Baby-Hamster-Nierenzelllinie) Zellen. Diese rekombinanten EPO-Varianten unterscheiden sich vom endogenen EPO-Molekül durch das Glykosylierungsmuster [36].

EPO wurde in der breiten Öffentlichkeit besonders durch seinen Missbrauch im Bereich des Leistungssports als Dopingmittel bekannt. Die Zunahme des Blutvolumens nach Applikation von EPO ist mit einem starken Anstieg der Hämoglobinkonzentration als Folge einer Zunahme der Erythrozytenzahl verbunden. Dies wiederum steht mit einer erhöhten Sauerstoffaufnahmekapazität in Verbindung und wirkt sich leistungssteigernd aus. Der Nachweis von EPO bei Doping-Tests ist schwierig, da sich das natürliche von dem synthetischen EPO im Test kaum unterscheidet [37]. Außerdem wird rekombinantes EPO schnell im Körper abgebaut. Dadurch wird ein Nachweis bereits drei Tage nach einer EPO-Gabe schwierig [38]. Bei den derzeitigen Doping-Tests hat man die Wahl zwischen einem indirekten und einem direkten Nachweisverfahren. Beim indirekten Verfahren werden mittels einer Blutprobe z.B. Auffälligkeiten des Hämatokrits bzw. der Erythrozytenkonzentration

bestimmt. Das direkte Verfahren mit Hilfe einer Urin- bzw. Blutprobe macht sich die Unterschiede im Glykosylierungsmuster zwischen dem natürlichen und dem synthetischen EPO zunutze. Durch Anzahl und Verteilung der Zuckerendgruppen kommt es zu unterschiedlichen Ladungen zwischen natürlichem und synthetischem EPO [43,45]. Durch isoelektrische Fokussierung kann das synthetische EPO schließlich nach Aufbereitung (Mikrofiltration, Ultrazentrifugation) der Urinprobe nachgewiesen werden.

1.7 Nebenwirkungen von EPO

Die Anwendung von EPO, die einen Anstieg des Hämatokrits bei gleichzeitiger Erniedrigung des Plasmavolumens bewirkt [48], birgt jedoch Risiken in sich. Gehäuftes Auftreten von Thrombosen und eine Zunahme von Patienten mit Herz-Kreislaufversagen stehen im Zusammenhang mit der EPO-Therapie [39].

Als weitere schwerwiegende Nebenwirkung muss erwähnt werden, dass die Applikation von EPO die Sterblichkeitsrate bei Krebspatienten erhöhen kann [40,42]. Im Mai 2007 wurde von der US-Arzneimittelaufsichtsbehörde FDA (<http://www.fda.gov/>) und ein Jahr später auch von der Europäischen Arzneimittelagentur EMA (<http://www.emea.eu.int>) eine entsprechende Warnung ausgesprochen.

Mittlerweile gibt es auch Studien darüber, die belegen, dass die Applikation von EPO das Wachstum von Tumorzellen begünstigt [53]. Es gibt jedoch auch Wissenschaftler, die den direkten proliferationsstimulierenden Effekt von EPO auf Tumorzellen bezweifeln [44].

In den letzten Jahren wurden einige Fälle beschrieben, in denen Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (CKD= *chronic kidney disease*) Antikörper gegen EPO-Präparate entwickelt haben. Diese Patienten erkranken an Erythroblastopenie auch als PRCA (*Pure Red Cell Aplasia*) bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine fatale und sehr massive Anämie-Form. Die Antikörper verhindern nicht nur die Wirkung des verabreichten EPO-Präparates, sondern unterbinden ebenso die Wirkung des endogen produzierten EPOs [59,60]. Die Ursachen dieser Antikörperbildung sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Es könnten z.B. Hilfsstoffe in der Formulierung [59] oder eine falsche Lagerungstemperatur des Präparates sein, die die Antikörperproduktion provozieren.

1.8 EPO-Präparate

Der große Erfolg der ersten EPO-Präparate führte dazu, dass neue Strategien verfolgt wurden, um eine verbesserte zweite Generation von EPO-Präparaten zu generieren. Ein großes Bestreben bestand vor allem darin, die Serumhalbwertszeit, die abhängig vom Verteilungsvolumen und von der Elimination des Wirkstoffes im Organismus ist, zu verlängern bzw. die Affinität zum EPO-Rezeptor zu erhöhen [56]. Das Augenmerk wurde auch auf eine vereinfachte Anwendung des Präparates für den Patienten gerichtet.

Zur Verbesserung der Aktivität der rekombinanten EPO-Präparate wurden verschiedene Wege wie z.B. Strukturmodifikationen des Moleküls eingeschlagen.

Modifikationen wie Hyperglykosylierung (Darbepoietin-alpha) [47] oder Kopplung des EPO-Moleküls an ein Polymer wie z.B. Polyethylenglycol (PEG) (z.B. Mircera®) sollte die Serumhalbwertszeit verlängern und frühe Degradation bzw. ein schnelles Ausscheiden über die Niere verhindern [49,51]. Häufig ist eine Verbesserung der Serumhalbwertszeit jedoch mit einer Verschlechterung der Rezeptorbindungsaffinität verbunden [47].

Die EPO-Präparate, die derzeit zur Anwendung kommen, basieren alle auf der rekombinanten Herstellung in CHO- bzw. BHK-Zellen. Auf der Suche nach neuen EPO-Präparaten mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften wurden EPO-mimetische Peptide identifiziert [52,55], wovon sich Hematide® als ein an PEG-gekoppeltes EPO-mimetisches Peptid-Dimer bereits in der klinischen Phase III des Arzneimittelzulassungsverfahrens befindet [49,50]. CNTO 530 ist ein rekombinantes Fusionsprotein, das aus der dimeren Sequenz eines EPO-mimetischen Peptides und der Sequenz des Fc-Fragments eines humanen IgG-Antikörpers besteht. Die Kopplung des EPO-Moleküls an ein Antikörperfragment sollte einen Recycling-Effekt des EPO-Präparates zur Erniedrigung der Dosis bewirken [56,57]. Zurzeit befindet sich CNTO 530 in der klinischen Phase I [46].

Mittels eines Hochdurchsatz-Screenings von Peptid-Bibliotheken mit zufällig zusammengestellten, chemisch synthetisierten 20mer Peptidsequenzen wurden agonistische Peptide, die den EPO-Rezeptor binden und aktivieren, identifiziert. 1996 wurde mit EMP-1 (Erythropoetin **M**imetic **P**eptide-1) ein solches EPO-mimetisches Peptid erstmals vorgestellt [52]. Die mimetischen Peptide von Hematide® und CNTO 530 basieren auf der Sequenz von EMP-1.

Das Besondere dieser Peptide ist neben ihrer geringen Größe, dass sie keinerlei Sequenzhomologie zum EPO-Molekül aufweisen, aber trotzdem in der Lage sind, an den EPO-Rezeptor zu binden und den Rezeptor zu stimulieren [54].

Das rekombinante EPO-Molekül bindet laut Röntgenstrukturanalyse in einer asymmetrischen Anordnung an den EPO-Rezeptor, während gezeigt werden konnte, dass EPO-mimetische Peptid-Dimere die beiden Bindungsstellen des EPO/R in symmetrischer Weise binden [55,61,62]. Abb. 1.5 zeigt eine schematische Darstellung unterschiedlicher Bindungsarten von EPO bzw. eines EMP-Dimers.

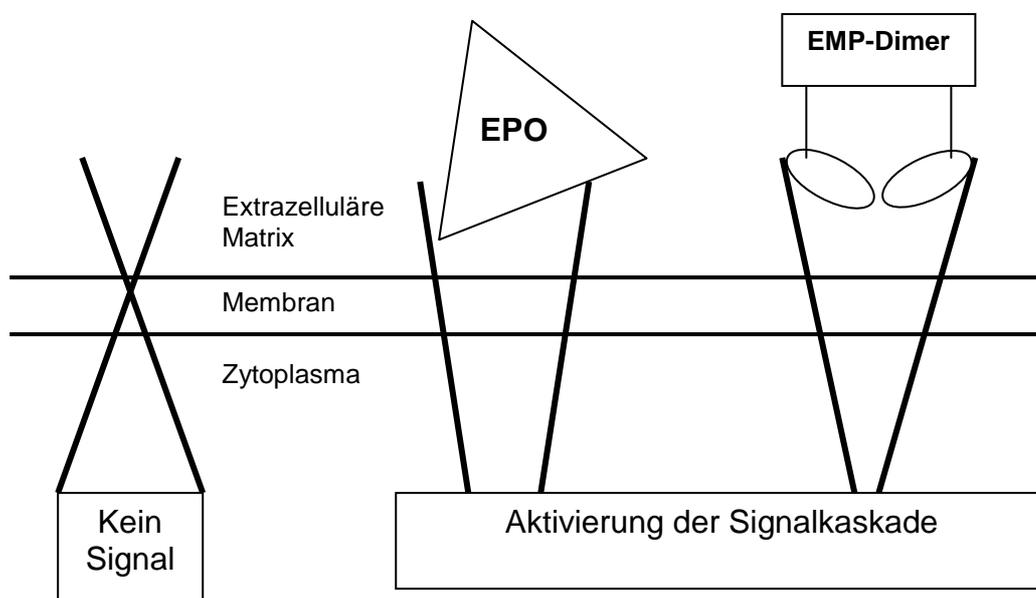


Abb. 1.5: Bindung eines EPO-Moleküls bzw. eines EMP-Dimers an den EPO-Rezeptor

1.9 AGEM400-HES: ein EPO-mimetisches Peptid

EPO-mimetische Peptide bieten gegenüber den rekombinanten Proteinen zahlreiche Vorteile und können eine Möglichkeit zur Entwicklung einer zweiten, verbesserten Generation von EPO-Präparaten sein. Trotz fehlender Sequenzhomologie sind sie in der Lage den EPO/R zu aktivieren. Dabei ist es noch unklar, ob die Aktivierung des Rezeptors durch die Liganden-induzierte Dimerisierung oder durch eine Konformationsänderung bereits vorhandener Rezeptordimere erfolgt.

Einen großen Vorteil bieten diese Peptide bei der Vorbeugung von PRCA bzw. bei der Behandlung von Patienten mit PRCA. Selbst wenn diese Peptide zu einer Bildung von Antikörpern führen würden, wäre das endogene EPO aufgrund der fehlenden Sequenzhomologie davon nicht betroffen [58].

Ebenso wichtig ist die Tatsache, dass die Herstellung dieser Peptide mit deutlich geringeren Kosten im Vergleich zum rekombinanten Herstellungsverfahren verbunden ist. Im Gegensatz zum rekombinanten Herstellungsverfahren ist die Synthese der Peptide vom ersten Syntheseschritt an komplett kontrollier- und steuerbar.

Ein Nachteil der Peptide ist ihre kurze Serumhalbwertszeit, da die Peptide schnell über die Niere ausgeschieden werden.

Um die Halbwertszeit zu verbessern, wird ein Makromolekül an die Peptide gekoppelt. Dies soll das schnelle Ausscheiden über die Niere verhindern und darüber hinaus die Peptid-Struktur stabilisieren. Als Makromolekül wird häufig PEG (Methoxypolyethylenglycolpolymer), wie z.B. bei Hematide® [68], verwendet. Man spricht von einer sog. PEGylierung. Es hat sich auch gezeigt, dass die Kopplung von Wirkstoffen an Makromoleküle wie PEG, die Antigenität der Wirkstoff-Proteine herabsetzt. PEG wird allerdings im Körper nicht abgebaut und ausgeschieden. Bisher gibt es keine Studien darüber, ob und welche Konsequenzen bei der Ablagerung von PEG im Körper bei langfristiger Gabe entstehen.

Das EPO-mimetische Peptid BB68 (AplaGen GmbH, Baesweiler) wurde nach Homodimerisierung oligovalent an ein Makromolekül gekoppelt wurde. Als Makromolekül wurde die aus Maisstärke generierte **Hydroxyethylstärke** (HES) verwendet.

Zunächst wurden aus einem Pool von über 200 monomeren 20-mer Peptiden die Peptide ermittelt, welche im MTS-Assay mit TF-1-Zellen eine

proliferationsstimulierende Wirkung zeigten. Von den proliferationsstimulierenden Peptiden zeigte das Peptid BB68 die größte Effizienz. BB68 leitet sich wie Hematide® und CNTO 530 von der EMP-1 Sequenz ab, unterscheidet sich aber u.a. durch den Austausch von Tryptophan gegen die künstliche Aminosäure Naphtylalanin (Nal) an Position 13 und den Austausch der Proline gegen Lysine an der Position 10 und 17 der EMP-1 Sequenz.

Der Einsatz von Naphtylalanin sollte für eine höhere Stabilität sorgen. Wie Tryptophan enthält Naphtylalanin einen aromatischen Heterozyklus. Im Gegensatz zu Tryptophan enthält der Heterozyklus von Naphtylalanin keine polare Amino-Gruppe und erreicht wegen dieser geringeren Polarität innerhalb des Moleküls eine höhere Strukturstabilität.

Zur Optimierung der Wirksamkeit wurde BB68 zu einem bivalenten C-N-verknüpften linearen Peptid (AGEM400) dimerisiert und über eine Disulfidbrücke an den beiden Cysteinen zyklisiert. Anschließend wurden die zyklisierten Peptid-Dimere oligovalent an das *Backbone* eines Hydroxyethylstärke (HES)-Moleküls von etwa 220 kD gekoppelt. Die Kopplung an HES erfolgte C-terminal.

Dieses Peptid-HES-Konjugat stellt den direkten Vorläufer des späteren Arzneistoffes dar. Es besteht aus einem HES-Molekül, an das 4-5 Peptid-Dimere gekoppelt wurden. Dabei entspricht der Peptid-Anteil am Gesamtmolekül AGEM400-HES durchschnittlich etwa 10 %.

HES wird in der Medizin schon sehr lange als Plasmaexpander eingesetzt (z.B. Voluven®). Im Gegensatz zu PEG ist HES metabolisierbar. Ein weiterer Vorteil gegenüber PEG bieten die verschiedenen HES-Qualitäten, die sich im Hinblick auf die Molmassen, auf den Verzweigungsgrad und auf den Substitutionsgrad (Anzahl der Hydroxyethylgruppen) unterscheiden. Dadurch wird der Abbau von HES-Derivaten im Körper kontrollier- und steuerbar. HES kann wie ein „pharmakokinetischer Dimmer“ eingesetzt werden.

Die folgende Graphik stellt ein vereinfachtes Schema der Syntheseschritte von AGEM400-HES dar:

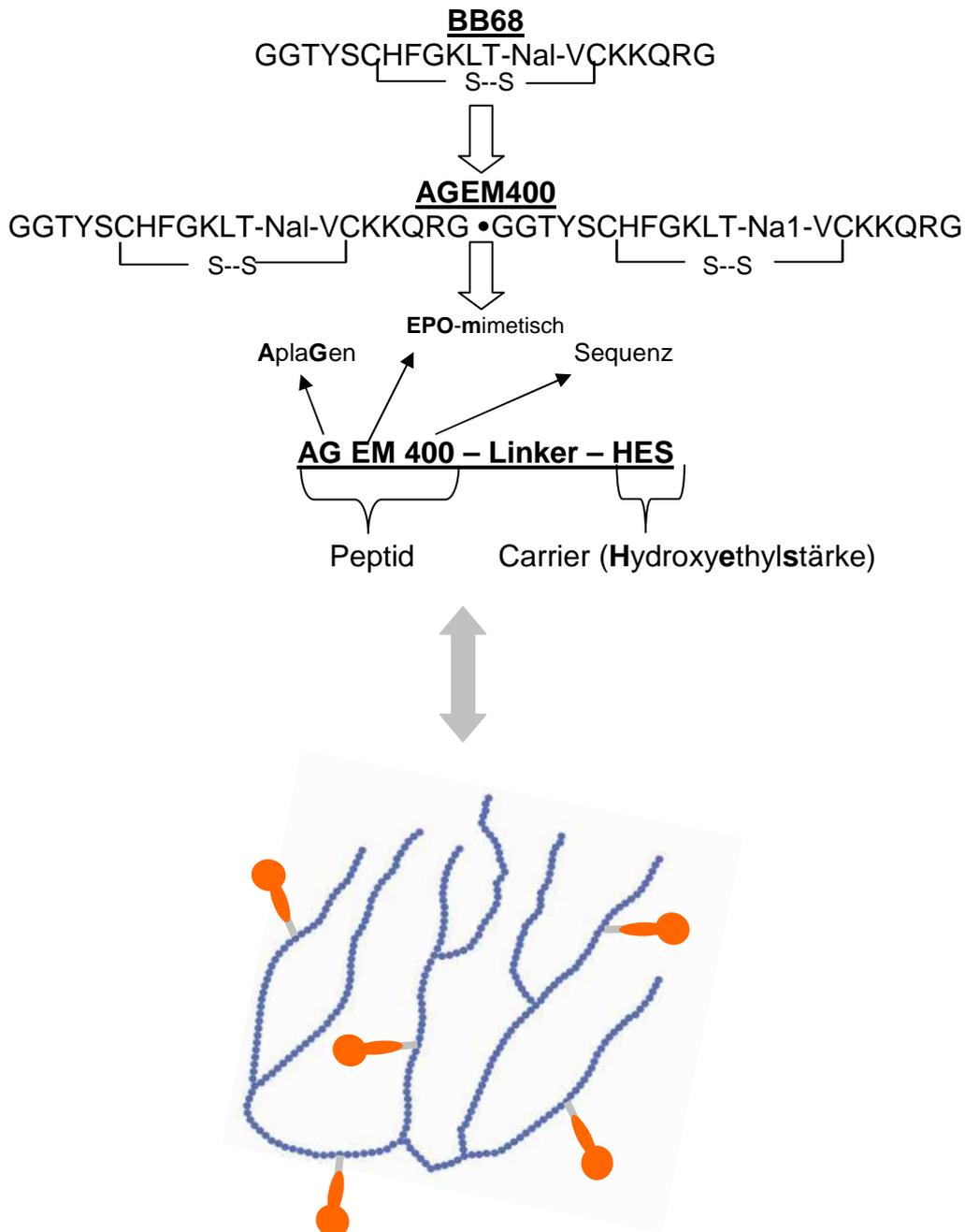


Abb. 1.6: Sequenz- und Strukturoptimierung eines EPO-mimetischen Peptides.

BB68 ist ein lineares monomeres Peptid mit einem Molekulargewicht von ca. 2.3kD. AGEM400 ist ein bivalent gekoppeltes, lineares Peptid-Dimer aus BB68-Monomeren und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 4.6kD. AGEM400-HES besteht aus einem HES-Molekül, an das AGEM400-Dimere über einen Linker gekoppelt wurden, und besitzt ein mittleres Molekulargewicht von etwa 220kD.

1.10 Ziel der Arbeit

Vor dem Hintergrund der Entwicklung einer alternativen Generation von EPO-Präparaten sollte in dieser Arbeit ein neues EPO-mimetisches Peptid identifiziert werden. Es sollte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Peptid nach Modifizierung (Dimerisierung [AGEM400] bzw. Kopplung an HES [AGEM400-HES]) um einen potenten EPO/R-Agonisten handelt, der immunologisch divergent zum EPO-Protein ist.

Die Wirkung und der Wirkmechanismus des mimetischen Peptides sollte *in vitro* mit einem breiten Spektrum an zell- und molekularbiologischen Assays analysiert werden. Es sollte der Einfluss des Peptides auf die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose hämatopoetischer Vorläuferzellen untersucht werden. Ebenso sollte die Aktivierung EPO-induzierbarer Signalwege durch das EPO-mimetische Peptid nachgewiesen werden.

Es sollten Antikörper gegen ein rekombinantes Erythropoetin und gegen das EPO-mimetische Peptid generiert werden, um die Annahme einer immunologischen Divergenz von EPO und dem Peptid zu bestätigen. Weiterhin sollte auf Basis dieser Antikörper ein Sandwich-ELISA als Nachweisverfahren des mimetischen Peptides in Humanserum für spätere präklinische und klinische Studien entwickelt werden.

Mit dieser Arbeit sollten die nötigen *in vitro* Testverfahren als Basis für alle weiteren Schritte im Rahmen einer Arzneimittelentwicklung geleistet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Sterile Werkbank (Laminar Flow; Typ: KR-210; KOJAIR, Vilpulla-Finnland), Durchflusscytometer (FACSCalibur; BD, Heidelberg-Deutschland), kühlbare Tischzentrifuge (Typ: 5415 R; Eppendorf, Hamburg-Deutschland), Thermomixer (Comfort 1.5 ml; Typ: 5355 08852; Eppendorf, Hamburg-Deutschland), Zentrifuge (Heraeus; Multifuge 3 S-R; Thermo Fisher Scientific, Dreieich-Deutschland), Photometer (GENios; Art.-Nr. F129004; TECAN, Crailsheim-Deutschland), Gelelektrophorese- und Blotting Module (NuPAGE Sytem; Invitrogen, Karlsruhe-Deutschland), Brutschrank (Typ: 9140-0003; Binder, Tuttlingen-Deutschland), Stickstoffaufbewahrungsbehälter (LS750; Taylor-Wharton, Husum-Deutschland), Autoklav (Typ: AMA250; Astell Scientific, England), Reinstwasseranlage (Typ: HP 5 UF; TKA-Lab Reinstwassersystem, Niederelbert-Deutschland), Schüttelplatte (Titramax 101; Heidolph, Schwabach-Deutschland), Vortex (REAX top; Heidolph, Schwabach-Deutschland), Stromversorgungsgerät (E835; CONSORT, Turnhout-Belgien), handelsübliche Mikrowelle

2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien, Chemikalien

Serologische Einwegpipetten, Zellkultur-Flaschen, diverse Reaktionsgefäße, Multititer-Platten und Pipettenspitzen wurden von den Firmen Sarstedt und Greiner bezogen.

Die verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden von den Firmen Sigma; Carl Roth; Gibco, Fluka, Merck und Becton Dickinson bezogen.

Das EPO-Präparat *Erypo*[®]FS2000, das von der JANSSEN-CILAG GmbH vertrieben wird, wurde als rekombinantes EPO für die Zellkulturversuche verwendet. Es wurde gentechnisch aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-K1) hergestellt. 0.5 ml dieses Präparates enthalten 2000 I.E. (internationale Einheiten), die 16,8 µg entsprechen. Dies entspricht einer molaren Konzentration von 980 nM.

Die Herkunft von Produkten anderer Firmen wurde separat im Methodenteil angegeben.

2.1.3 Puffer und Lösungen

- PBS- und HBSS-Puffer: je 10 mM (Sigma)
- 10x Propidiumiodid(PI)-Stammlösung: 100 µg/ml in PBS
- Blocking-Puffer in den FACS-Analysen: 10 mM PBS
5% Humanserum
5% FCS
- MACS-Puffer: 10 mM PBS
2 mM EDTA
0.5% BSA
- Lysepuffer zur Zellextraktion: 150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
1% TritonX-100
pH 8

In 10 ml Lysepuffer wurden eine Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche; Complete, Mini Tablets, #1836153) gelöst.

- TBST: 10 mM Tris-HCl (pH 7.9)
150 mM NaCl
0.05 % Tween20
- Blocking-Puffer (Western Blot Analyse): TBST mit 3% fettfreiem Milchpulver (Sigma)
- MOPS-Puffer (pH 7.0): 200 mM 3(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA

2.2 Methoden

2.2.1 Identifizierung von AGEM400

Es wurden Peptid-Monomere mit einer Sequenz aus 20 Aminosäuren mit Hilfe computergestützter Modelling-Programme, die eine theoretisch optimale Bindung der Peptide an den humanen EPO/R berechnet haben, synthetisch hergestellt. Diese Peptide sind Sequenzvariantionen eines aus der Literatur bekannten EPO-mimetischen Peptides (EMP-1). Das Modelling bzw. die Auswahl der EMP-1-basierten Sequenzvariationen wurde bei der AplaGen GmbH von Herrn Dr. Udo Haberl durchgeführt.

Es entstand ein Pool von über 200 monomeren synthetischen 20-mer Peptiden, die in einem MTS-Proliferationsassay mit TF-1-Zellen auf eine proliferationsstimulierende Wirkung getestet wurden.

Von den identifizierten proliferationsstimulierenden Peptidagonisten zeigte das Peptid BB68, das im Vergleich zu EMP-1 u.a. neben einer prolinfreien Sequenz die künstliche Aminosäure Naphtylalanin (Nal) enthält, die größte Effizienz. Zur Optimierung der Wirksamkeit wurde BB68 zu einem bivalenten C-N-verknüpften linearen Peptid (AGEM400) dimerisiert und über eine Disulfidbrücke an den beiden Cysteinen zyklisiert. Anschließend wurden durchschnittlich fünf zyklisierte Peptid-Dimere multivalent an ein Hydroxyethylstärke (HES)-Molekül von etwa 220kD gekoppelt.

Angestrebt wurde ein durchschnittlicher Peptidanteil von 10% des Gesamtmoleküls. Der Peptidanteil schwankte chargenbedingt und lag bei 7-12%.

2.2.2 Synthese EPO-mimetischer Peptide (EMP)

Die EPO-mimetischen Peptide wurden intern in der Abteilung für Peptid-Chemie der AplaGen GmbH unter Leitung von Dr. Andreas Rybka hergestellt:

Peptidsequenz von AGEM400-HES:

Ac-GGTYSCHFGKLT<1-Nal>VCKKQRG-GGTYSCHFGKLT<1-Nal>VCKKQRG-C-Am-BA –T-HES

AGEM400 ist ein lineares Peptid-Homodimer mit BB68 (2.3 kDa) als monomeren Sequenzbaustein. Der C-Terminus des Dimers wurde um die Aminosäure Cystein verlängert, um über eine SH-Gruppe die Kopplung an aktivierte Hydroxyethylstärke (HES) zu ermöglichen. Die beiden Termini des Moleküls wurden N-terminal acetyliert (Ac) und C-terminal amidiert (Am). Dies wurde zum Schutz vor Exopeptidasen bzw. zum Ausschluss von unerwünschten Ladungseffekten vorgenommen. Über einen Butylamino-Linker (BA) wurde AGEM400 an HES (220kD), die einen Verzweigungsgrad von 0.5 besaß, gekoppelt. HES wurde dazu mit dem Reagens TEMPO oxidiert (T-HES).

2.2.2.1 Synthese des linearen AGEM400-Peptides

AGEM400 ist ein Peptid, das über eine bivalente C→N-Dimerisierung aus zwei monomeren BB68-Peptiden synthetisiert wurde.

Das Peptid AGEM400 wurde in einer Größenordnung von 0.25 mmol durch Mikrowellen unterstützte Festphasen-Synthese in einer automatisierten Liberty-Einheit (CEM) synthetisiert. Die wachsende Peptidkette wurde an Harz zusammengesetzt (PAL ChemMatrix Harz; Matrix Innovation). Das Entfernen der N-terminalen Schutzgruppe Fmoc wurde durch Zugabe von 10 ml Piperidin (25% in DMF) und 3-minütiger Bestrahlung mit 65 W erreicht. Das Ankoppeln der nächsten Aminosäure wurde mit einem 5-fachen Überschuss an Reagenzien (Aminosäure, Pybop, DIEA) in 10 ml DMF und Bestrahlung mit 40 W für 5 Minuten erreicht. Alle Kopplungen wurden mit Hilfe einer Doppel-Kopplungsprozedur, die ein Capping mit Z-2-Cl-OSu (40 Äquivalente und einer Bestrahlung mit 40 W für 2 Minuten) beinhaltet, durchgeführt.

Das Peptid wurde durch Einführung von Ac-Gly-OH als letzten Baustein acetyliert. Anschließend wurde das Peptid mit DCM gewaschen und durch Zugabe von 20 ml eines sog. Cleavage-Cocktails (94% TFA, 1.0% TIS, 2.5% H₂O, 2.5% DTT) abgespalten. Die Abspaltung erfolgte über drei Stunden bei Raumtemperatur. Das Peptid wurde in kaltem Ether präzipitiert, in Acetonitril/Wasser (2:1) gelöst und sofort über LCMS auf Basis eines Nebula Aufreinigungssystems (Gilson) gereinigt.

2.2.2.2 Einführung der ersten Disulfid-Bindung

Das lineare Peptid wurde mittels des Zyklisierungsreagens AGOX15 nach einem einfachen Protokoll oxidiert. AGOX15 ist ein Reagens, das die Bildung von Disulfidbrücken beschleunigt. Das Verfahren zur Schließung von Disulfidbrücken mit AGOX wurde von der AplaGen GmbH entwickelt und patentiert. Dieses Reagens hatte im Vergleich zu anderen Zyklisierungsreagenzien (Sauerstoff, Iod) den Vorteil, dass es für die spätere Aufreinigung nicht entfernt werden musste. Darüber hinaus führte es zu höheren Ausbeuten. In einem typischen Experiment wurden 20 mg des Peptides in 10 ml AGOX15 (Zimmeratmosphäre) gelöst. Nach 18-24 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Lösung sofort über LCMS auf Basis eines Nebula Aufreinigungssystems (Gilson) gereinigt.

Patente der AplaGen GmbH zum Zyklisierungskonzept mit AGOX

US20090081145A1 PROCESS FOR FORMING DISULPHIDE BRIDGES 2009-03-26
WO2008077621A1 METHOD FOR FORMING DISULFIDE BRIDGES 2008-07-03
WO2007076993A1 PROCESS FOR FORMING DISULPHIDE BRIDGES 2007-07-12
EP1966231A1 PROCESS FOR FORMING DISULPHIDE BRIDGES 2008-09-10

2.2.2.3 Einführung der zweiten Disulfidbrücke

Das nun monozyklische Peptid (20mg) wurde in 40 ml 80%iger Essigsäure gelöst. Nach Zugabe von 0.512 ml HCl (0.1M) und 3.424 ml Iod-Lösung (50 mM) wurde die Lösung 2.5 Stunden gerührt. Der Überschuss von Iod wurde solange durch Zugabe von Ascorbinsäure entfernt, bis die Lösung wieder farblos wurde. Anschließend wurde die Lösung auf ein Volumen von 400 ml mit Wasser verdünnt und auf eine C18-SPE-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 200 ml Wasser gewaschen. Das Peptid wurde mit 50 ml Acetonitril/Wasser (95:5 Volumenteile) von der Säule eluiert. Direkt im Anschluss wurde das Roh-Peptid über LCMS auf Basis eines Nebula Aufreinigungssystems (Gilson) gereinigt.

Insgesamt wurde das 41mere Peptid dreimal über HPLC aufgereinigt. Das per Mikrowellenpeptidsynthese synthetisierte lineare Peptid AGEM400 wurde nach der Synthese mittels HPLC-MS an einer C18-Säule (Reprosil) aufgereinigt. Nach Zyklisierung und erneuter Aufreinigung ergab sich bereits eine Reinheit von über 85%. Nach Schließung der 2. Disulfidbrücke und erneuter Aufreinigung konnte eine

Reinheit von über 90% erzielt werden. In der nachfolgenden Grafik ist die Aufreinigung des zweifach zyklisierten Peptides zu sehen, dessen Reinheit aufgrund des Einsatzes von Mikrowellenpeptidsynthese sowie von 3 Aufreinigungsschritten per HPLC angesichts der Länge und Komplexität des Peptides erstaunlich hoch ist.

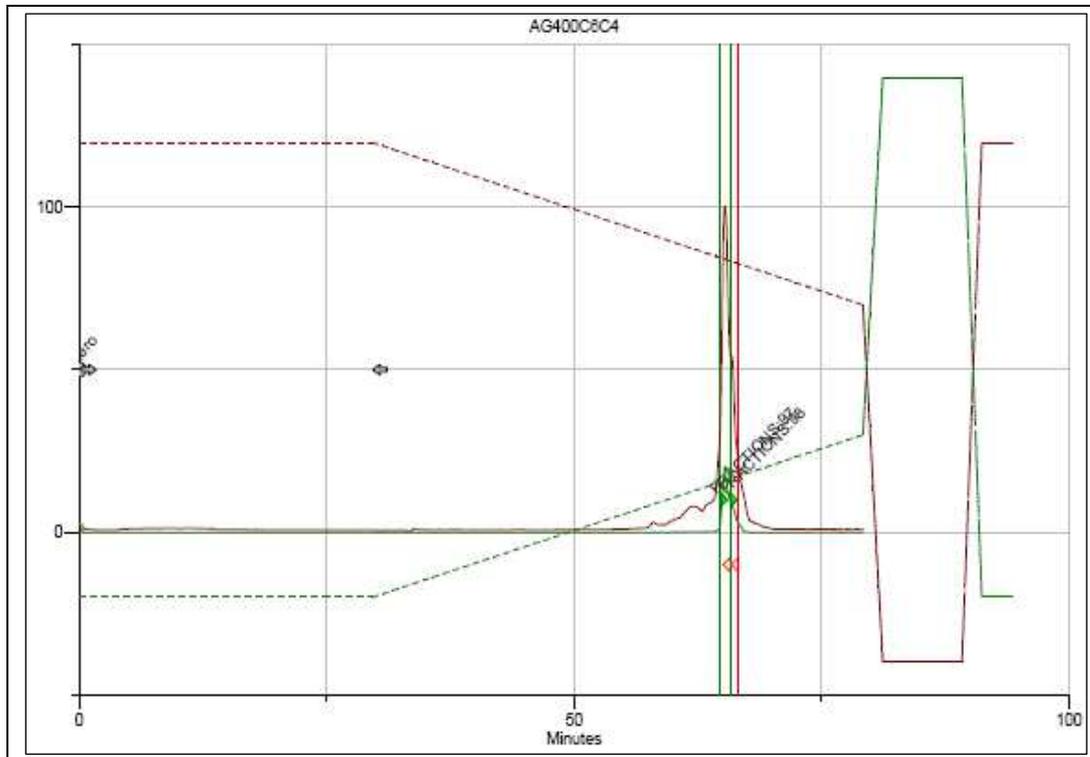


Abb. 2.1: Aufreinigung des bicyclischen AGEM400 mittels HPLC-MS an einer C18-Säule (Reprosil 10-100A) – rote Spur: UV-Signal bei 216 nM, grüne Spur: MS-Signalintensität der korrekten Masse

2.2.2.4 Entschützung der endständigen Cysteine

Die Entschützung der terminalen tert-butyl-Gruppen wurde unter Verwendung von HF und Anisol für 1.25 Stunden von der Firma PolyPeptide Laboratories durchgeführt. Die Reaktion war quantitativ, und das Roh-Peptid wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

2.2.2.5 Konjugation an HES (Hydroxyethylstärke)

Zur Konjugation des fertigen bivalenten Peptides mit einer freien Thiol-Gruppe wurde eine kleine Menge von 10-20% des Peptides in Phosphatpuffer (50 mM Phosphat, 150 mM NaCl, pH 6,5) 1-2 Stunden zur Kopplung an den polymeren Carrier mit

aktiven Maleimid-Gruppen verwendet. Die Bedingungen wurden dazu optimiert, um einerseits die Stabilität der Polymerstruktur, der Maleimid-Gruppen und der Disulfid-Brücken zu gewährleisten bzw. um andererseits den quantitativen Umsatz der Maleimid-Gruppen beobachten zu können. Nach Ultrafiltration betrug der Massenertrag an gebildetem Konjugat bis zu 95%.

2.2.3 Allgemeine Zellkultur: Medien und Kultivierung tierischer Zelllinien

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5%iger CO₂-Begasung.

Alle Medien wurden mit Amphotericin B (2.5 µg/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Penicillin (100 Units/ml) versetzt. Glutamin wurde bereits durch den Hersteller zugegeben (GibcoGlutamax; Invitrogen).

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Suspension kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage ausgezählt, zentrifugiert, mit frischem Medium verdünnt und in neue Flaschen überführt.

2.2.3.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Dazu wurde der Mittelwert vier ausgezählter Großquadrate gebildet und mit 1×10^4 multipliziert. Dies ergibt die Zellkonzentration/ml.

2.2.3.2 Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein kleines Volumen der Zellen 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung gemischt und in der Neubauer-Kammer ausgezählt (Toni Lindl, „Zell- und Gewebekultur“, 5. Auflage, Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl., 2002; ISBN 3-8274-1194-7).

2.2.3.3 Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad (37°C) aufgetaut und anschließend in einen 50 ml Falcon überführt. 10 ml Kulturmedium wurde tropfenweise zugegeben. Zum Entfernen des Einfriermediums wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und 30 min. bei 37°C und 5%iger CO₂-Begasung inkubiert.

Dann wurden die Zellen zentrifugiert und erneut in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach 4 bis 6 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium erneut gewechselt.

2.2.3.4 Einfrieren von Zellen

Pro Kryoröhrchen wurden 2-4 Millionen Zellen in einem Gesamtvolumen von 1.8 ml eingefroren. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert und in 0.9 ml Kulturmedium resuspendiert und auf Eis gestellt. In jedes Röhrchen wurde tropfenweise 0.9 ml zweifaches Einfriermedium (Medium mit 30% FCS, 20% DMSO) zugegeben. Die Zellen blieben 15 min. auf Eis, wurden dann für 30 min. bei -20°C und anschließend für mindestens eine Stunde bei -80°C gelagert. Die Langzeit-Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.3.5 Responsivitätstest

Die Responsivität von Zelllinien auf Zytokine nimmt erfahrungsgemäß im Verlauf einer etwa vierwöchigen Kultivierung ab und ist dann mit starken Schwankungen im Interassay-Vergleich verbunden. Aus diesem Grund wurden tiefgefrorene Aliquots aller Zelllinien routinemäßig alle zwei Wochen in Kultur genommen. Bevor die neuen Zell-Chargen für Versuche verwendet wurden, wurde die EPO-Responsivität durch einen MTS-Proliferationsassay bestätigt.

2.2.4 Verwendete Zellen und Zelllinien

2.2.4.1 TF-1

TF-1-Zellen sind eine nicht-adhärenente humane erythroide Leukämiezelllinie (DSMZ; ACC 334), die aus dem Knochenmark eines 35-jährigen Mannes mit Erythroleukämie isoliert wurde. Die Proliferation von TF-1-Zellen kann durch verschiedene Zytokine (z.B. GM-CSF, IL-3, EPO) induziert und erhalten werden. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 20% FCS kultiviert. Dem Medium wurden zusätzlich 33 pM humanes IL-3 (PeproTech) zugesetzt. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage in frischem Medium mit einer Dichte von $2-3 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät.

TF-1 ist die Zelllinie, die von der Europäischen Pharmakopöe zur Untersuchung der EPO-Aktivität empfohlen wird.

2.2.4.2 UT-7/EPO

UT-7/EPO ist eine Sub-Zelllinie, die aus UT-7 etabliert wurde. Diese Zellen wachsen ausschließlich in Abhängigkeit von EPO. Die Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS inkl. 0.1 nM EPO kultiviert und alle 2-3 Tage mit einer Dichte von $2-3 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät.

UT-7 ist eine humane Leukämiezelllinie, die in Abhängigkeit von IL-3, GM-CSF oder EPO wächst. UT-7 Zellen haben eine deutlich höhere Anzahl von EPO-Rezeptoren als TF-1.

Die UT-7/EPO-Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann (Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck) zur Verfügung gestellt.

2.2.4.3 M07e

M07e (M-07e) ist eine humane akut megakaryoblastische Leukämiezelllinie, die in Abhängigkeit von GM-CSF bzw. IL-3 wächst (DSMZ; ACC104).

Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 20% FCS inkl. 10 ng/ml hIL-3 (Peprotech) kultiviert und alle 2-3 Tage mit einer Zelldichte von $4-6 \times 10^5$ Zellen/ml in frischem Medium ausgesät.

2.2.4.4 SupT1

SupT1 (Sup-T1) ist eine humane CD4-positive lymphoblastische Leukämiezelllinie (DSMZ; ACC 140). Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS kultiviert und alle 2-3 Tage mit einer Zelldichte von $1-2 \times 10^5$ Zellen/ml in frischem Medium ausgesät.

2.2.4.5 Mononukleäre Zellen (MNC)

Humane MNC wurden von der Firma StemCell Technologies (ABM007F) bezogen.

Von der Firma Covance (Münster) wurden Knochenmarkspräparationen von Cynomolgus- bzw. Pavian-Affen bezogen. Die MNC wurden mittels Ficoll-Dichtegradienten isoliert.

2.2.5 Ficoll Dichtegradienten: Separation mononukleärer Zellen aus Knochenmark

1-3 ml Proben der Knochenmarkspräparationen wurden in 20 ml HBSS resuspendiert, zentrifugiert und in 20 ml PBS aufgenommen. Größere Gewebestücke wurden entfernt. Die Zellsuspension wurde durch einen Pre-Separation Filter (Miltenyi) von Zellaggregaten befreit. Anschließend wurde die Zellsuspension vorsichtig auf 20 ml Ficoll pipettiert. Danach erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation mit 1500 rpm und langsamer Abbremsung, bei der die MNC von den restlichen Zellen des Knochenmarks isoliert wurden: Erythrozyten und Granulozyten haben eine höhere Dichte als die anderen Zellen aus diesem Zellpool und sedimentieren auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens, während die MNC mit einer niedrigeren Dichte an der Grenze PBS/Ficoll eine weiße Interphase bilden. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen, zu einem gleichen Volumen HBSS pipettiert und zweimal mit 20 ml HBSS durch Absaugen und vierminütiger Zentrifugation mit 1500 rpm gewaschen. Das Pellet wurde in 50 ml HBSS resuspendiert. Die Lebendzellzahl wurde mit Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Kammer bestimmt.

2.2.6 Proliferationsnachweis mittels MTS-Assay

Der MTS-Assay (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega) beruht auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes *MTS* (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfonphenyl)-2H-tetrazolium) durch Dehydrogenasen (Mitochondrien). Dies geschieht unter Bildung eines Formazan-Farbstoffs. Photometrisch kann die Farbstoffbildung bei 490 nm (Referenzfilter 620 nm) quantifiziert werden. Sie korreliert nach Abzug des Leerwertes direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur.

Humane TF-1- und UT-7/EPO-Zellen wurden über drei Tage mit verschiedenen EPO- bzw. Peptid-Konzentrationen in 96-Well-Zellkulturplatten inkubiert.

Um die Responsivität von UT-7/EPO- und TF-1-Zellen auf EPO bzw. auf die mimetischen Peptide in MTS-Assays zu erhöhen, wurde zwei Tage vor Versuchsbeginn von den normalen Kulturbedingungen abgewichen: TF-1- und UT-7/EPO-Zellen wurden in RPMI-Medium mit nur 5% FCS ohne Zugabe IL-3 oder EPO (TF-1) oder in DMEM mit 10% FCS ohne EPO-Zugabe (UT-7/EPO) kultiviert. Auch während des Assays wurden bei TF-1 nur 5% FCS eingesetzt.

Folgendes Pipettierschema wurde bei einer 96-Well-Platte verwendet:

Die Verdünnungsreihe verlief mäanderförmig von 1 bis 17 als Vierfach-Bestimmungen pro Verdünnung. Das Well mit der Position 18 enthielt als „Nullwert“ nur Zellen ohne Testsubstanz. Reihe A und Reihe H wurden mit 200 µl destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Verdünnungen wurden in der Platte in doppelter Konzentration pipettiert, da durch die spätere Zugabe des Zellvolumens noch eine 1:2-Verdünnung hinzu kam. Dabei dienten die Spalten 1; 5 und 9 als Verdünnungspools, in denen die Verdünnungen hergestellt wurden. In alle Wells der Spalten 1; 5 und 9, außer in das Well 1, wurden 200 µl Medium vorgelegt. Die höchste Konzentration (Well 1) wurde in einem Volumen von 292 µl in das Well pipettiert. Aus Well 1 wurde mit einem Transfervolumen von 92 µl die Verdünnungsreihe bis Well 17 fortgeführt. Für die Vierfach-Bestimmung jeder Verdünnungsstufe wurden nun 3x 50 µl aus den Wells der Spalten 1; 5 bzw. 9 in die drei Wells jeweils rechts davon pipettiert. Anschließend wurden $1.0-1.5 \times 10^4$ Zellen in einem Volumen von 50 µl in jedes Well zugegeben. Die Zellen wurden drei Tage im Brutschrank kultiviert. Die Proliferation wurde colorimetrisch mittels MTS-Assay nach Angaben des Herstellers bestimmt. Für die Auswertung wurden die Mittelwerte bestimmt. Aufgrund von Pipettierungenauigkeiten wurden dabei nur die Werte der drei Wells rechts neben den Wells der Spalten 1; 5 und 9 verwendet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O											
B	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
C	4	4	4	4	5	5	5	5	6	6	6	6
D	7	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9
E	10	10	10	10	11	11	11	11	12	12	12	12
F	13	13	13	13	14	14	14	14	15	15	15	15
G	16	16	16	16	17	17	17	17	18	18	18	18
H	H ₂ O											

2.2.7 Durchflusszytometrie: FACS-Analyse

Die Messung mit einem Durchflusszytometer beruht darauf, dass die Zellen durch eine Kapillare in einem Flüssigkeitsstrom einzeln einen Laserstrahl passieren. Dabei können verschiedene physikalische Eigenschaften der Zelle wie relative Partikelgröße, relative Granularität (interne Komplexizität) oder relative Fluoreszenzintensität gemessen werden. Das Durchflusszytometer basiert auf einem optisch-elektronisch gekoppelten System, das ermittelt, wie eine Zelle (Partikel) einfallendes Licht streut und Fluoreszenzen emittiert. Die Lichtsignale werden durch optische Detektoren erfasst. Anschließend werden die Lichtsignale zuerst in elektronische und dann in digitale Signale umgewandelt.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC=*Forward scatter*) entsteht durch Beugung des Lichts und wird als Parameter für die Zellgröße verwendet. Das Seitwärtsstreulicht (SSC=*Side Scatter*) entsteht durch Brechung des Lichts und wird als Parameter für Größe und Struktur (Granularität) des Partikels verwendet. Durch diese beiden Parameter allein kann eine heterogene Zellpopulation in ihre einzelnen Untergruppen aufgetrennt werden.

Darüber hinaus können Oberflächenmarker der Zellen mit spezifischen Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. FITC (FL-1-Kanal) oder PE (FL-2-Kanal) gelabelt sind, markiert werden. Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung von Oberflächenantigenen (CD=*Cluster of Differentiation*) und Apoptosemarkern eingesetzt.

Bei allen durchflusszytometrischen Bestimmungen wurde zum Ausschluss toter Zellen gleichzeitig eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) durchgeführt. PI ist ein Nukleinsäureinterkalator und kann nur durch perforierte Membranen in die Zelle eindringen. Intakte lebende Zellen sind für PI impermeabel. Das Probenvolumen wurde vor der Messung um 400 µl PBS inkl. 10µg/ml PI erhöht.

2.2.8 Detektion des EPO-Rezeptors (EPO/R) und des IL-3-Rezeptors (CD131) auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien

Die Zelllinien UT-7/EPO, TF-1, M07e und SupT1 wurden mit einem FITC-markierten anti-hEPO/R Antikörper (R&D, FAB307F) bzw. mit einem PE-markierten anti-CD131 Antikörper (NatuTec, eBioscience 12-1319-71) inkubiert. Vor der Färbung der Zellen mit dem jeweiligen Antikörper wurden UT-7/EPO- (10% FCS im Medium) und TF-1-

Zellen (5% FCS im Medium) 48 Stunden bzw. M07e-Zellen (20% FCS im Medium) 72 Stunden ohne Zytokin kultiviert. SupT1-Zellen wachsen Zytokin-unabhängig und wurden direkt mit entsprechender Zellzahl aus der regulären Kultur entnommen.

Die anschließende FACS-Analyse sollte Aufschluss über die relative Anzahl beider Rezeptoren auf den Oberflächen der verschiedenen Zelllinien geben. Für die Färbung wurden 20000-50000 Zellen verwendet. In einem Ansatz wurden die Zellen mit anti-EPO/R-FITC und anti-CD131-PE gleichzeitig gefärbt, und in einem zweiten Ansatz wurden die Zellen zur Negativkontrolle mit murinem IgG1-FITC (Sigma, F6397) und gleichzeitig mit murinem IgG2-PE (Sigma, P4810) gefärbt. Die Zellen wurden in 20 µl der jeweiligen Antikörper-Lösung suspendiert und 30 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 500 µl MACS-Puffer zugegeben. Die Proben wurden zentrifugiert (4 min., 4600 rpm), die Überstände abgesaugt und die Zellen in 400 µl PBS-Puffer inkl. PI resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

Die Antikörper wurden nach folgendem Schema in Blocking-Puffer verdünnt:

Färbelösung

- anti-EPO/R-FITC 1:3
- anti-CD131-PE 1:6

Kontrollfärbelösung

- IgG1-FITC 1:20
- IgG2a-PE 1:10

2.2.9 Untersuchung apoptotischer Prozesse

Vor Versuchsbeginn wurden TF-1-Zellen mit 7×10^5 Zellen/ml 48 Stunden in Kulturmedium, das nur 5% FCS und kein IL-3 enthielt, vorinkubiert.

Die Zellen wurden anschließend drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen von EPO bzw. der Peptide bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert.

2.2.9.1 Nachweis von Annexin V

Eines der Merkmale früher Apoptose ist die Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der Membraninnenseite zur Membranaußenseite. Annexin V bindet hochaffin an PS und kann durch Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff nach Bindung an die Zelle durchflusszytometrisch detektiert werden. Der Nachweis wurde mit dem Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Cat.No.: 556547; BD Pharmingen™) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.9.2 Nachweis aktiver Caspasen

Die Apoptose ist ein mehrstufiger Prozess, der von einer Aktivierungskaskade von Caspasen begleitet wird, die auf verschiedenen Ebenen der Apoptose in einer bestimmten Reihenfolge am Zugrundegehen der Zellen beteiligt sind. Die Caspasen-3, -7 und -8 gehören zu den Caspasen, die zu Beginn der Apoptose aktiviert werden. Der Nachweis aktiver Caspase-3 und -7 bzw. Caspase-8 basiert auf Fluorochromen Inhibitoren von Caspasen (FLICA). Die Inhibitoren sind zellpermeabel und nicht zytotoxisch. Das FLICA-Reagens bindet an reaktive Cystein-Reste aktiver Caspasen und produziert eine grüne Fluoreszenz. Eine weitere Aktivierung der Caspase wird durch die irreversible Bindung der Caspasen unterbunden. Ungebundenes FLICA Reagens diffundiert aus der Zelle und wird gewaschen. Das verbleibende Fluoreszenz-Signal dient als direkter Messwert der Menge aktivierter Caspasen-3, -7 oder -8 zum Zeitpunkt der Zugabe des Inhibitors. Die Detektion erfolgte durchflusszytometrisch.

Der Versuch wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Vybrant® FAM Caspase-8 Assay Kit (V35119), Vybrant® FAM Caspase-3, -7 Assay Kit (V35118); Molecular Probes) durchgeführt.

2.2.10 Differenzierungsnachweise

2.2.10.1 Nachweis der CD34-Abnahme bei TF-1-Zellen

Humane TF-1-Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche den Marker CD34, der charakteristisch für hämatopoetische Vorläuferzellen ist. CD34 ist ein Oberflächenprotein, das mit fortschreitender Differenzierung nicht mehr von den Zellen exprimiert wird und dauerhaft an der Oberfläche verloren geht.

Vergleichend zum rekombinanten EPO wurde der Einfluss von AGEM400 bzw. AGEM400-HES auf die Differenzierung von TF-1-Zellen durch den Verlust von CD34 nachgewiesen.

In 24-Well-Platten wurden Verdünnungsreihen der Testsubstanzen angesetzt, sodass in jedem Well 250 µl jeder Verdünnungsstufe vorlagen. Die höchsten Konzentrationen jeder Verdünnungsreihe wurden in doppelter Konzentration angesetzt, da durch die spätere Zugabe von 250 µl Zellvolumen noch eine 1:2 Verdünnung der gelösten Testsubstanzen hinzukam. Die Zellkonzentration betrug 2×10^5 Zellen/ml. Insgesamt wurden die Zellen sechs Tage bei 37°C und 5% CO₂-Begasung inkubiert. Nach 2-3 Tagen erhielten die Zellen zusätzlich 500 µl frisches Medium inkl. Testsubstanz in der entsprechenden Verdünnungsstufe. EPO wurde mit sieben serial aufeinanderfolgenden 1:3.2 verdünnten Konzentrationen eingesetzt. AGEM400 und AGEM400-HES wurden mit acht verschiedenen serial verdünnten 1:3.2 Konzentrationen verwendet. In der Negativkontrolle wurden Zellen ohne Testsubstanz kultiviert.

Der Nachweis von CD34 an der Zelloberfläche erfolgte mit einem FITC-markierten anti-CD34 Antikörper (Miltenyi Biotec, #130-081-001). Gleichzeitig wurden die Zellen mit einem PE-markierten anti-CD133 Antikörper (Miltenyi Biotec, #130-080-901) gefärbt. CD133 ist ein Oberflächenmarker von Vorläuferzellen, der auf der Oberfläche von TF-1-Zellen nicht mehr vorkommt. Die Färbung mit anti-CD133-PE diente als Negativkontrolle zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen.

Für die Immunfärbung wurden 20000 Zellen jeder Verdünnungsstufe in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen zentrifugiert (4 min., 4600 rpm) und in 20 µl Färbelösung resuspendiert.

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte im Blocking Puffer für FACS-Analysen. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen der Antikörper wurden die Zellen in einem Parallelansatz gleichzeitig mit den Antikörpern IgG1-FITC bzw. IgG2a-PE inkubiert. Die Proben wurden für 30 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde zu jedem Ansatz 500 µl MACS-Puffer zugegeben. Die Proben wurden zentrifugiert (4 min. 4600 rpm), die Überstände abgesaugt und die Zellen in 400 µl MACS-Puffer inkl. PI resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

Die Antikörper wurden nach folgendem Schema in Blocking Puffer (10 mM PBS, 5 % Humanserum, 5% FCS) verdünnt:

Färbelösung

- anti-CD34-FITC 1:20 verdünnt
- anti-CD133-PE 1:20 verdünnt

Kontrollfärbelösung

- IgG1-FITC 1:20 verdünnt
- IgG2a-PE 1:10 verdünnt

2.2.10.2 CFU-(Colony-Formation-Unit-) Assay

Dieser Assay beschreibt eine semisoliden Zellkultur von mononukleären Zellen in Methylcellulose, die aus Blut bzw. Knochenmark isoliert wurden. Dabei kommt es zur Koloniebildung aus verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen.

Der CFU-Assay ist ein Kolonietest, bei dem der Einfluss von EPO und den Peptiden auf die Differenzierung und Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen (CD34⁺-Zellen) aus dem Knochenmark verschiedener Spezies (Mensch, Cynomolgus) untersucht wurde.

In dieser Arbeit wurde insbesondere die Bildung erythroider Kolonien (CFU-E, BFU-E) in Abhängigkeit von EPO bzw. den EPO-mimetischen Peptiden untersucht. Die gebildeten Kolonien wurden mikroskopisch bewertet und ausgezählt.

Darüber hinaus fand man weiße Kolonien der Zelltypen CFU-M (**Colony Forming Unit-Macrophage**), CFU-G (**Colony Forming Unit-Granulocyte**), CFU-GM (**Colony Forming Unit-Granulocyte/ Macrophage**) und CFU-GEMM (**Colony Forming Unit-Granulocyte/ Erythroblasts/ Macrophage/ Megakaryocytes**), aus denen weitere hämatopoetische Zelltypen ausdifferenzieren können. Die nachfolgenden Aufnahmen zeigen exemplarisch verschiedene Kolonietypen in Methylcellulose.

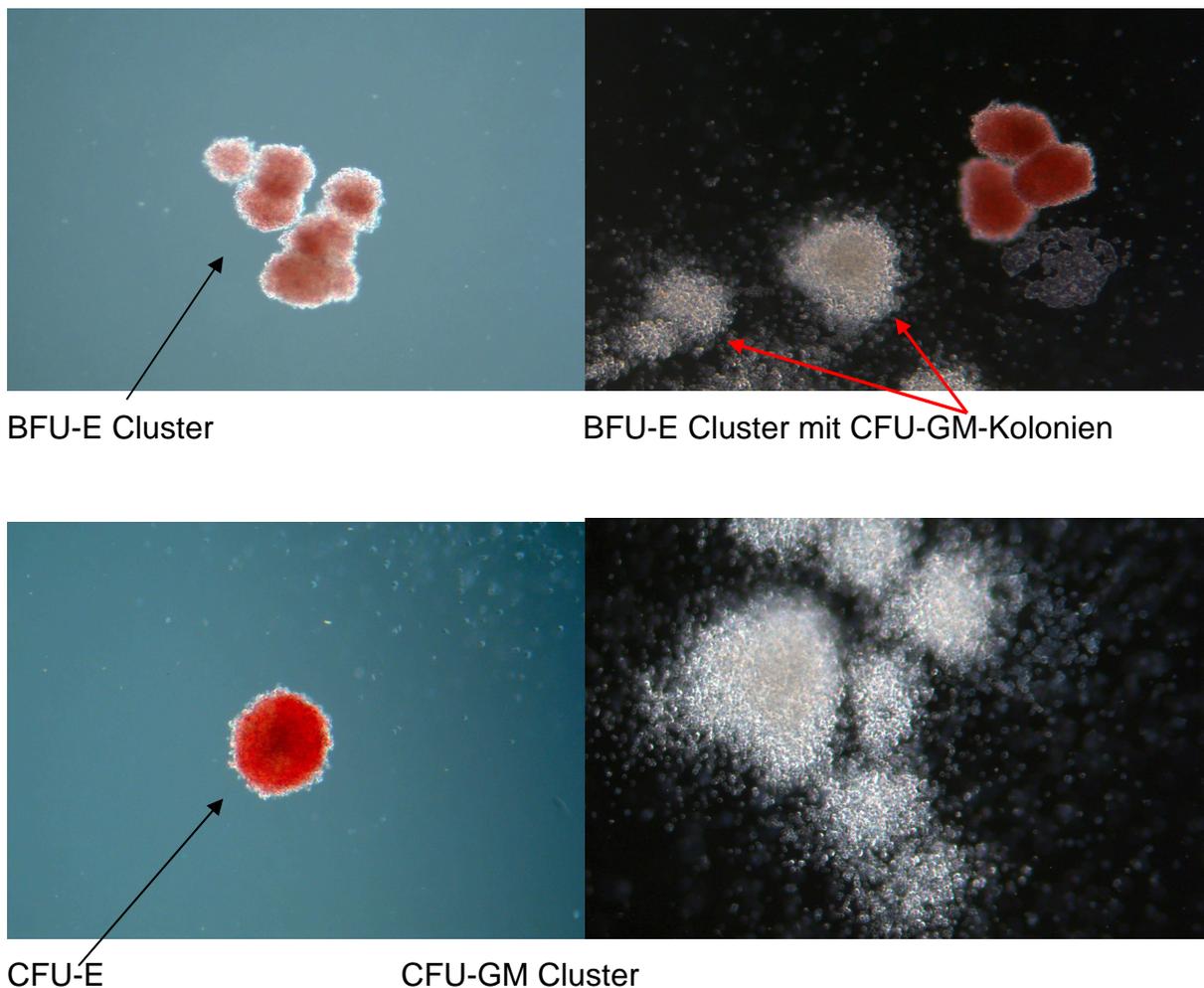


Abb. 2.2: Digitalaufnahmen verschiedener Kolonietypen (CFU-Assay)

Differenzierung humaner Knochenmarkszellen nach Kultivierung mit AGEM400-HES. Die Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop DFC420 von Leica mit einem 4x-Objektiv gemacht.

Die Methylcellulose (MethoCult™GF H), die einen Cocktail humaner Zytokine enthielt, wurde von der Firma Cellsystems bezogen.

Für humane Knochenmarkszellen wurde MethoCult™GF H4535 (inkl. hSCF, hGM-CSF, hIL-3, hIL-6, hG-CSF) verwendet. Für Knochenmarkszellen aus Affen wurde alternativ MethoCult™GF H4534 (inkl. hSCF, hGM-CSF, hIL-3) eingesetzt.

Von EPO und den Peptiden wurden Verdünnungsreihen in IMDM-Medium mit 2% FCS hergestellt. Dem Medium wurde zusätzlich noch Amphotericin B (25 µg/ml) und Penicillin/Streptomycin (1000 Units/ml) zugesetzt. Die Konzentrationen aller zugegebenen Substanzen wurden in je 22-fach höherer Konzentration angesetzt, da durch das Vereinen der Substanz-Verdünnungen mit dem Zellvolumen und der Methylcellulose eine entsprechend 22-fache Rückverdünnung erfolgte. 1.4 ml Methylcellulose-Portionen wurden mit 70 µl jeder Verdünnungsstufe der Testsubstanzen durch vortexen vermischt. Die Röhrcchen wurden 10 min. stehen

gelassen, damit die entstandenen Luftblasen entweichen konnten. Währenddessen wurden die Knochenmarkzellen aufgetaut, mit Medium gewaschen und die Lebendzellzahl mit Trypanblaufärbung bestimmt. Die Zellen wurden mit entsprechender Dichte (Human: 6×10^5 Zellen/ml; Affe: 8×10^5 Zellen/ml) in IMDM-Medium mit 2% FCS verdünnt. 70 μ l Zellsuspension wurden in jede Methylcellulose-Probe pipettiert. Die Proben wurden erneut gevortext und wieder 10 min. zum Entweichen der Luftblasen stehen gelassen. Im Anschluss wurde von den insgesamt 1.54 ml einer jeden Probe so viel Volumen wie möglich ohne Entstehung von Luftblasen mit einer Spritze aufgezogen (19-gauge Nadeln). Davon wurden 1.1 ml jeder Probe in je einem Well einer 6-Wellplatte pipettiert und durch Schwenken der Platte verteilt. Die humanen Zellen wurden 12 Tage und die Affenzellen (Cynomolgus) wurden 10 Tage im Brutschrank inkubiert.

2.2.10.3 Nachweis von CD36 und GlycophorinA (CD235a)

CD36 und GlycophorinA (CD235a) sind Oberflächenantigene von Erythrozyten. GlycophorinA ist ein integrales Membranprotein. GlycophorinA wird auf der Oberfläche erythroider Zellen exprimiert, sobald sie zu morphologisch erkennbaren erythroiden Vorläuferzellen differenziert sind. Dies ist kurz nach dem CFU-E-Stadium erreicht. Ab diesem Stadium ist GlycophorinA in allen weiteren Differenzierungsstadien bis hin zum reifen Erythrozyten auf der Oberfläche der Zellen nachweisbar. Die Funktion von Glycophorin A ist bis heute nicht vollständig geklärt.

CD36 kommt auf verschiedenen Zelltypen wie z.B. Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten oder Megakaryozyten vor und ist ebenfalls ein integrales Membranprotein. Es wird in Erythrozyten ab dem Differenzierungsstadium des Erythroblasten auf der Oberfläche der Zellen exprimiert. Für CD36 wurden für die einzelnen Zelltypen verschiedene Funktionen beschrieben, aber konnten zum größten Teil noch nicht eindeutig verifiziert werden.

Im Rahmen dieser Untersuchung dienten CD36 und GlycophorinA zum Nachweis der Differenzierung humaner Knochenmarkzellen (MNC) unter dem Einfluss von AGEM400 und AGEM400-HES. Zu Versuchsbeginn waren die eingesetzten Zellen noch undifferenziert und lediglich für einen bestimmten Zelltyp geprägt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die beiden Oberflächenantigene CD36 und GlycophorinA noch nicht exprimiert.

Die Knochenmarkzellen wurden 13 Tage mit 1:10 verdünnten Konzentrationen im Bereich von 30 ng/ml bis 0.003 ng/ml für EPO bzw. 20 ng/ml bis 0.002 ng/ml für AGEM400-HES in Methylcellulose kultiviert. Die Methylcellulose wurde anschließend verflüssigt und CD36 bzw. GlycophorinA mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern in einer semiquantitativen Messung durchflusszytometrisch bestimmt. Die detektierten CD36⁺- bzw. GlycophorinA⁺-Zellen wurden in Relation zu einer konstanten Anzahl gleichzeitig gemessener Kalibrier-Beads gesetzt. Der Nachweis erfolgte mit fluoreszent-markierten anti-CD36 (Fitzgerald Industries, #RDI-M1613clb) bzw. anti-GlycophorinA (Fitzgerald Industries, #RDI-CBL409PE) Antikörpern und durchflusszytometrischer Detektion im Anschluss an einen CFU-Assay.

Da Methylcellulose ein semisolid Medium ist, wurde es vor der Bestimmung verflüssigt. Dazu wurden 3 ml mit 10% FCS in jedes Well gegeben, und die Platten wurden ca. 2 Stunden bei 4°C bis zur Verflüssigung des Mediums gelagert. Das verflüssigte Medium wurde in Falcons überführt, und es wurden weitere 4 ml RPMI mit 10 % FCS zugegeben. Die Proben wurden zentrifugiert (4 min., 1500 rpm) und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (4 min., 1500 rpm). Die Pellets wurden jeweils in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert und zu je 200 µl Portionen auf zwei 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (4 min., 3500 rpm). Ein Pellet wurde mit 20 µl Färbelösung I zur Detektion von CD36 und GlycophorinA resuspendiert. Das andere Pellet wurde mit 20 µl Färbelösung II zur Kontrolle unspezifischer Bindungen (Negativkontrolle) resuspendiert. Die Antikörper wurden in den Färbelösungen I und II nach dem angegebenen Schema in Blocking-Puffer verdünnt. QuantiBrite®-Beads wurden nach Herstellerangaben zur Bestimmung der relativen Anzahl positiver Zellen bei jeder Einzelmessung mitgeführt. Die Proben wurden 30 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 µl PBS inkl. Propidiumiodid (PI; 10 µg/ml) zu jeder Probe gegeben und durchflusszytometrisch bestimmt.

Färbelösung I

- Anti-CD36-FITC 1:10 verdünnt
- Anti-CD235a-PE 1:10 verdünnt

Färbelösung II

- IgG1-FITC 1:20 verdünnt
- IgG2a-PE 1:10 verdünnt

2.2.10.4 Herstellung von Zellextrakten aus Methylcellulose-Kulturen zur Hämoglobinbestimmung

Die durch AGEM400 bzw. AGEM400-HES induzierte Hämoglobin-Bildung wurde in Affenzellen vergleichend zu EPO untersucht. Im Laufe der Entwicklung erythroider Zellen kommt es in den letzten Differenzierungsstufen zur Bildung von Hämoglobin. Die Detektion von Hämoglobin wurde alternativ zum Nachweis der Differenzierung erythroider Affenzellen durchgeführt. Bei den Affenzellen bot sich dieses Verfahren als besserer Nachweis der erythroiden Differenzierung an. CD34, CD36 und Glycophorin A wurde bei den humanen Zellen durch Antikörper detektiert, die nur humane Epitope spezifisch erkennen und binden. Die Verwendung dieser Antikörper zum Nachweis der drei genannten Oberflächenantigene auf Affenzellen führte zu starken unspezifischen Signalen.

Die Hämoglobinbestimmung erfolgte im Anschluss an einen CFU-Assay.

Dazu wurde die Methylcellulose in jedem Well zunächst verflüssigt (vgl. Nachweis von CD36/CD235a) und in Falcons überführt.

Anschließend wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge 4 min. bei 1500 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 ml kalten MACS-Puffer resuspendiert und in 1.5 ml Eppis überführt. Die Proben wurden nochmals 5 min. bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und dann in 500 µl kaltem MACS-Puffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Pellets in 100 µl PBS/1% TritonX-100 zur Lyse resuspendiert, gevortext und im Anschluss 10 min. auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden dann in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C 15 min. zentrifugiert.

Der zellfreie Überstand wurde abgenommen und für die Hämoglobinbestimmung verwendet.

2.2.10.5 Hämoglobin-Bestimmung nach Luftig (1977)

Die Hämoglobinbestimmung nach Luftig et al. basiert auf der Benzidin-Peroxidase-Reaktion. Eine in Essigsäure gesättigte Benzidin-Lösung wird in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zur Probe gegeben. Dabei wird Sauerstoff vom Wasserstoffperoxid auf Benzidin durch die Hämgruppen des Hämoglobins übertragen. Es kommt zu einem Farbumschlag von blaugrün auf rot. Die Intensität

der Rotfärbung korreliert mit der Menge an Hämoglobin und kann colorimetrisch bestimmt werden.

Die Zellextrakte wurden in Falcons überführt und mit 200 µl einer 1%igen Benzidin-Lösung in 90%iger Essigsäure gemischt. Durch Zugabe von 200 µl einer frisch hergestellten 1%igen Wasserstoffperoxid-Lösung kam es zunächst zu einer blaugrünen Färbung. Die Proben wurden für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit kam es zu einem Farbumschlag nach rot. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml 10%iger Essigsäure gestoppt. 200 µl jeder Probe wurden in je ein Well einer 96-Well-Multititerplatte transferiert und im Photometer bei einer Längswelle von 492 nm innerhalb von 30 min. gemessen.

Um die Hämoglobinkonzentration in den Proben bestimmen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe von humanem Hämoglobin (Sigma, H7379) bei der Bestimmung und Messung mitgeführt: Für die höchste Konzentration der Standardkurve (Probe 1) wurden 0.58 mg in 250 µl PBS/1% TritonX-100 gelöst. Von dieser Probe ausgehend wurden die Standard-Proben 3-9 in einer 1:2-Verdünnungsreihe hergestellt. Für Probe 2 wurden 0.41 mg in 250 µl PBS/1% TritonX-100 separat gelöst. Die folgende Tabelle zeigt die daraus resultierenden Hämoglobinmengen pro Standard-Probe.

Probe	Humanes Hämoglobin (µg)
1	58
2	41
3	29
4	14.5
5	7.3
6	3.6
7	1.8
8	0.9
9	0.5
10	0

Für die Benzidin-Färbung wurden 25 µl jeder Standardprobe verwendet.

2.2.11 Untersuchungen zur Rezeptorbindung

2.2.11.1 Kompetitionsassay mit einem löslichen EPO/R (sEPO/R) in TF-1 und UT-7/EPO

Zur Untersuchung der spezifischen Bindung der Peptide an den EPO-Rezeptor wurden mit TF-1- und UT-7/EPO-Zellen MTS-Assays, bei dem der endogene EPO-Rezeptor durch Zugabe eines löslichen EPO-Rezeptors (Sigma, sEPO/R; E0643) kompetiert werden sollte, durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 3 Tage mit verschiedenen EPO-, IL-3- bzw. Peptid-Konzentrationen in Anwesenheit von 2 µg/ml sEPO/R oder ohne sEPO/R kultiviert. Die Konkurrenz ist durch die Abnahme der Proliferation bzw. der Abnahme metabolisch aktiver Zellen nachweisbar, da der sEPO/R die Testsubstanzen bei einer Konkurrenz abfängt, und diese den membranständigen EPO-Rezeptor nicht mehr binden und aktivieren können.

IL-3 wurde mit 3 ng/ml, EPO und AGEM400-HES wurden jeweils mit 10 ng/ml in der höchsten Konzentration eingesetzt. Von der höchsten Konzentration ausgehend folgten für alle Substanzen vier 1:3.2-Verdünnungen. Der fünfte Wert entsprach der Kontrolle ohne Testsubstanz.

2.2.11.2 Qualitative Bestimmung des Antagonismus zwischen transmembranem (endogenem) und löslichem EPO/R

Der Konkurrenzassay wurde wie oben angegeben in UT-7/EPO mit acht weiteren Konzentrationen des löslichen EPO/R durchgeführt. Als Kontrollen wurden für jede EPO-Konzentrationsreihe der Nullwert (Zellen ohne EPO) bzw. eine EPO-Konzentrationsreihe ohne Antagonist (sEPO/R) mitgeführt.

2.2.11.3 Radioliganden-Bindungsassay

Dieser Assay wurde bei MDS Pharma (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. 40 pM ¹²⁵I-markiertes rhEPO (R&D Systems) wurden an einen löslichen EPO/R (in NSO-Zellen exprimiert; R&D Systems), der über ein Fc-Fragment an SPA-Beads (**Scintillation Proximity Assay**) gekoppelt war, in Kalium-Puffer (pH 7.4) aufgebunden. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen von EPO bzw. AGEM400 und AGEM400-HES als Konkurrenten zugegeben. Die nachfolgende Tabelle gibt die eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanzen an:

EPO ng/ml	AGEM400 ng/ml	AGEM400-HES ng/ml
100	460	220
34	140	70
10	46	22
3.4	14	7
	4.6	2.2
		0.7

Bei einem Kontrollansatz wurden Zellen ohne Testsubstanz kultiviert.

Die Inhibierung der Bindung des radioaktiven EPO wurde prozentual in Relation zur Konzentration des jeweiligen Kompetitors gesetzt. Durch Bestimmung der Kompetitor-Konzentration bei halbmaximaler Inhibierung wurden die IC50-Werte ermittelt.

2.2.12 Untersuchungen zur Signaltransduktion

Die Aktivierung (Phosphorylierung) von STAT5 bzw. von ERK1/2 wurde nach Stimulation von UT-7/EPO-Zellen mit EPO bzw. mit den Peptiden mittels spezifischen Antikörpern in der Western Blot Analyse untersucht. Konstitutiv exprimiertes STAT5 bzw. ERK1/2 wurden als Kontrollen parallel detektiert.

UT-7/EPO wurden 48 Stunden vor der Stimulation mit EPO bzw. den Peptiden in DMEM-Medium mit 10% FCS ohne Zytokin kultiviert. Die Zellen wurden mit 1×10^6 Zellen/ml in Medium mit verschiedenen EPO- oder Peptid-Konzentrationen in 50 ml Falcons überführt und bei 37°C und 5%-iger CO₂-Begasung über definierte Zeiträume hinweg stimuliert.

2.2.12.1 Aktivierung von STAT5

Zunächst wurde über eine 30-minütige Stimulation mit einer serial 1:10 verdünnten fünfstufigen Konzentrationsreihe von jeder Substanz jeweils der Konzentrationsbereich bestimmt, der mindestens eingesetzt werden musste, um ein maximales Signal hervorzurufen. EPO wurde mit 340 ng/ml, AGEM400 mit 2200 ng/ml und AGEM400-HES mit 460 ng/ml in der höchsten Dosis eingesetzt. Nachdem die niedrigste Konzentration zur Erreichung des maximalen Effektes bestimmt war,

wurden die Zellen mit dieser Konzentration über 0.5; 1; 2; 4 und 24 Stunden bei 37°C und 5%-iger CO₂-Begasung stimuliert.

2.2.12.2 Aktivierung von ERK1/2

Die Zellen wurden über 0.5, 4 und 24 Stunden mit 3.4 ng/ml EPO oder 10 ng/ml AGEM400-HES bei 37°C und 5%-iger CO₂-Begasung stimuliert.

2.2.12.3 Herstellung von Zellextrakten

Die Stimulationen wurden durch Überführung von 1 ml des Stimulationsansatzes in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß und Zentrifugation (4600 rpm, 4 min.) beendet. Die Zellen wurden in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (4600 rpm, 4 min, 4°C.). Alle weiteren Schritte erfolgten zum Schutz vor enzymatischem Proteinabbau auf Eis. Die Pellets wurden in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen kurz gevortext und zur Entfernung von unlöslichen Zellbestandteilen für 15 min. bei 13000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in neue 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.12.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Diskontinuierliche SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde mit dem NuPAGE®-System von Invitrogen mit allen dazugehörigen Reagenzien, Puffern und Apparaturen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Proben wurden für die SDS-Gelelektrophorese nach folgendem Schema hergestellt:

5 µl	Lysat
3.75 µl	4x Ladepuffer
0.15 µl	1 M DTT-Lösung
6.1 µl	dest. H ₂ O

Volumen: 15 µl

Die Ansätze wurden 5 min. lang bei 99°C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde MOPS-Puffer verwendet. Zur

Auftrennung der Proben im Gel wurde eine konstante Spannung von 170 V angelegt. Kurz bevor die Lauffront des Ladebuffers das untere Gelende erreichte, wurde der Gellauf beendet.

Als Größenstandard wurde SeebulePlus2 (Invitrogen) verwendet.

2.2.12.5 Coomassie-Färbung

Die Färbung mit Coomassie diente der Visualisierung von Proteinbanden in Polyacrylamid-Gelen. Dazu wurde eine Coomassie-Lösung hergestellt, in der die Gele mindestens 1 Stunde eingelegt wurden. Anschließend wurden die Gele zur Entfärbung mit destilliertem Wasser gespült und in destilliertem Wasser bis zur Entfärbung in der Mikrowelle bei 800 Watt für 2 min. erhitzt. Dabei wurde das Wasser nach jedem Erhitzen gewechselt.

Für die Geltrocknung wurde das DryEase® Mini-Gel Trocknungssystem von Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet.

Coomassie-Lösung

0.2% Coomassie Blue R250 (Sigma) in 50% Methanol mit 10% Essigsäure

2.2.12.6 Western Blotting

Western Blotting erfolgte mit PVDF-Membranen (Perbio) und wurde mit dem NuPAGE®-System von Invitrogen inkl. aller dazugehöriger Reagenzien und Apparaturen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Blotting Dauer betrug 1.5 Stunden bei konstanten 25 V.

2.2.12.7 Immunodetektion von STAT5, Phospho-STAT5, ERK1/2 und P-ERK1/2 aus Zellextrakten

Die PVDF-Membranen wurden zur Rehydratisierung 30 Sekunden in Methanol geschwenkt und mit destilliertem Wasser abgespült. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden 5 min. in TBST äquilibriert und dann für eine Stunde mit Blocking-Puffer blockiert. Anschließend wurde der Blocking-Puffer abgekippt, und die Membranen wurden mit dem in Blocking-Puffer verdünnten Primärantikörper eine Stunde inkubiert. Danach

wurden die Membranen zweimal mit TBST gespült und darauffolgend dreimal 5 min. mit TBST gewaschen. Die Membranen wurden für den zweiten Blockierungsschritt mit Blocking-Puffer überschichtet und für eine weitere Stunde inkubiert. Der Blocking-Puffer wurde entfernt und durch den in Blocking-Puffer verdünnten HRP-markierten Sekundärantikörper ersetzt und eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen zweimal mit TBST gespült und darauffolgend viermal 5 min. mit TBST gewaschen. Anschließend wurden die Membranen noch einmal mit TBS gespült und einmal 5 min. mit TBS gewaschen. Vor der Zugabe des HRP-Substrates (Amersham; *ECL Advance Western Blotting Detection Kit*) wurde überschüssiger Puffer über die Längskanten der Membranen mit Krepp-Papier abgezogen. Pro Membran wurde 1 ml einer 1:1-Mischung der beiden Komponenten des chemilumineszenten HRP-Substrates verteilt und für etwa eine Minute inkubiert. Überschüssiges Substrat wurde über die Längskanten der Membranen mit Krepp-Papier abgezogen. Die Membranen wurden in durchsichtige Folien verpackt und zur Belichtung eines Röntgenfilms (Amersham; *ECL Hyperfilm*) in einer Filmkassette fixiert. Die Signale wurden durch Eintauchen der Filme in Entwicklerlösung (# 515 8621; Kodak) für 2 min. und anschließender Spülung mit Wasser und Einlegen der Filme in eine Fixierlösung (Röntgenfixierbad AL4; # 507 1071; Kodak) für 1 min. visualisiert.

In der folgenden Tabelle sind die Verdünnungen der Antikörper angegeben:

Primärantikörper	Verdünnung Primärantikörper	Sekundärantikörper	Verdünnung Sekundärantikörper
Anti-STAT5 (Cell Signaling #9352)	1:5000	Anti-rabbit-IgG-HRP (GE Healthcare #ECL NA934V)	1:10000
Anti-Phospho-STAT5 (Cell Signaling #9356)	1:10000	Anti-mouse-IgG-HRP (DAKO #P0260)	1:30000
Anti-ERK1/2 (Cell Signaling #9102)	1:25000	Anti-rabbit-IgG-HRP (GE Healthcare #ECL NA934V)	1:10000
Anti-Phospho-ERK1/2 (Cell Signaling #9106)	1:10000	Anti-mouse-IgG-HRP (DAKO #P0260)	1:30000

2.2.13 Immunologische Untersuchungen

2.2.13.1 Eurogentec: Immunisierung von Kaninchen

Die Immunisierung von Kaninchen mit EPO bzw. den EPO-mimetischen Peptiden BB68 und AGEM400 wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt. Verwendet wurden 10-12 Wochen alte New-Zealand White SPF Kaninchen (AS-RABB-IT/T).

Die Peptide wurden vor der Immunisierung von Eurogentec an KLH (*Keyhole-limpet hemocyanin*) gekoppelt.

Pro Peptid wurden zwei Versuchstiere und ein Kontroll-Kaninchen, das nur mit KLH immunisiert wurde, verwendet.

Das folgende Schema zeigt den Ablauf der Immunisierung:

Tag	0	14	28	38	56	66	87
Injektion	1.	2.	3.		4.		
Blutung	präimmun			klein		groß	final

Die Blutentnahme zur Gewinnung des Antiserums wurde dem Volumen nach in kleine, große und finale Blutung unterschieden. Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der finalen Blutung wurden die Antikörper gegen EPO, Peptid bzw. KLH bei Eurogentec mittels ELISA bestimmt. Die Antikörper-Titer gegen KLH waren immer 100-fach höher als gegen EPO bzw. die Peptide.

Blutung	Volumen
klein	2-3 ml
groß	20-25 ml
final	50-60 ml

Es wurden die Antiseren **SA4893** (anti-EPO), **SA5047** (anti-BB68) und **SA5048** (anti-AGEM400) gewonnen.

2.2.13.2 Immunodetektion von Erypo® und EMPs mit Antiseren

Mittels Western Blot Analyse wurde untersucht, ob die Antiseren spezifisch nur mit den entsprechenden Antigenen reagieren oder auch miteinander kreuzreagieren. 1.68 ng EPO und je 750 ng BB68 bzw. AGEM400 wurden über ein SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Immunodetektion erfolgte mit den gleichen Puffern, Reagenzien und nach der gleichen Prozedur wie unter 2.2.12.7 beschrieben. Die Membranen wurden mit den Antiseren SA4893 (anti-EPO), SA5047 (anti-BB68) bzw. SA5048 (anti-AGEM400), die 1:200 in Blocking-Puffer verdünnt wurden, inkubiert. Die Detektion erfolgte chemilumineszent durch einen HRP-markierten anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Amersham, #NA934).

2.2.13.3 Charles River: Immunisierung von Schafen

Zum Nachweis von AGEM400 bzw. AGEM400-HES aus verschiedenen Verdünnungsmedien wurde ein ELISA mit einem Schaf-anti-AGEM400 Antikörper entwickelt.

Die Immunisierung von zwei Schafen mit AGEM400-KLH wurde bei Charles River (Sülzfeld, Deutschland) durchgeführt. Finale Blutungen wurden nach dem 3. Boost (=wiederholte Injektion von AGEM400-KLH) durchgeführt. Das anti-AGEM400 Antiserum wurde zur Aufreinigung der gebildeten anti-AGEM400 Antikörper über eine AGEM400-Affinitätssäule gegeben.

2.2.13.4 Sandwich-ELISA: Konzentrationsbestimmung von EMPs in verschiedenen Verdünnungsmedien

Alle Schritte fanden bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte (300 rpm) statt. Das Wechseln der Lösungen in den Wells wurde durch mehrmaliges kräftiges Ausklopfen der Platten auf stark saugende Papiertücher durchgeführt.

Jede Verdünnungsstufe wurde zur Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes und der Standardabweichung in Triplikaten angesetzt.

96-Well-Platten (Greiner, Bio-One 655161) wurden kurz mit 100 µl PBS (Sigma) äquilibriert und anschließend mit in 100 µl PBS verdünntem affinitätsgereinigten Schaf-anti-AGEM400 Antikörper (5 µg/ml) als Erstantikörper für eine Stunde gecoated.

Im Anschluss wurden die Wells dreimal mit jeweils 100 µl PBS gewaschen. Die Wells wurden dann mit 50 µl verschiedener Konzentrationen von AGEM400 bzw. AGEM400-HES in unterschiedlichen Verdünnungsmedien wie Rattenserum, Humanserum, RPMI/10% FCS, PBS/1% BSA bzw. Lysepuffer/1% BSA befüllt. Von den Peptiden wurden in jedem Verdünnungsmedium folgende Konzentrationen (ng/ml) eingesetzt: 20.00/ 15.00/ 10.00/ 7.50/ 5.00/ 3.75/ 2.50/ 1.88/ 1.25/ 0.94/ 0.63/ 0.47/ 0.31/ 0.23/ 0.16/ 0.00.

Nach einer Stunde Inkubation wurden die Wells durch kräftiges Ausschlagen und Ausklopfen der Platten entleert. Danach wurden die Wells dreimal mit jeweils 100 µl PBS gewaschen, um im Anschluss für eine weitere Stunde mit je 200 µl Blocking-Puffer 1 (PBS inkl. 2% Magermilchpulver) wieder befüllt zu werden.

Nach Entfernen des Blocking Puffers 1 wurden 100 µl PBS mit Kaninchen-anti-AGEM400 Antiserum (SA5048), das 1:1000 in PBS verdünnt wurde, in jedes Well gegeben. Die Ansätze wurden für eine weitere Stunde inkubiert. Gleichzeitig wurde der Detektionsantikörper Esel-anti-Kaninchen IgG-HRP Antikörper (GE Healthcare, #NA9340) in Blocking-Puffer 2 (Blocking Puffer 1 + 10% Humanserum) 1:1000 verdünnt und für 45 min. bei Raumtemperatur vorinkubiert.

Die Wells wurden nach Ablauf der Inkubationszeit wieder durch starkes Ausklopfen entleert, dreimal mit 100 µl PBS gewaschen und mit 100 µl des vorinkubierten Detektionsantikörpers befüllt und eine weitere Stunde inkubiert. Nach Entfernen des Detektionsantikörpers wurden die Wells erneut dreimal mit 100 µl PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Zugabe von 100 µl des HRP-Substrates TMB (*ready-to-use*-Lösung; sdt GbR, Baesweiler)/Well. Die Umsetzung von TMB durch HRP wird

durch eine im Photometer bei 450 nm (Referenzfilter 620 nm) detektierbare Gelbfärbung der Lösungen nach Zugabe von 100 µl Stopplösung (1N HCl-Lösung) begleitet. Die Inkubation mit TMB erfolgte für 10 bis 30 min.

Zur Quantifizierung von AGEM400 wurde eine **Kalibrierkurve** mitgeführt: Für die Kalibrierkurve wurden zunächst 1 mg/ml AGEM400 oder AGEM400-HES in PBS inkl. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.1 g/l) und BSA (0.1% [w/v]) für zwei Stunden unter Schütteln gelöst. Anschließend wurden Verdünnungen der Peptide in dem Verdünnungsmedium, das im ELISA verwendet werden soll, hergestellt. Dabei wurde auf einen Spitzenwechsel der Pipette nach jedem Verdünnungsschritt geachtet, um eine unspezifische Bindung an die Oberfläche der Pipettenspitze und damit verbundene Konzentrationsschwankungen zu verhindern. Für AGEM400 wurden Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 1 ng/Well bis 0.05 ng/Well eingesetzt. Für AGEM400-HES wurde ein Konzentrationsbereich von 10 ng/Well bis 0.5 ng/Well gewählt.

2.2.14 Auswertung und Präsentation der Daten

Die Konzentrationsangaben von AGEM400-HES bezieht sich auf die Peptidkonzentration (ng/ml) des Multimers. Bei der Berechnung der Peptidkonzentration des AGEM400-HES Moleküls wurde von einem Peptid-Anteil von 10% des Gesamtmoleküls ausgegangen. Die Dosis-Wirkungsbestimmungen wurden in Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

Die Messwerte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung vom Mittelwert angegeben. Alle Daten, die ohne Angabe einer Standardabweichung gezeigt werden, stellen repräsentative Ergebnisse dar, die in mehrfachen, voneinander unabhängigen (mind. drei) Wiederholungen des Experimentes vergleichbar bestätigt wurden.

Zwei Schrägstriche auf einer x-Achse mit logarithmischer Skalierung einer Graphik deuten an, dass dort die angezeigte Skalierung unterbrochen wird, um einen Nullwert einzufügen

2.2.14.1 Dosis-Wirkungskurven

Die Daten der verschiedenen Dosis-Wirkungsversuchen wurden mit Hilfe des Statistik-Programms *Graph Pad Prism 4* graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet.

Für die Darstellung der Daten in einer sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve wurden die Mittelwerte der Dreifach-Bestimmungen logarithmiert ($x \rightarrow \log x$) und anschließend linear normalisiert. Bei der linearen Normalisierung wurde der niedrigste Wert als null % und der höchste Wert als 100% für jede Datenreihe definiert. Alle dazwischen liegenden Werte verteilen sich entsprechend prozentual. Die sigmoidale Dosis-Wirkungskurve wurde durch nicht-lineare Regression nach folgender Gleichung mit drei Parametern ermittelt:

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top-Bottom}}{1 + 10^{\text{LogEC50} - X}}$$

Y : Messwert (%)

Bottom : niedrigster Messwert (%)

Top-Bottom : höchster Messwert (%)

LogEC50 : dekadischer Logarithmus der EC50

X : dekadischer Logarithmus der Konzentration (ng/ml)

Aus der sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve wurden die effektiven Konzentrationen EC10, EC50 und EC90 bestimmt. Die EC50-Konzentration wird als die Agonisten-Konzentration definiert, die einen halbmaximalen Effekt auslöst. Die EC50 wurde durch das Programm *Graph Pad Prism* bei der Berechnung der nicht-linearen Regression der Daten kalkuliert und mit dem 95% Konfidenzintervall (95 % CI= *Confidence Interval*) angegeben.

Das 95% CI stellt eine Annäherung eines aktuellen Messwertes an den wahren Wert her, da der wahre Wert nur durch unendlich viele Messungen erhalten werden könnte. Der wahre Wert liegt statistisch mit 95%iger Wahrscheinlichkeit im Bereich des Konfidenzintervalls.

Bei den effektiven Konzentrationen EC10 und EC90 handelt es sich um Konzentrationen, die einen 10%igen bzw. einen 90%igen Effekt des Maximaleffektes bewirken. Die EC10 wurde zur Untersuchung bzw. zum Vergleich des Wirkungseintritts verwendet. Die EC90 wurde zur Analyse des Erreichens des maximalen Wirkplateaus herangezogen. EC10 und EC90 wurden mit Hilfe der EC50-Konzentration nach folgender Gleichung berechnet:

$$ECF = [F / (100-F)]^{1/H} \times EC50$$

F: Effekt (%)

H: HillSlope (Steigung der Kurve; Bei einer sigmoidalen Standard-Dosis-Wirkungskurve gilt:

$$H = 1)$$

$$EC10 = 0.11 \times EC50$$

$$EC90 = 9 \times EC50$$

Als Maß für die Varianz der abhängigen Variable y und zur Bewertung der Güte der Regression wurde der korrigierte Determinationskoeffizient R^2 durch *Graph Pad Prism* kalkuliert. R^2 gibt Werte zwischen 0 und 1 (0% -100%) an und beschreibt den Abstand der Werte von der Regressionskurve bzw. den Abstand der Werte von der horizontalen Gerade der Mittelwerte aller y-Werte.

2.2.14.2 Signal-Rausch-Verhältnisse

Die Signal-Rausch-Verhältnisse wurden mit MS Excel bestimmt. Dazu wurden die absoluten OD-Mittelwerte, die sich unmittelbar im Bereich der zuvor ermittelten EC10-, EC50- und EC90-Konzentrationen befanden, als x-faches Signal des Kontrollwertes berechnet. Der OD-Mittelwert des Kontrollansatzes wurde dabei als 1 definiert.

2.2.14.3 Bestimmung der intrinsischen Agonisten-Aktivität a

Die intrinsische Aktivität eines Vollagonisten, der den maximalen Effekt auslöst, ist mit $a=1$ definiert. Die intrinsische Aktivität eines Partialagonisten, der nicht den maximal möglichen Effekt bewirkt, liegt zwischen der eines Vollagonisten und der eines Antagonisten ($a=0$). Für EPO, AGEM400, AGEM400-HES und Aranesp[®]

wurden die intrinsischen Aktivitäten nach folgender Formel mit den maximal erreichten OD-Mittelwerten jeder Substanz berechnet:

$$a = E_{\max-p} / E_{\max-f}$$

$E_{\max-p}$: maximaler Effekt des Partialagonistens

$E_{\max-f}$: maximaler Effekt des Vollagonistens

2.2.14.4 FACS-Analysen

Die gesuchte Zellpopulation wurde zunächst über die FSC- und SSC-Signale selektioniert. Die Signale, die durch Zelldebris verursacht wurden, wurden von der Population durch sog. *Gating* der gesuchten Zellpopulation ausgeschlossen. Desweiteren wurde die Zellpopulation von den Signalen toter Zellen abgegrenzt. Diese selektionierte Zellpopulation wurde über Fluoreszenzsignale in den Fluoreszenzkanälen FL-1 (Detektionskanal für FITC-Signale) und FL-2 (Detektionskanal für PE-Signale) weiter nach FITC- bzw. PE-positiv gefärbten Zellen und ungefärbten Zellen aufgetrennt. Da pro Messung 5000-10000 Partikel (Zellen) gemessen wurden, wurde eine repräsentative Populationsgröße gewährleistet. Die positiv detektierten Zellen wurden prozentual auf die selektionierte Gesamtpopulation bezogen. Alternativ kann man die relative Anzahl FITC-positiver Zellen durch die Differenz des Quotienten aus den FITC-positiv gefärbten Zellen mit sog. QuantiBrite-Beads[®] (BD Biosciences) und dem Quotienten aus dem FITC-Signal der Negativkontrolle und dem Signal der QuantiBrite-Beads[®] berechnen. Die folgende Gleichung stellt den Zusammenhang dar:

$$\begin{array}{l} \text{Relative Anzahl} \\ \text{FITC-positiver} \\ \text{Zellen} \end{array} = \frac{\text{CDxy}^{\text{+}}\text{-FITC-Signal}}{\text{QuantiBrite}^{\text{®+}}} - \frac{\text{CDxy}^{\text{-}}\text{-FITC-Signal}}{\text{QuantiBrite}^{\text{®}}}$$

Die QuantiBrite[®]-Beads sind mit PE markiert und werden in konstanter Anzahl zugegeben. Sie wurden nach Herstellerangaben bei jeder Einzelmessung mitgeführt, wenn die relative Anzahl positiver Zellen ermittelt werden sollte.

2.2.14.5 CFU-Assays

Für die Auswertung wurden die gebildeten roten Kolonien (erythroide Zellen) jeder Verdünnungsstufe mikroskopisch ausgezählt. Die roten Kolonien wurden weiterhin nach Größe der Zell-Cluster in BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) und CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) unterteilt:

BFU-E: > 200 rote Zellen/ Kolonie

CFU-E: < 200 rote Zellen/ Kolonie

Die ausgezählten Kolonien wurden graphisch gegen die eingesetzte Substanzkonzentration mit *Graph Pad Prism* veranschaulicht.

Anschließend wurde die Differenzierung der mononukleären Zellen zu erythroiden Kolonien (BFU-E und CFU-E) prozentual zur eingesetzten Gesamtzellpopulation mit Hilfe von MS Excel berechnet und graphisch dargestellt. Beim Ansatz mit Knochenmarkszellen aus *Cynomolgus* wurde für jede Verdünnungsstufe von EPO bzw. AGEM400-HES 40000 Zellen eingesetzt. Von den humanen Knochenmarkszellen wurden für jede Probe 30000 Zellen verwendet.

2.2.14.6 Schild Plot Analyse: UT-7/EPO-Zellen

Zum Nachweis der Art des gezeigten Antagonismus wurde eine Schild-Plot-Analyse durchgeführt. Für den Schild-Plot wurden alle EC50-Werte über Dosis-Wirkungskurven mittels nicht-linearer Regression mit *Graph Pad Prism* ermittelt und graphisch dargestellt.

Für jede Antagonisten-Konzentration wurden folgende Verhältnisse berechnet:

$$r = EC50 + \text{Antagonist} / EC50 \text{ ohne Antagonist}$$

Diese Verhältnisse wurden für eine lineare Regression als $\log(r-1)$ gegen die molare Konzentration des Antagonisten (sEPO/R) aufgetragen. Eine Steigung einer Regressionsgeraden von eins im Schild-Plot weist auf einen kompetitiven Antagonismus hin. Der Schnittpunkt mit der x-Achse ist der sog. pA_2 -Wert, der im Falle einer Steigung der Regressionsgeraden von eins dem Wert der Affinitätskonstanten des Antagonisten entspricht. In der Regel wird unter einem Antagonisten ein Ligand verstanden, der den Agonisten vom Rezeptor verdrängt,

ohne eine Wirkung durch die Rezeptorbindung auszulösen. Der pA_2 -Wert ist ein Maß für die pharmakologische Wirkpotenz eines Antagonisten.

Desweiteren wurden die berechneten Verhältnisse $r = EC50 + \text{Antagonist} / EC50$ ohne Antagonist als prozentuale Effizienzverluste gegen die Konzentration von sEPO/R ($\mu\text{g/ml}$) dargestellt. Die $EC50$, die bei der EPO-Konzentrationsreihe ohne Zugabe des löslichen EPO/R ermittelt wurde, wurde als 1% definiert. Der Zusammenhang zwischen Effizienzverlust durch Competition mit einem Antagonisten wurde mit einer Regressionsgeraden verdeutlicht.

2.2.14.7 ELISA: untere Nachweisgrenze

Als untere Nachweisgrenze zur Detektion von AGEM400 bzw. AGEM400-HES in verschiedenen Verdünnungsmedien wurde eine Extinktion definiert, die nach Abzug des Leerwertes über der Extinktion des Leerwertes zuzüglich zweifacher Standardabweichung lag.

3 Ergebnisse

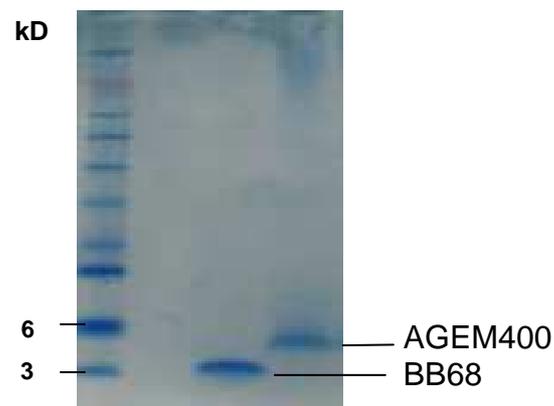
Erythropoetin ist ein Schlüsselfaktor im Hinblick auf das Zellverhalten hämatopoetischer Vorläuferzellen.

Vergleichend zu einem rekombinanten EPO (Erypo®) wurde der Einfluss von AGEM400-HES auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer Vorläuferzellen in *in vitro* Testsystemen untersucht.

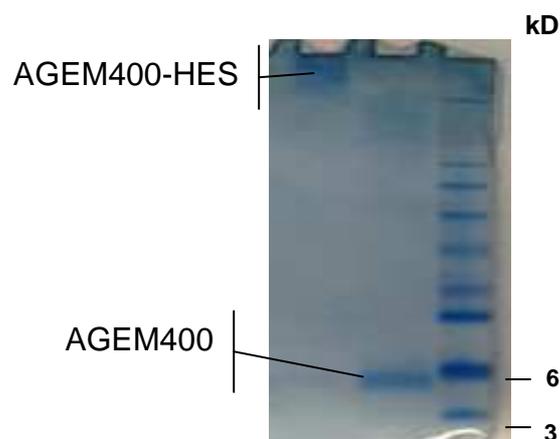
3.1 Gelelektrophoretische Analysen von AGEM400-HES

Das Monomer BB68 und das Dimer AGEM400 ließen sich mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese größenspezifisch auftrennen und anschließend mit Coomassie anfärben. Abb. 3.1 zeigt die Bande von BB68 knapp oberhalb der 3 kD-Markerbande bzw. die Bande von AGEM400 knapp unterhalb der 6 kD-Markerbande. AGEM400-HES konnte mittels SDS-Gelelektrophorese nicht nach der Molmasse aufgetrennt werden. In Abb. 3.2 erkennt man bei der Probe von AGEM400-HES nur eine schwache Coomassie-Färbung direkt unterhalb der Geltasche.

Für die Auftrennung von AGEM400-HES in einem SDS-Polyacrylamidgel ist das HES-Molekül offensichtlich zu groß und ausladend bzw. der Peptid-Anteil in Bezug auf das Gesamtmolekül zu gering, um mit SDS eine ausreichend negative Ladung zu erreichen.

**Abb. 3.1: SDS-Gelelektrophorese von BB68 und AGEM400**

Gelelektrophoretische Auftrennung von je 750 ng BB68 bzw. AGEM400 in einem 10%igen SDS-Bis/Tris-Polyacrylamidgel mit anschließender Anfärbung der Peptide mit Coomassie Brilliant Blue G250. Die Proben wurden vor der Beladung des Gels mit DTT reduziert und 5 min. bei 99°C erhitzt. Als Proteinstandard wurde SeebbluePlus2 (Invitrogen) verwendet.

**Abb. 3.2: SDS-Gelelektrophorese von AGEM400 und AGEM400-HES**

Gelelektrophoretische Auftrennung von je 750 ng AGEM400 bzw. AGEM400-HES in einem 10%igen SDS Bis/Tris-Polyacrylamidgel mit anschließender Färbung der Peptide mit Coomassie. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit DTT reduziert und 5 min. bei 99°C erhitzt. Als Proteinstandard wurde SeebbluePlus2 (Invitrogen) verwendet.

3.2 EPO/R und CD131 auf der Oberfläche hämatopoetischer Zelllinien

Zur Überprüfung der relativen EPO/R- bzw. CD131-Konzentration auf den Zelloberflächen und zur näheren Charakterisierung der myeloiden Zelllinien UT-7/EPO, TF-1 und M07e bzw. der lymphoiden Zelllinie SupT1 wurden die Zellen mit anti-EPO/R-FITC bzw. anti-CD131-PE markiert und anschließend im FACS analysiert.

Die Konzentration der beiden Rezeptoren auf der Oberfläche variierte je nach Zelllinie (vgl. Abb. 3.3). UT-7/EPO-Zellen zeigten eine vergleichsweise hohe Anzahl von EPO/R. CD131 konnte mit dieser Methode nicht auf der Oberfläche von UT-7/EPO nachgewiesen werden. Auf der Oberfläche von TF-1-Zellen wurde der EPO/R ebenfalls nachgewiesen, allerdings in geringerer Anzahl als auf UT-7/EPO-Zellen. Die Detektion von CD131 zeigte im Vergleich der untersuchten Zelllinien die stärkste Expression auf der Oberfläche von TF-1-Zellen. Bei der Zelllinie M07e wurde CD131, aber kein EPO/R detektiert. Auf der Oberfläche der lymphoiden Zelllinie SupT1 konnte weder EPO/R noch CD131 nachgewiesen werden.

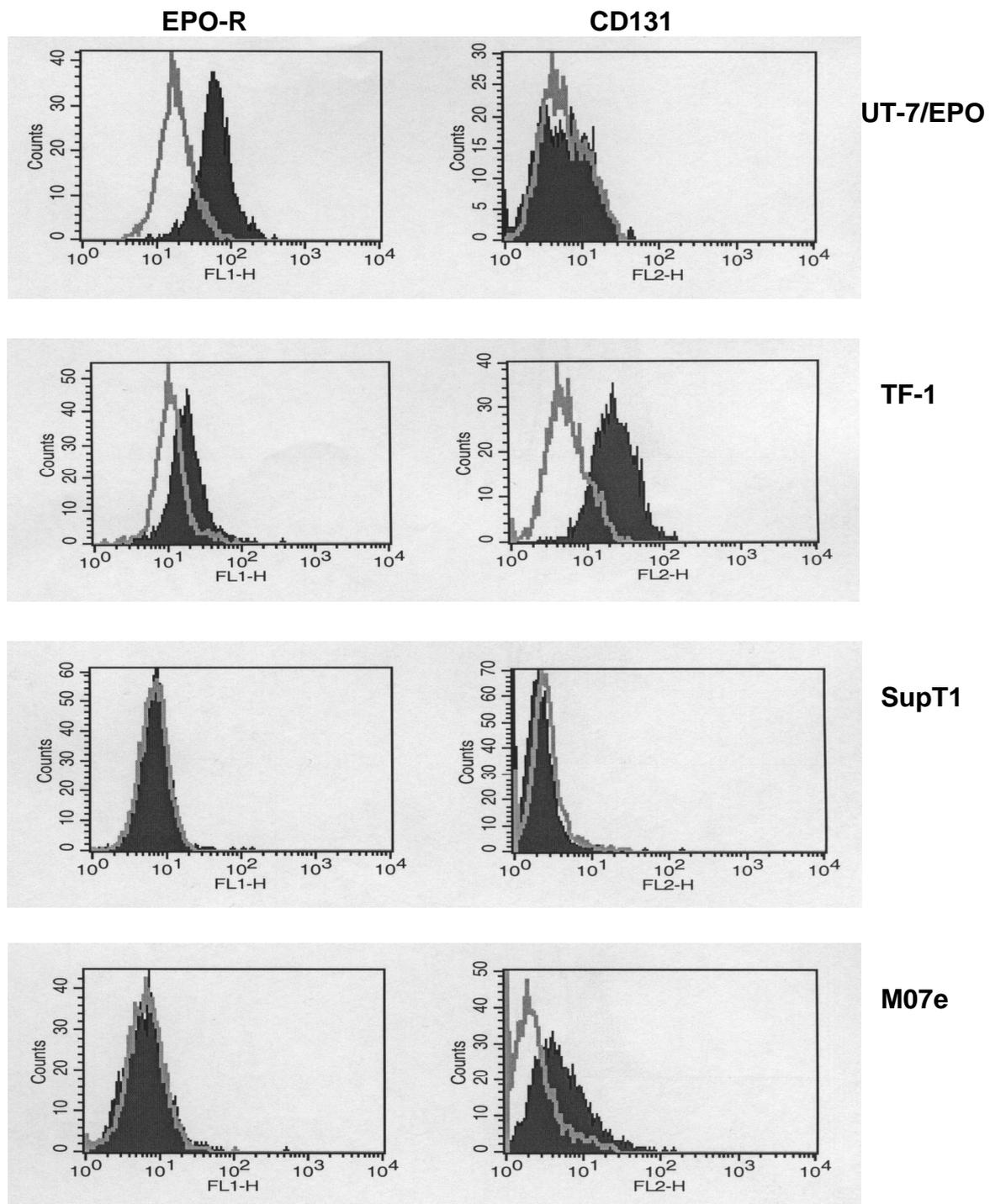


Abb. 3.3: Expression von EPO/R und CD131 auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien.

Die Zelllinien UT-7/EPO, TF-1, SupT1 und M07e wurden mit anti-EPO/R-FITC bzw. anti-CD131-PE (jeweils ausgefüllte Kurven) bzw. zur Kontrolle der Antikörperspezifität mit den murinen Antikörpern IgG1-FITC bzw. IgG2-PE (helle Kurven) gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse jeder Färbung wurden im Histogramm und mit einem *Overlay* zur Kontrollfärbung dargestellt.

3.3 Responsivität von UT-7/EPO und TF-1-Zellen in Zytokin-Assays

Die Responsivität von UT-7/EPO-Zellen auf verschiedene Zytokine wurde mittels MTS-Proliferationssay überprüft. UT-7/EPO-Zellen zeigten in einer gleichmäßigen Dosis-Wirkungsbeziehung die Zunahme metabolisch aktiver Zellen nach Kultivierung mit EPO. Die Zytokine TPO, humanes IL-2 (hIL-2), hIL3, hG-CSF und hGM-CSF bewirkten in UT-7/EPO-Zellen keine Zunahme metabolisch aktiver Zellen (vgl. Abb. 3.4).

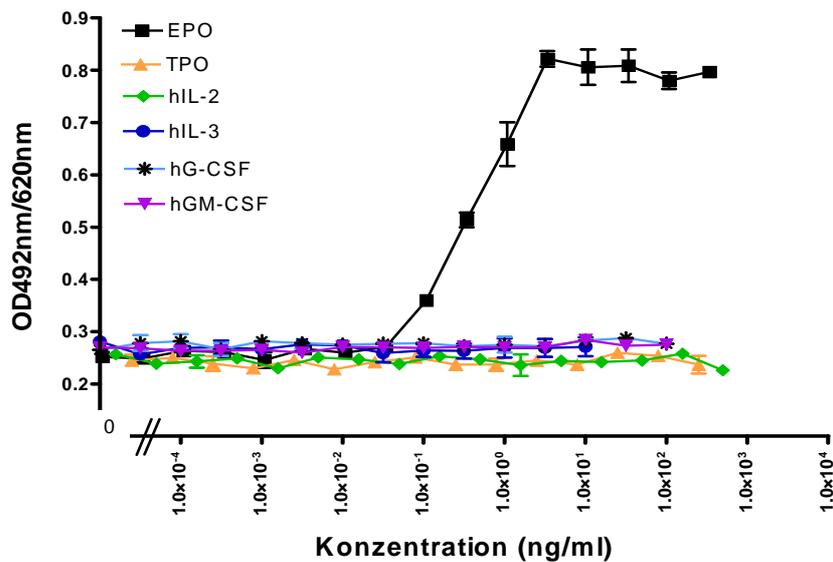


Abb. 3.4: UT-7/EPO; MTS-Assay: Responsivität auf Zytokine

Die Zellen wurden drei Tage in Dreifach-Bestimmungen mit verschiedenen Konzentrationen von EPO, TPO, hIL-2, hIL-3, hG-CSF bzw. mit hGM-CSF kultiviert. Anschließend wurde die relative Anzahl metabolisch aktiver Zellen colorimetrisch als Zunahme der OD bei 492 nm (Referenzfilter: 620 nm) bestimmt. Die Mittelwerte der Dreifach-Bestimmungen wurden gegen die Konzentration aufgetragen und durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve miteinander verbunden.

TF-1 reagierte auf die Zytokine EPO, hIL-3 und hGM-CSF mit einer gleichmäßigen Zunahme metabolisch aktiver Zellen in Abhängigkeit von der steigenden Zytokin-Konzentration. In Abb. 3.5 kann man erkennen, dass TF-1-Zellen eine sehr starke Responsivität auf GM-CSF und IL-3 und eine vergleichsweise schwächere aber dennoch ausgeprägte Reaktion auf EPO zeigten. Die Zellen reagierten auch schwach auf TPO mit einer Zunahme der Zellzahl bei steigender Konzentration. Allerdings wurden mit TPO die niedrigsten Effekte erreicht.

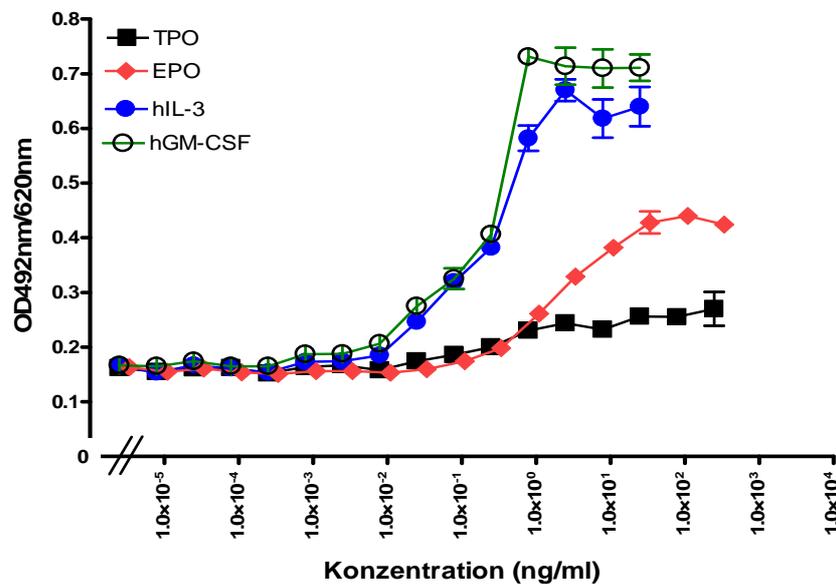


Abb. 3.5: TF-1; MTS-Assay: Responsivität auf Zytokine

Die Zellen wurden drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen von EPO, TPO, hIL-3 bzw. mit hGM-CSF kultiviert. Anschließend wurde die relative Anzahl metabolisch aktiver Zellen colorimetrisch als Zunahme der OD bei 492 nm (Referenzfilter: 620 nm) bestimmt. Die Mittelwerte der Dreifach-Bestimmungen wurden gegen die Konzentration aufgetragen und durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve miteinander verbunden.

3.4 MTS-Proliferationsassays mit den Zelllinien TF-1 und UT-7/EPO

3.4.1 TF-1-Zellen

Die Kultivierung von TF-1-Zellen mit EPO, Aranesp®, AGEM400 bzw. AGEM400-HES bewirkte bei steigenden Konzentrationen aller getesteten Substanzen eine dosis-abhängige Zunahme metabolisch aktiver Zellen bis zur Erreichung eines maximalen Wirkplateaus. Aranesp® wurde in TF-1-Zellen exemplarisch für ein weiteres Erythropoese-stimulierendes- Agens untersucht.

Abb. 3.6 stellt diese Dosis-Wirkungsbeziehungen graphisch als absolute OD-Werte gegen die Substanzkonzentration dar. Es wurde ein partieller Agonismus der Substanzen Aranesp® und AGEM400 beobachtet. Aranesp® und AGEM400 lösten in TF-1-Zellen niedrigere maximale Effekte als AGEM400-HES und EPO aus.

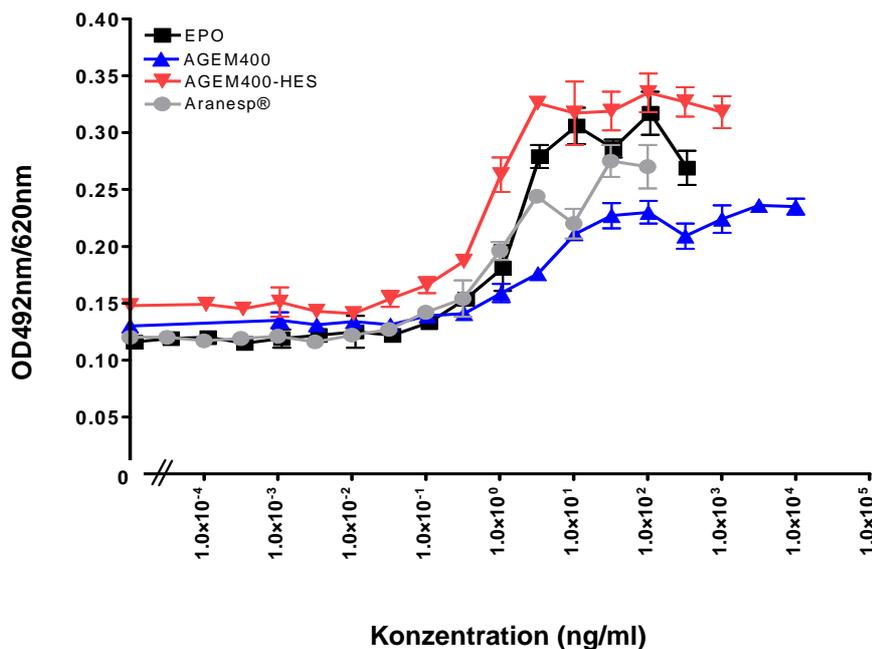


Abb. 3.6: TF-1; MTS-Assay: Dosis-Wirkungsprofil

TF-1-Zellen wurden drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen von EPO (■), Aranesp® (●), AGEM400 (▲) bzw. von AGEM400-HES (▼) kultiviert. Die Zunahme metabolisch aktiver Zellen wurde mittels MTS-Assay photometrisch als Zunahme der optischen Dichte (OD) bei 490 nm (Referenzfilter: 620 nm) in Dreifach-Bestimmungen ermittelt. Zur Darstellung der Absolutwerte wurden die Mittelwerte berechnet und gegen die dazugehörige Konzentration aufgetragen. Die Datenpunkte wurden durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve miteinander verbunden.

AGEM400-HES zeigte auf die Proliferation von TF-1-Zellen die stärkste Wirkung und wurde innerhalb dieses Assays als Vollagonist ($a=1$) definiert. Tab. 3.1 gibt für jede Testsubstanz die intrinsische Agonisten-Aktivität durch das Verhältnis des maximalen Effektes des Partialagonisten ($E_{\max-p}$) und des maximalen Effektes des Vollagonisten ($E_{\max-f}$) an. EPO wirkte mit einer intrinsischen Aktivität von 0.95 vergleichbar mit AGEM400-HES vollagonistisch. Der Partialagonismus der beiden anderen Testsubstanzen zeigte sich über die intrinsischen Aktivitäten von 0.82 für Aranesp[®] bzw. 0.70 für AGEM400.

Tabelle 3.1: Berechnung der intrinsischen Agonisten-Aktivität

Für die Berechnung der intrinsischen Aktivität a wurden die Verhältnisse zwischen dem maximalen absoluten Effekt (OD-Wert) jeder einzelnen Substanz und dem gesamtmaximalen absoluten Effekt in TF-1-Zellen ermittelt. Die intrinsische Aktivität eines Partialagonisten liegt im Bereich zwischen 1 (Vollagonist) und 0 (Antagonist). In Klammern ist der entsprechende maximale OD-Mittelwert angegeben.

Substanz	a
EPO	0.95
Aranesp [®]	0.82
AGEM400	0.70
AGEM400-HES	1

Abb. 3.7 zeigt die Dosis-Wirkungsbeziehung der linear normalisierten Werte gegen die logarithmierte Konzentration nach nicht-linearer Regression. Durch die lineare Normalisierung der Absolutwerte sind partialagonistische Effekte nicht mehr erkennbar. Diese Dosis-Wirkungskurven wurden zur Ermittlung der effektiven Konzentrationen EC10, EC50 und EC90 herangezogen.

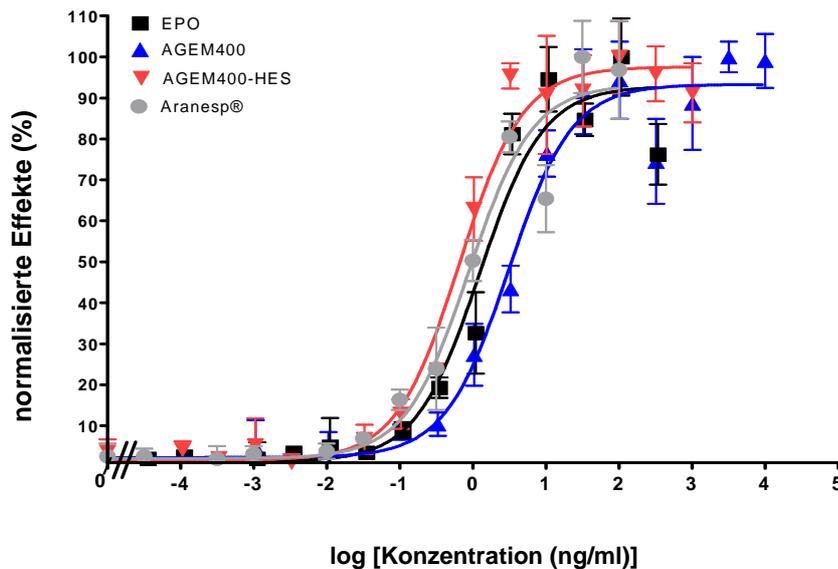


Abb. 3.7: TF-1; MTS-Assay: nicht-lineare Regression

Die absoluten OD-Mittelwerte, die bei verschiedenen Konzentrationen von EPO (-■-), Aranesp® (-●-), AGEM400 (-▲-) bzw. AGEM400-HES (-▼-) ermittelt wurden, wurden linear von 0% bis 100% normalisiert. Anschließend wurden die normalisierten Effekte gegen die logarithmierte Konzentration aufgetragen. Durch nicht-lineare Regression wurde eine Dosis-Wirkungskurve an die Datenpunkte approximiert und dadurch die Berechnung der effektiven Konzentration EC10, EC50 und EC90 ermöglicht (vgl. Tab. 3.2).

Die OD-Werte, die bei den für TF-1 ermittelten EC10-, EC50- und EC90-Konzentrationen gemessen wurden, wurden in Abb. 3.8 auf den Kontrollansatz (unstimulierte Zellen) normiert. In dieser Abb. ist die Induktion der Proliferation durch EPO und AGEM400-HES im Vergleich zum Kontrollwert im maximalen Konzentrationbereich deutlich erkennbar. Der Partialagonismus von Aranesp[®] und AGEM400 äußerte sich bei dieser Darstellungsweise jeweils in einer etwa 1.4-fach niedrigeren Signalstärke im Bereich der EC90-Konzentration.

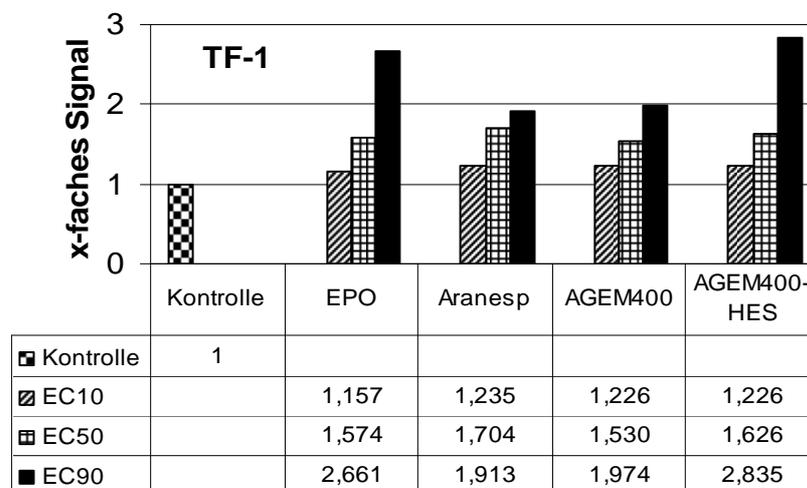


Abb. 3.8: TF-1; MTS-Assay: normierte Werte

Zur Bestimmung der Signalstärke wurde das Signal-Rausch-Verhältnis für die effektive Konzentration EC10, EC50 bzw. EC90 wie folgt berechnet: $\text{OD-Signal}(\text{EC}_{10, 50 \text{ bzw. } 90}) / \text{OD-Signal}(\text{Kontrolle})$. Bei der Kontrolle wurden die Zellen ohne Substanz kultiviert. Dabei entspricht das OD-Signal der Negativkontrolle dem einfachen Signal und die kalkulierten Verhältnisse der untersuchten Substanzen zur Negativkontrolle wurden als x-faches Signal dargestellt.

3.4.2 UT-7/EPO-Zellen

EPO, AGEM400 und AGEM400-HES bewirkten auch in UT-7/EPO-Zellen einen Dosis-abhängigen Anstieg metabolisch aktiver Zellen. Ein Partialagonismus wurde für keine Testsubstanz beobachtet (vgl. Abb. 3.9). Alle drei Substanzen bewirkten gleich starke maximale Effekte.

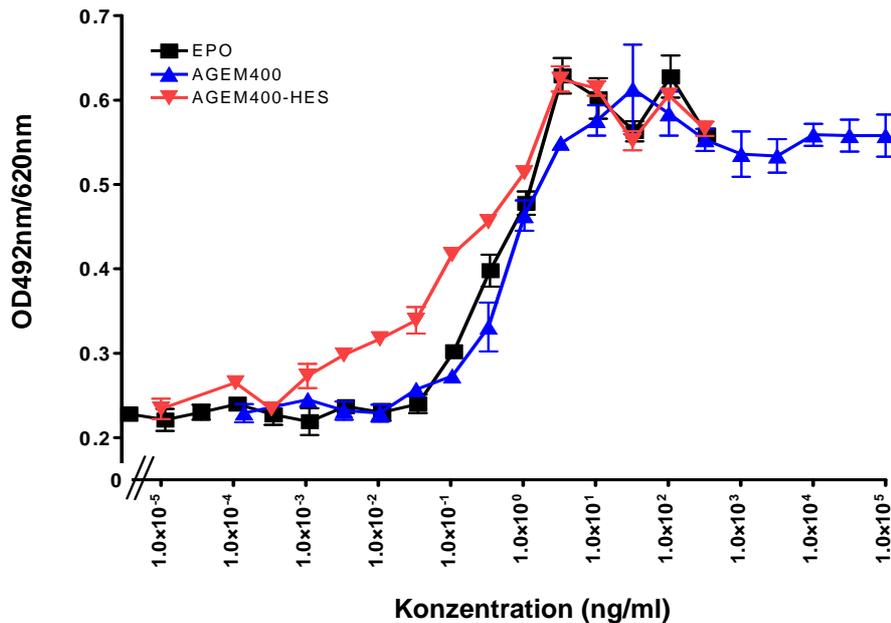


Abb. 3.9: UT-7/EPO; MTS-Assay: Dosis-Wirkungsprofil

UT-7/EPO-Zellen wurden drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen von EPO (-■-), AGEM400 (-▲-) bzw. von AGEM400-HES (-▼-) kultiviert. Die Zunahme metabolisch aktiver Zellen wurde mittels MTS-Assay photometrisch als Zunahme der optischen Dichte (OD) bei 490 nm (Referenzfilter: 620 nm) in Dreifach-Bestimmungen ermittelt. Zur Darstellung der Absolutwerte wurden die Mittelwerte berechnet und gegen die dazugehörige Konzentration aufgetragen. Die Datenpunkte wurden durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve miteinander verbunden.

Abb. 3.10 zeigt die Dosis-Wirkungsbeziehung der linear normalisierten Effekte der Testsubstanzen in UT-7/EPO-Zellen nach nicht-linearer Regression. Für alle Testsubstanzen wurden die effektiven Konzentrationen EC10, EC50 und EC90 ermittelt.

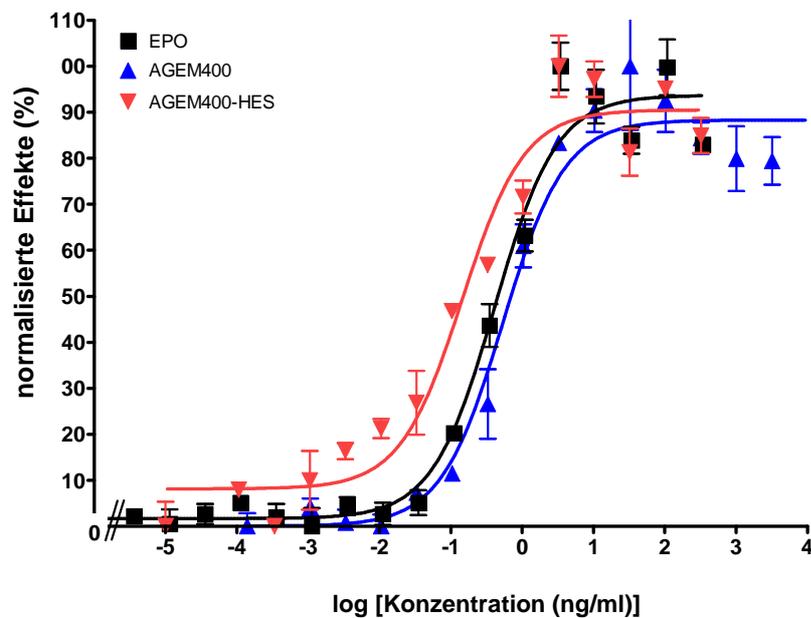


Abb. 3.10: UT-7/EPO; MTS-Assay: nicht-lineare Regression

Die absoluten OD-Mittelwerte, die bei verschiedenen Konzentrationen von EPO (-■-), AGEM400 (-▲-) bzw. AGEM400-HES (-▼-) ermittelt wurden, wurden linear von 0% bis 100% normalisiert. Anschließend wurden die normalisierten Effekte gegen die logarithmierte Konzentration aufgetragen. Durch nicht-lineare Regression wurde eine Dosis-Wirkungskurve an die Datenpunkte approximiert und dadurch die Berechnung der effektiven Konzentration EC10, EC50 und EC90 ermöglicht (vgl. Tab. 3.2).

Auch in UT-7/EPO ist eine Induktion der Proliferation durch EPO, AGEM400 oder AGEM400-HES im Vergleich zu den unstimulierten Zellen deutlich nachweisbar. Die bei der Berechnung der Signal-Rausch-Verhältnisse ermittelten Signalstärken waren für alle Substanzen in den betrachteten Konzentrationsbereichen vergleichbar (vgl. Abb. 3.11).

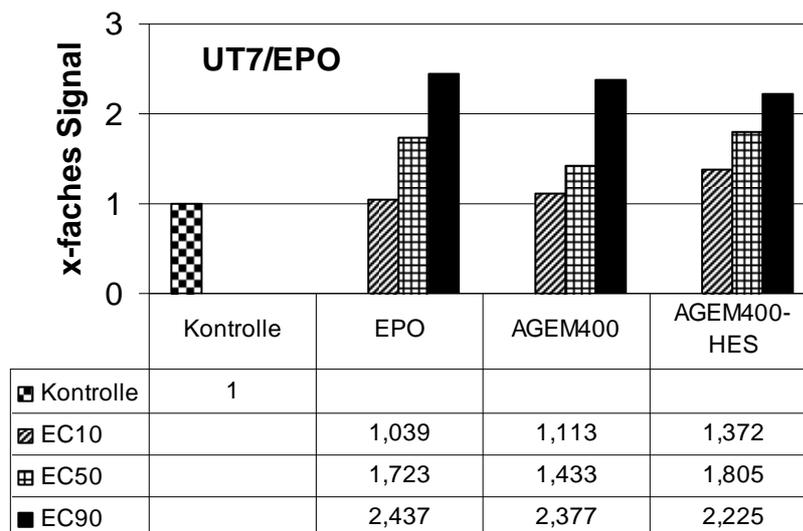


Abb. 3.11: UT-7/EPO; MTS-Assay: normierte Werte

Zur Bestimmung der Signalstärke wurde das Signal-Rausch-Verhältnis für die effektiven Konzentration EC10, EC50 bzw. EC90 $\text{OD-Signal(EC10, 50 bzw. 90) / OD-Signal(Kontrolle)}$ berechnet. Bei der Kontrolle wurden die Zellen ohne Substanz kultiviert. Dabei entspricht das OD-Signal der Negativkontrolle dem einfachen Signal und die kalkulierten Verhältnisse der untersuchten Substanzen zur Negativkontrolle wurden als x-faches Signal dargestellt.

Tab. 3.2 listet die EC10-, EC50- und EC90-Konzentrationen nach nicht-linearer Regression auf, die für alle Testsubstanzen in den MTS-Assays mit TF-1 und UT-7/EPO ermittelt wurden.

UT-7/EPO zeigte eine stärkere Responsivität als TF-1 auf alle Testsubstanzen. In TF-1 zeigte AGEM400 insgesamt eine erniedrigte Effizienz im Vergleich zu EPO, Aranesp[®] und AGEM400-HES. Dagegen zeigte EPO, AGEM400 und AGEM400-HES in UT-7/EPO über alle Konzentrationsbereiche hinweg vergleichbare Effekte.

Tabelle 3.2: Vergleich der Effekte von AGEM400-HES in TF-1 und UT-7/EPO

Die Approximation einer Dosis-Wirkungskurve mittels nicht-linearer Regression linear normalisierter Werte in Abhängigkeit von der logarithmierten Substanzkonzentration ermöglichte eine Berechnung der effektiven EC50-Konzentration.

Die effektive halbmaximale Konzentration EC50 und das 95% Konfidenzintervall (95% CI) wurden vom Statistikprogramm *Graph Pad Prism* berechnet. Aus der programmermittelten EC50 konnten sukzessiv die effektiven Konzentrationen EC10 und EC90 berechnet werden.

Substanz	EC10 ng/ml	EC50 ng/ml (95%CI)	EC90 ng/ml
EPO TF-1	0.135	1.23 (0.88-1.17)	11.07
Aranesp[®] TF-1	0.097	0.88 (0.64-1.22)	7.92
AGEM400 TF-1	0.336	3.06 (2.18-4.29)	27.54
AGEM400- HES TF-1	0.07	0.65 (0.49-0.87)	5.85
EPO UT-7/EPO	0.045	0.412 (0.32-0.54)	3.708
AGEM400 UT-7/EPO	0.059	0.535 (0.39-0.73)	4.815
AGEM400- HES UT-7/EPO	0.016	0.145 (0.1-0.21)	1.305

3.4.3 Interassay-Vergleich der EC50-Werte bzw. der relativen Effizienz

Tabelle 3.3 zeigt vergleichend die Mittelwerte aller EC50-Werte von EPO, AGEM400 und AGEM400-HES, die aus mehreren unabhängigen MTS-Assays mit den humanen Zelllinien TF-1 und UT-7/EPO ermittelt wurden. UT-7/EPO war die sensitivere Zelllinie für die Testsubstanzen. Alle Substanzen erreichten in UT-7/EPO die niedrigsten EC50-Werte.

In beiden Zelllinien erzielte AGEM400 im Vergleich zu den anderen Testsubstanzen die geringsten Effekte. In UT-7/EPO lag die EC50 von AGEM400 im Gegensatz zur EC50 von AGEM400 in TF-1 noch in der gleichen Größenordnung wie die EC50 von EPO und AGEM400-HES. AGEM400-HES zeigte in den untersuchten Zelllinien eine mit EPO vergleichbare Effizienz.

Tabelle 3.3: MTS-Interassay-Vergleich: EC50-Werte

x gibt den Mittelwert der EC50-Konzentrationen aus n unabhängigen Experimenten an. SD gibt die Standardabweichung an.

Substanz	EC50 _{TF-1} (ng/ml)			EC50 _{UT-7/EPO} (ng/ml)		
	x ng/ml	SD	n	x ng/ml	SD	n
EPO	0.87	0.53	66	0.53	0.35	20
AGEM400	2.65	1.12	54	0.7	0.3	18
AGEM400-HES	0.66	0.23	15	0.45	0.31	27

3.5 Apoptose

TF-1-Zellen werden apoptotisch, wenn ihnen IL-3 oder EPO über mehrere Tage entzogen wird. EPO hat auf hämatopoetische Vorläuferzellen eine anti-apoptotische Wirkung. Es sollte untersucht werden, ob AGEM400 bzw. AGEM400-HES ebenfalls apoptotische Prozesse inhibieren können.

Um direkte und unmittelbare Effekte zu bestimmen, wurden frühe Apoptose-Marker wie aktivierte Caspasen bzw. die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin (PS) zur Detektion früh-apoptotischer Vorgänge herangezogen.

Die Zellen wurden über drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen von EPO, AGEM400 und AGEM400-HES kultiviert. Parallel wurde die entsprechende Anzahl toter Zellen mit Propidiumiodid detektiert.

3.5.1 Aktivierung von Caspase-3, -7 und -8 in TF-1-Zellen

AGEM400 und AGEM400-HES waren wie EPO in der Lage die Induktion der Apoptose durch Aktivierung der Caspasen-3, -7 und -8 zu unterbinden. Abb. 3.12 zeigt eine gleichmäßige Abnahme aktiver Caspasen bei steigenden Konzentrationen von EPO, AGEM400 und AGEM400-HES.

Abb. 3.13 zeigt den Zusammenhang zwischen der Substanzkonzentration und der Aktivierung der untersuchten Caspasen in TF-1-Zellen nach nicht-linearer Regression mittels einer Dosis-Wirkungskurve. EPO und AGEM400-HES zeigten bei der Hemmung der Caspasen-3, -7 und -8 eine vergleichbare konzentrationsabhängige Effizienz. Bei allen drei untersuchten Caspasen lagen die IC₅₀-Konzentrationen, die zur halbmaximalen Hemmung benötigt wurden, von EPO und AGEM400-HES in einem Bereich von etwa 0.2 ng/ml (vgl. Tab. 3.4). Die Effektivität von AGEM400 war im Vergleich dazu deutlich niedriger. Um die Aktivierung der Caspasen-3 und -7 halbmaximal zu hemmen, war eine AGEM400-Konzentration nötig, die mit 38.89 ng/ml 195-fach über der IC₅₀-Konzentration von EPO bzw. AGEM400-HES lag. Zur halbmaximalen Hemmung der Aktivierung von Caspase-8 durch AGEM400 war eine Konzentration von 122.01 ng/ml nötig.

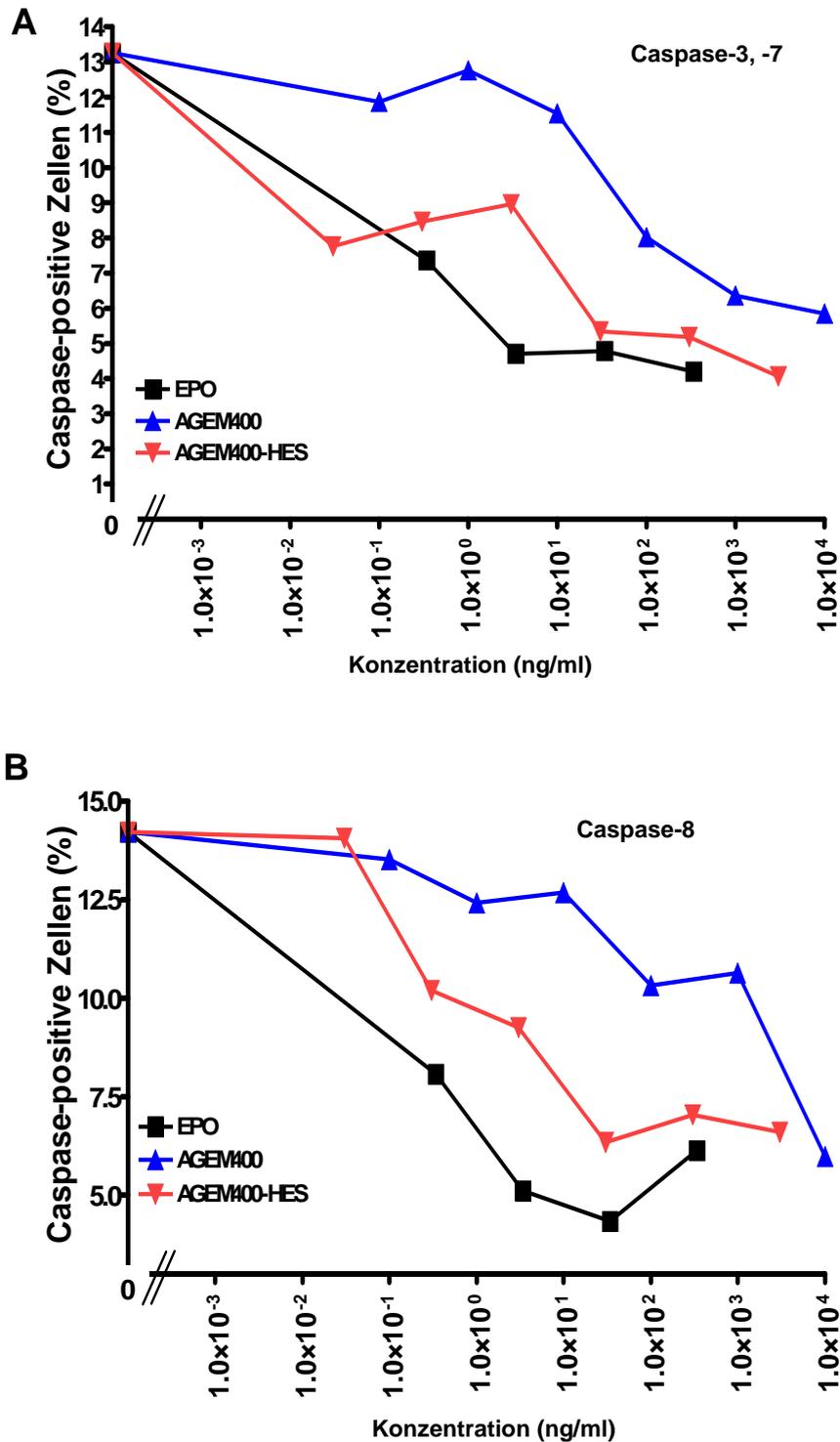


Abb. 3.12: TF-1; FACS-Analyse: Inhibierung von Caspasen

Die prozentualen Anteile an Caspase-positiven Zellen wurden für die Caspasen-3, -7 (Abb. A) bzw. für die Caspase-8 (Abb. B) in Abhängigkeit von der Konzentration von EPO (-■-), AGEM400 (-▲-) bzw. AGEM400-HES (-▼-) mittels FACS-Analyse ermittelt.

Die Datenpunkte jeder Konzentrationsreihe wurden durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve miteinander verbunden.

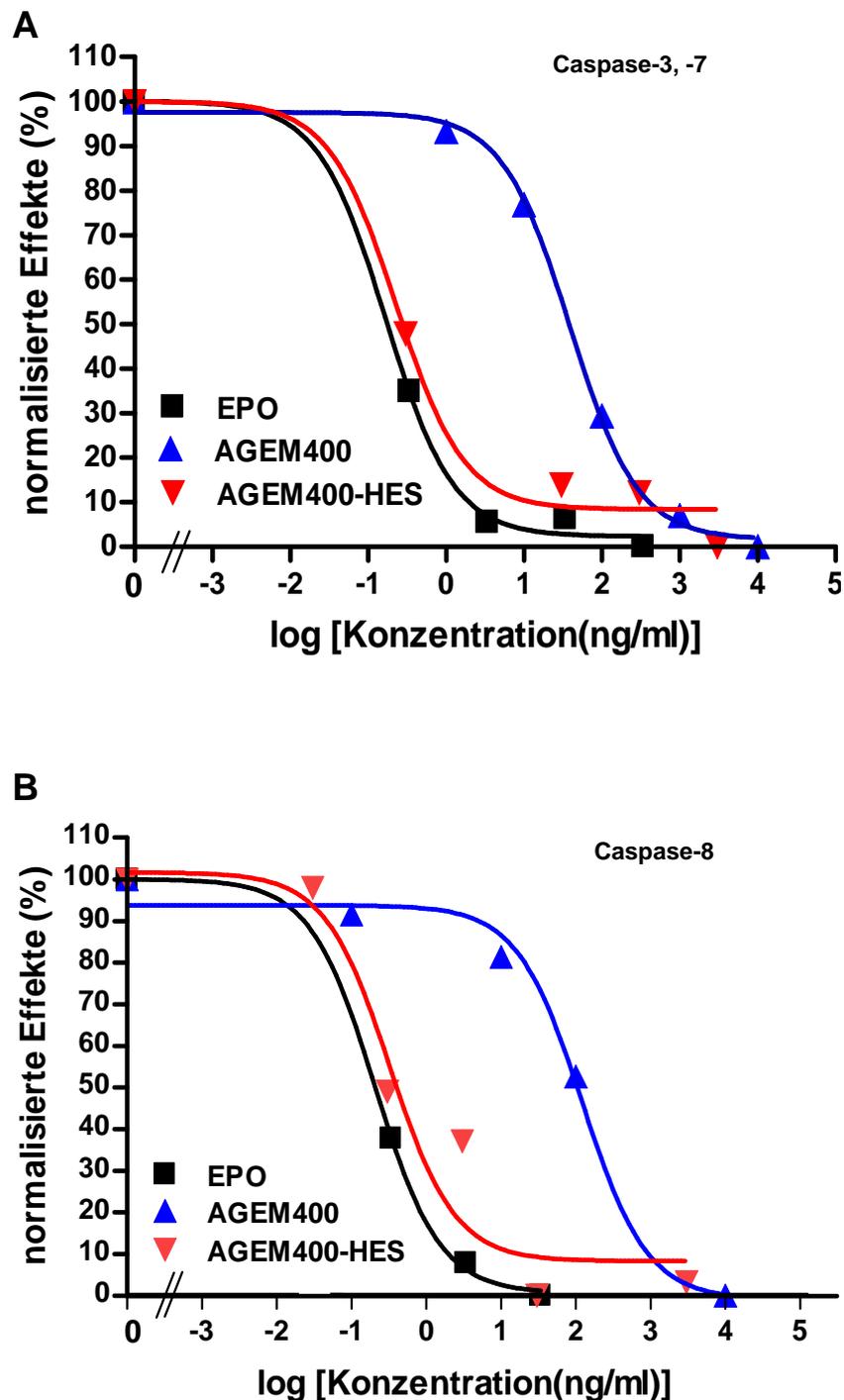


Abb. 3.13: TF-1; Inhibierung von Caspasen: nicht-lineare Regression

Die aus der FACS-Analyse ermittelten prozentualen Anteile Caspase-positiver Zellen (vgl. Abb. 3.12) wurden linear normalisiert und gegen die logarithmierte Konzentration von EPO (■), AGEM400 (▲) bzw. AGEM400-HES (▼) aufgetragen. Durch nicht-lineare Regression wurde eine Dosis-Wirkungskurve zu jeder Konzentrationsreihe ermittelt. In Abb. A sind die Dosis-Wirkungskurven der Testsubstanzen für die Inhibition der Caspasen-3 und -7 dargestellt. Abb. B zeigt die Dosis-Wirkungskurven der Testsubstanzen für die Inhibition der Caspase-8.

Tabelle 3.4: FACS-Analyse: Inhibierung von Caspasen in TF-1-Zellen

Mittels nicht-linearer Regression in Form einer Dosis-Wirkungskurve wurden die EC50-Werte für die Testsubstanzen ermittelt. Das 95%-Konfidenzintervall (95% CI) und der korrigierte Determinationskoeffizient (R^2) wurden vom Statistikprogramm *Graph Pad Prism* berechnet.

TF-1	Caspase-3, -7			Caspase-8		
	Substanz	EC50 ng/ml	95%CI ng/ml	R^2	EC50 ng/ml	95%CI ng/ml
EPO	0.168	0.08-0.35	0.99	0.206	0.053-0.81	0.99
AGEM400	38.89	25.45-59.43	0.99	122.01	32.35-460.6	0.99
AGEM400-HES	0.231	0.05-1.15	0.98	0.327	0.035-3.05	0.94

3.5.2 Annexin V-Nachweis früh apoptotischer Zellen

Phosphatidylserin (PS) wird im früh-apoptotischen Prozess als Zeichen des Integritätsverlustes der Zellmembran von der Innenseite auf die Außenseite der Membran transloziert und kann durch die hochaffine Bindung von Annexin V-FITC an PS in der FACS-Analyse detektiert werden.

Mit steigenden Konzentrationen von AGEM400 bzw. AGEM400-HES wurde eine Dosis-abhängige Abnahme der Annexin V-Bindung nachgewiesen (vgl. Abb. 3.14 (A) und (B)). Tab. 3.5 zeigt die IC50-Werte der Dosis-Wirkungskurven der Testsubstanzen. EPO zeigte mit einer IC50 von 0.17 ng/ml in TF-1-Zellen die höchste Effizienz. AGEM400 erzielte eine 43-fach und AGEM400-HES eine 13-fach niedrigere Effizienz als EPO.

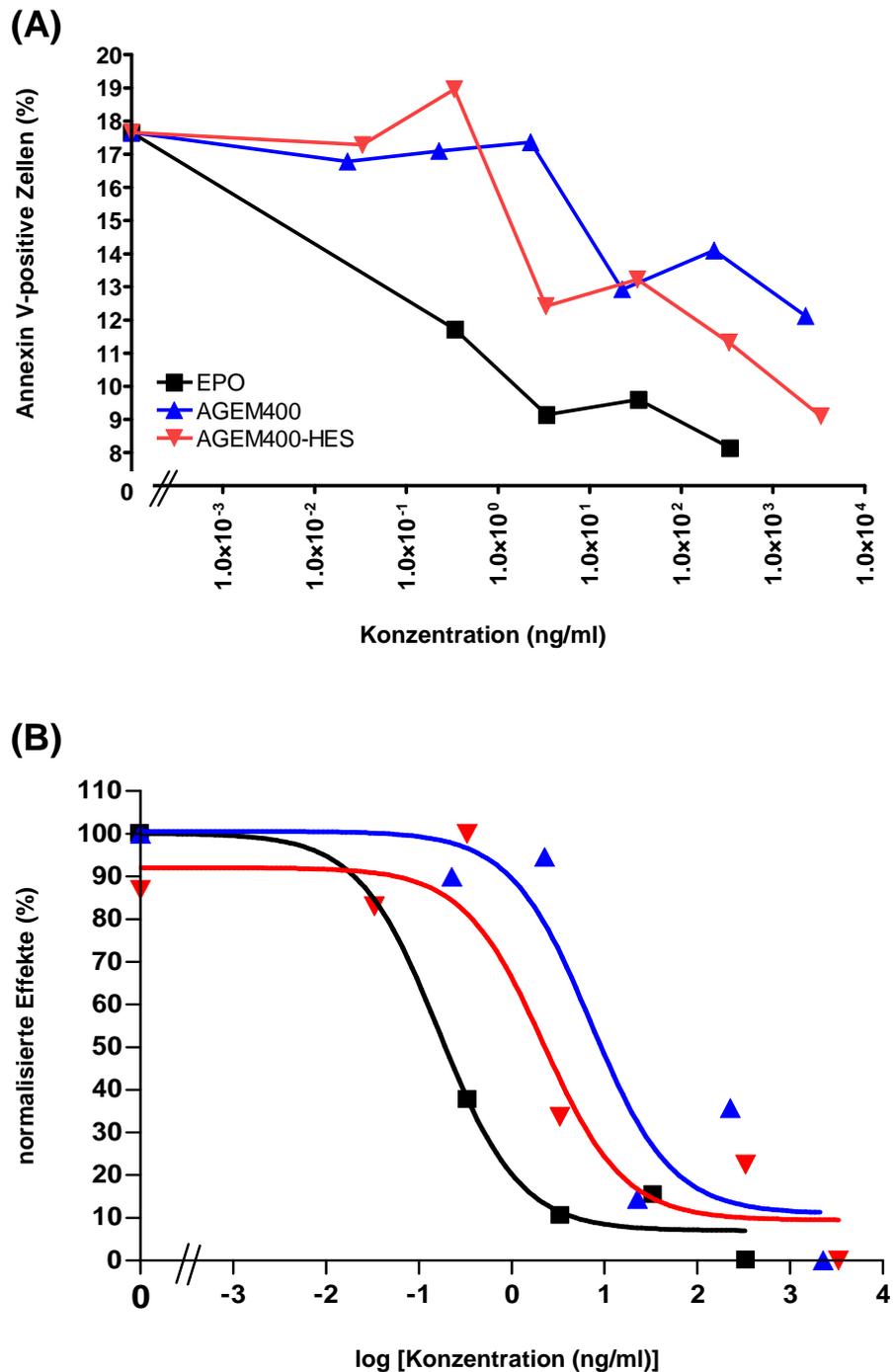


Abb. 3.14: Annexin V: Inhibition apoptotischer Prozesse in TF-1

Der prozentuale Anteil Annexin V-positiver Zellen wurde bei der FACS-Analyse unter Ausschluss bereits toter Zellen ermittelt und graphisch gegen die Konzentration von EPO (-■-), AGEM400 (-▲-) bzw. AGEM400-HES (-▼-) aufgetragen. Die Datenpunkte wurden durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve miteinander verbunden (vgl. Abb. (A)). Es wurden anschließend Dosis-Wirkungskurven durch nicht-lineare Regression der von 0% bis 100% linear normalisierten prozentualen Anteile Annexin V-positiver Zellen gegen die logarithmierte Konzentration ermittelt (vgl. Abb. (B)).

A: Konzentrationsabhängige Abnahme Annexin V-positiver Zellen

B: Dosis-Wirkungsverhältnis nach nicht-linearer Regression

Tabelle 3.5: Annexin V: Inhibition apoptotischer Prozesse in TF-1

Mittels nicht-linearer Regression in Form einer sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve wurden die IC50-Werte als vergleichbares Maß für die Effektivität der Testsubstanzen ermittelt. Das 95%-Konfidenzintervall (95% CI) und der korrigierte Determinationskoeffizient (R^2) wurden vom Statistikprogramm *Graph Pad Prism* berechnet.

Substanz	IC50 ng/ml	95%CI ng/ml	R²
EPO TF-1	0.167	0.03-1.04	0.98
AGEM400 TF-1	7.151	0.18-292.6	0.87
AGEM400-HES TF-1	2.211	0.13-37.52	0.91

3.5.3 Detektion toter Zellen mit Propidiumiodidfärbung

Abb. 3.15 zeigt die Dosis-abhängige Abnahme toter TF-1-Zellen in Korrelation zur Zunahme metabolisch aktiver Zellen. Mit diesem Assay wurde gezeigt, dass die durch EPO-, AGEM400- oder AGEM400-HES-induzierte Zunahme metabolisch aktiver Zellen nicht nur auf Proliferation, sondern auch das Überleben der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration von EPO, AGEM400 bzw. AGEM400-HES basiert. EPO zeigte die höchste und AGEM400 die niedrigste Effizienz.

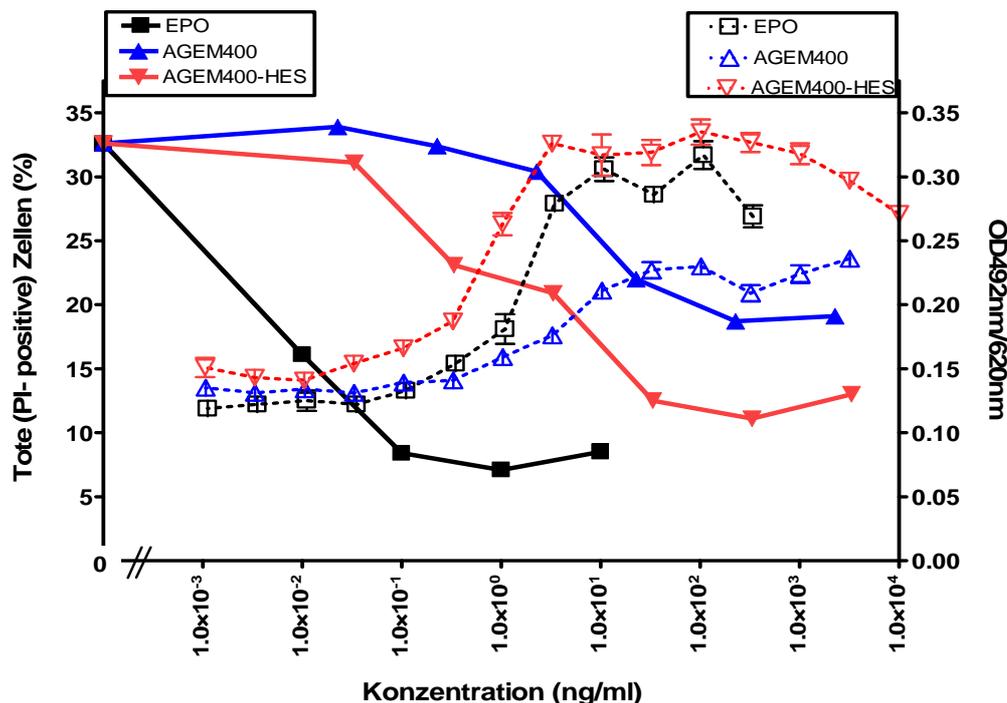


Abb. 3.15: Detektion toter Zellen mit Propidiumiodid

Propidiumiodid (PI) ist ein DNA-Interkalationsfarbstoff, der nur Membranen toter Zellen passiert und dort mittels FACS-Analyse detektierbar ist. Der prozentuale Anteil PI-positiver Zellen (linke y-Achse) wurde bei der FACS-Analyse ermittelt und gegen die Konzentration von EPO (-■-), AGEM400 (-▲-) bzw. AGEM400-HES (-▼-) aufgetragen. Zusätzlich wurden die Wachstumskurven aus den MTS-Proliferationsassays in die Graphik eingefügt (rechte y-Achse). Die Datenpunkte sind jeweils durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve miteinander verbunden.

3.6 Differenzierung

3.6.1 CD-34 Verlust in TF-1-Zellen

CD34 ist ein charakteristischer Oberflächenmarker hämatopoetischer Progenitorzellen, der im Verlauf der weiteren Differenzierung nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert wird. AGEM400 und AGEM400-HES bewirkten eine dosisabhängige Abnahme von CD34 auf der Oberfläche von TF-1.

Abb. 3.16 zeigt die Abnahme von CD34 in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanzen und stellt dies als prozentuale Zunahme CD34-negativer-Zellen dar. Hinsichtlich der Effektstärke von AGEM400 und AGEM400-HES wurde im Vergleich zu EPO ein Partialagonismus beobachtet. Die Effekte von AGEM400 und AGEM400-HES sind niedriger als die Effekte, die durch EPO bewirkt wurden. Bei der Betrachtung der Signal-Rausch-Verhältnisse (vgl. Abb. 3.17) wurde der Partialagonismus beider Substanzen bereits im Bereich der EC₅₀-Konzentration sichtbar und verstärkte sich im maximalen Signalbereich.

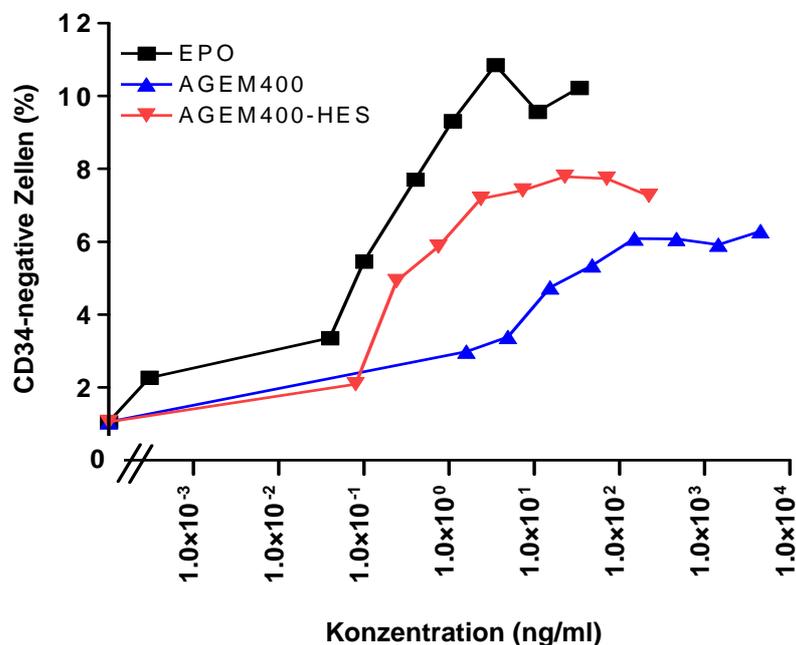


Abb. 3.16: CD34-Verlust auf TF-1-Zellen

CD34 ist ein Oberflächenmarker hämatopoetischer Vorläuferzellen, der im Zuge der Differenzierung an der Zelloberfläche dauerhaft verlorengeht. Der Verlust von CD34 kann folglich als Differenzierungsmarker eingesetzt werden.

Der prozentuale Anteil CD34-negativer Zellen wurde mittels FACS-Analyse detektiert und gegen die Konzentration von EPO (-■-), AGEM400 (-▲-) bzw. AGEM400-HES (-▼-) aufgetragen. Die Datenpunkte wurden jeweils durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve miteinander verbunden.

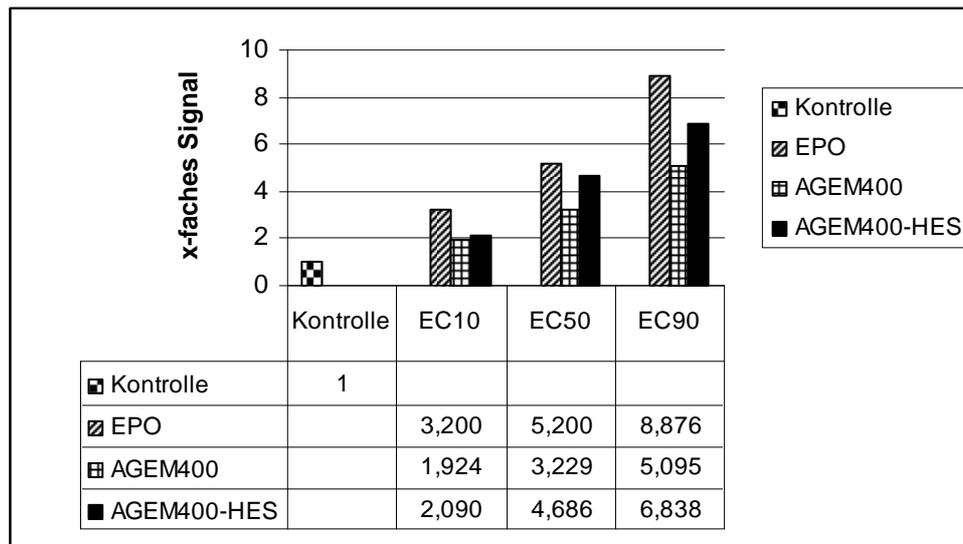


Abb. 3.17: TF-1; CD34-Verlust: normierte Werte

Zur Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses des CD34-Verlustes an der Oberfläche von TF-1-Zellen wurde für alle Testsubstanzen der prozentuale Anteil CD34-negativer Zellen im Bereich der effektiven Konzentration EC10, EC50 bzw. EC90 durch den prozentualen Anteil CD34-negativer Zellen in der Negativkontrolle, bei denen die Zellen ohne Substanz kultiviert wurden, dividiert. Dabei entspricht der prozentuale Anteil CD34-negativer Zellen in der Negativkontrolle dem 1-fachen Signal und die kalkulierten Verhältnisse zwischen Testsubstanzen und Negativkontrolle wurden entsprechend als x-faches Signal des Kontrollwertes angegeben.

Abb. 3.18 zeigt die linear normalisierten Dosis-Wirkungskurven der konzentrationsabhängigen Zunahme CD34-negativer Zellen.

EPO zeigte mit einer EC50 von 0.144 ng/ml die höchste Effektivität in diesem Assay. Die EC50 von AGEM400-HES lag bei 0.223 ng/ml und war mit der von EPO vergleichbar und 23-fach niedriger als die EC50-Konzentration von AGEM400 (vgl. Tab. 3.6).

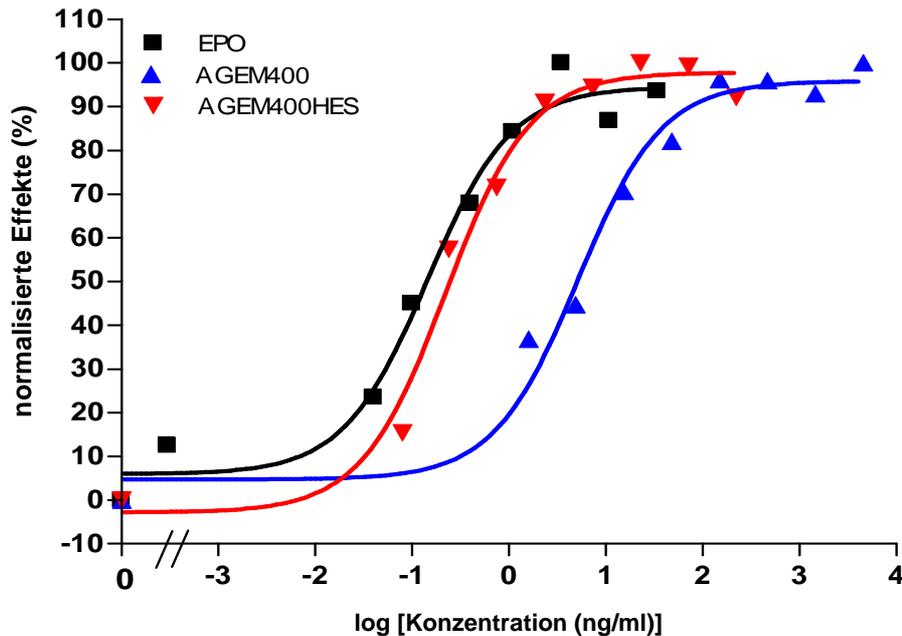


Abb. 3.18: TF-1; CD34-Verlust: nicht-lineare Regression

Es wurde für alle Testsubstanzen eine Dosis-Wirkungskurve durch nicht-lineare Regression der von 0% bis 100% linear normalisierten prozentualen Anteile CD34-negativer Zellen gegen die logarithmierte Konzentration ermittelt.

Tabelle 3.6: EC50-Werte (TF-1, CD34-Verlust)

Mittels nicht-linearer Regression in Form einer sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve wurden die EC50-Werte als vergleichbares Maß für die Effektivität der Testsubstanzen ermittelt. Das 95%-Konfidenzintervall (95% CI) und der korrigierte Determinationskoeffizient (R^2) wurden vom Statistikprogramm *Graph Pad Prism* berechnet. Die effektiven Konzentrationen EC10 und EC90 wurden sukzessiv berechnet.

Substanz	EC50 ng/ml	95%CI ng/ml	R^2	EC10 ng/ml	EC90 ng/ml
EPO TF-1	0.144	0.08-2.67	0.98	0.016	1.296
AGEM400 TF-1	5.15	2.75-9.65	0.98	0.567	46.35
AGEM400-HES TF-1	0.223	0.13-0.38	0.98	0.024	2.007

3.6.2 CFU-Assays

Der CFU-Assay (**C**olony **F**ormation **U**nit-Assay) wurde als Testsystem zur Evaluation der Wirkung von AGEM400-HES im Vergleich zu EPO auf die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen (CD34⁺-Zellen) zu erythroiden Kolonien (BFU-E) verwendet.

In mononukleären Zellen aus humanem Knochenmark bzw. aus dem Knochenmark von Cynomolgus bewirkte AGEM400-HES eine konzentrationsabhängige Ausbildung erythroider Kolonien (vgl. Abb. 3.19). AGEM400-HES zeigte bei der Differenzierung der Knochenmarkzellen zu erythroiden Kolonien (BFU-E) in beiden Spezies einen halbmaximalen bei 10 ng/ml. Dieser lag etwa 10-fach unter dem halbmaximalen Effekt, der durch EPO induziert wurde.

Abb. 3.20 zeigt die prozentualen Anteile gebildeter erythroider Kolonien aus Knochenmarkzellen der untersuchten Spezies bezogen auf die zu Beginn des Versuches eingesetzte Gesamtzahl mononukleärer Zellen.

Die Zunahme erythroider Kolonien erfolgte für EPO in beiden Spezies bis zu einer Konzentration von etwa 11 ng/ml. Mit 0.21% der eingesetzten Gesamtzahl mononukleärer Zellen bewirkte EPO einen maximalen Effekt. Eine 10-fach niedrigere Konzentration führte im humanen System zu einer sehr deutlichen Abnahme erythroider Kolonien. AGEM400-HES induzierte im humanen System mit 0.17% der Ausgangszellzahl eine maximale Bildung erythroider Kolonien in einem Konzentrationsbereich von etwa 450 ng/ml. In Knochenmarkzellen aus Cynomolgus führte AGEM400-HES in einem größeren Konzentrationsbereich von etwa 45 – 450 ng/ml zu einem maximalen Effekt von etwa 0.1% erythroider Kolonien bezogen auf die Ausgangszellzahl.

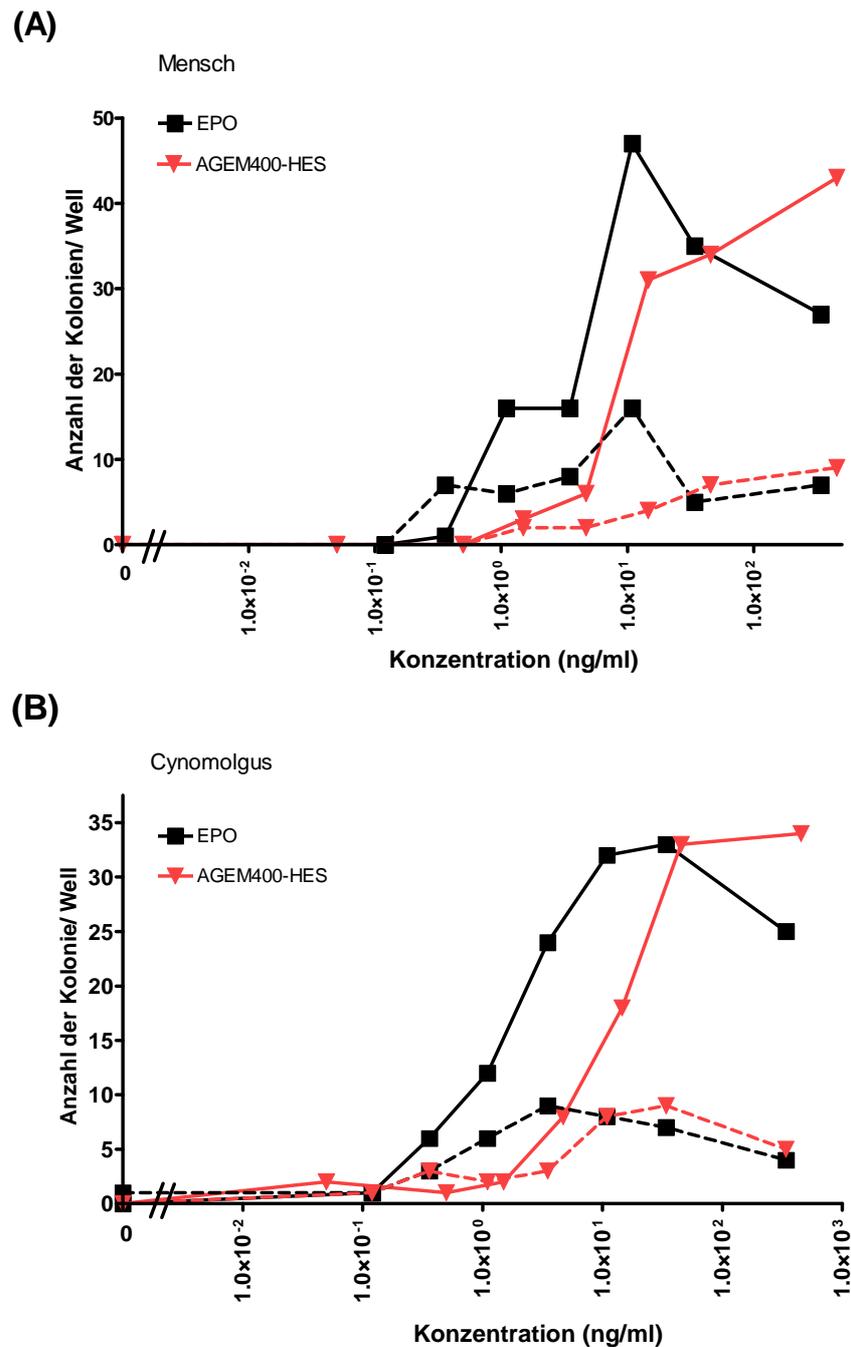


Abb. 3.19: CFU-Assay; Differenzierung von Knochenmarkzellen (Mensch, Cynomolgus)

Zur Auswertung der Bildung erythroider Kolonien wurden die gebildeten großen roten Kolonien als BFU-E (—) und die kleinen roten Kolonien als CFU-E (--) pro Well mikroskopisch ausgezählt. Die ausgezählten Kolonien/Well wurden gegen die dazugehörige Konzentration aufgetragen und jeweils durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve miteinander verbunden.

(A): CFU-Assay; humane Knochenmarkzellen

Humane Knochenmarkzellen wurden 12 Tage mit verschiedenen Konzentrationen von EPO (-■-) oder AGEM400-HES (-▼-) in 6-Well-Platten kultiviert.

(B): CFU-Assay; Knochenmarkzellen aus Cynomolgus

Mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark von Cynomolgus-Affen wurden 10 Tage mit verschiedenen Konzentrationen von EPO (-■-) und AGEM400-HES (-▼-) in Methylcellulose in 6-Well-Platten kultiviert.

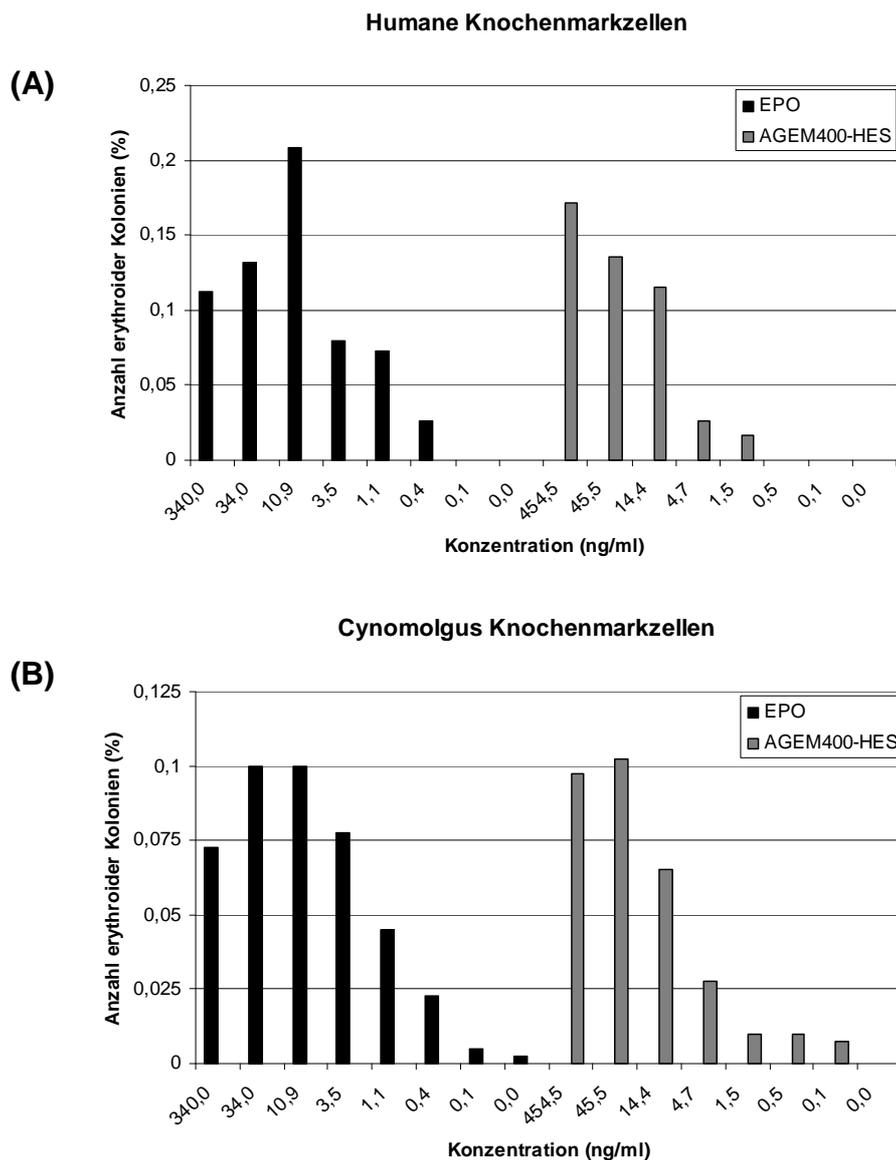


Abb. 3.20: Prozentuale erythroide Differenzierung von Knochenmarkzellen im CFU-Assay

Die Anteile erythroider Kolonien wurden prozentual bezogen auf die im CFU-Assay eingesetzte Gesamtzellzahl an humanen (vgl. Abb. A) bzw. an Knochenmarkzellen von Cynomolgus (vgl. Abb. B) berechnet. Für die Berechnung der prozentualen Anteile erythroider Kolonien wurden BFU-E und CFU-E zusammen betrachtet.

3.6.3 CD36/GlycophorinA (CD235a)

CD36 und GlycophorinA sind Oberflächenantigene, die im Laufe der Differenzierung von humanen Knochenmarkzellen auf der Oberfläche exprimiert werden. Abb. 3.21 zeigt die Ergebnisse der FACS-Analyse zur Detektion dieser beiden Differenzierungsmarker auf humanen Knochenmarkzellen. EPO und AGEM400-HES bewirkten mit jeweils steigender Konzentration eine deutliche und gleichmäßige Zunahme beider Marker auf der Zelloberfläche.

Die Zunahme der beiden Marker durch EPO begann ab einem Konzentrationsbereich von 0.01 ng/ml und erreichte ein Plateau im Bereich von 1 ng/ml. Mit AGEM400-HES wurde eine nahezu lineare Zunahme der beiden Marker an der Zelloberfläche ab einer Konzentration von 0.01 ng/ml bis zu einer Konzentration von 10 ng/ml beobachtet.

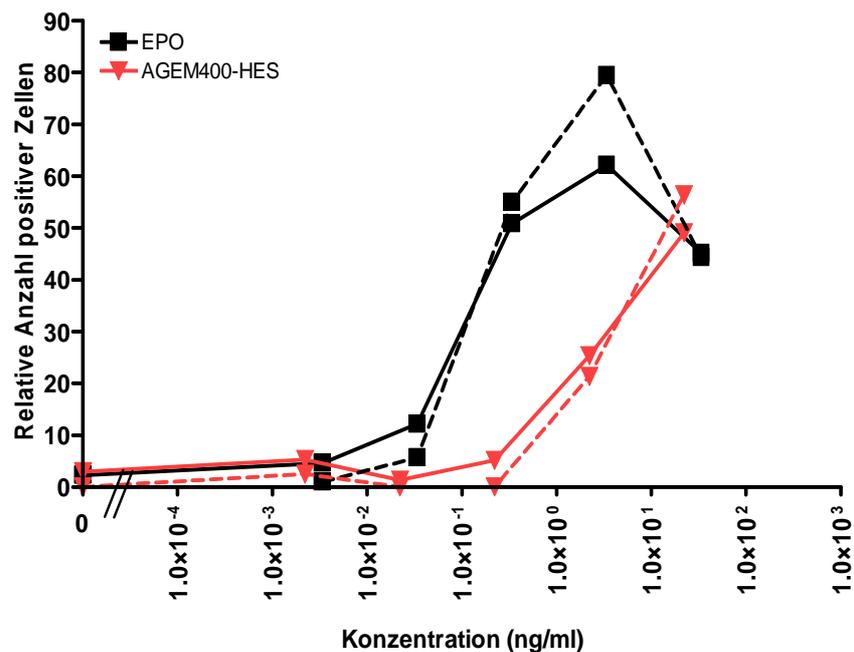


Abb. 3.21: CD36 und GlycophorinA auf der Oberfläche humaner MNCs aus Knochenmark

Nach 12-tägiger Kultivierung humaner Knochenmarkzellen mit verschiedenen Konzentrationen von EPO (-■-) und AGEM400-HES (-▼-) in 6-Well-Platten wurden die Oberflächenmarker CD36 (-) und GlycophorinA (--) durchflusszytometrisch bestimmt.

3.6.4 Nachweis der Hämoglobinbildung in Affenzellen

Eine Kultivierung von Knochenmarkzellen aus Cynomolgus und Pavian in Methylcellulose mit Konzentrationsreihen von EPO bzw. AGEM400-HES induzierte eine Dosis-abhängige Entwicklung makroskopisch erkennbarer roter Kolonien. Zur Quantifizierung und zum Nachweis, dass EPO und AGEM400-HES terminale Differenzierung der untersuchten Knochenmarkzellen induzieren, wurde der Hämoglobingehalt biochemisch bestimmt. EPO bewirkte in den Affenzellen eine stärkere Hämoglobinbildung als AGEM400-HES. Die Hämoglobinkonzentration, die mit Cynomolgus-Knochenmarkzellen mit einer EPO-Konzentration oberhalb von 1 ng/ml und mit Pavian-Zellen mit einer EPO-Konzentration oberhalb von 0.1 ng/ml ermittelt werden konnte, war jeweils etwa doppelt so hoch als die Hämoglobinkonzentration, die mit AGEM400-HES im vergleichbaren Konzentrationsbereich erreicht wurde (vgl. Abb. 3.22 und Tabelle. 3.7).

Tabelle 3.7: Hämoglobinwerte erythroider Zellen aus Cynomolgus und Pavian

Die Tabelle zeigt die Hämoglobinwerte (Hb), die während der Erythropoese von Knochenmarkzellen aus Cynomolgus bzw. aus Pavian in einer 1.1 ml Methylcellulosekultur im 6-Well-Format in Gegenwart verschiedener EPO- oder AGEM400-HES-Konzentrationen gebildet wurden.

EPO ng/ml	Hb µg/1.1 ml Cynomolgus
54.4	5.6
8,7	8,2
1.4	6,0
0.2	2.7
0.04	3.8
AGEM400- HES ng/ml	Hb µg/1.1 ml Cynomolgus
35.5	7
5.7	4.1
0.9	3.6
0.1	3.0
0.02	2.3

EPO ng/ml	Hb µg/1.1 ml Pavian
34	7.1
3.4	7.9
0.34	3.7
0.034	1.3
0.0034	1.5
AGEM400- HES ng/ml	Hb µg/1.1 ml Pavian
22.2	6,0
2.22	3.2
0.222	1.6
0.022	0.9
0.002	1.9

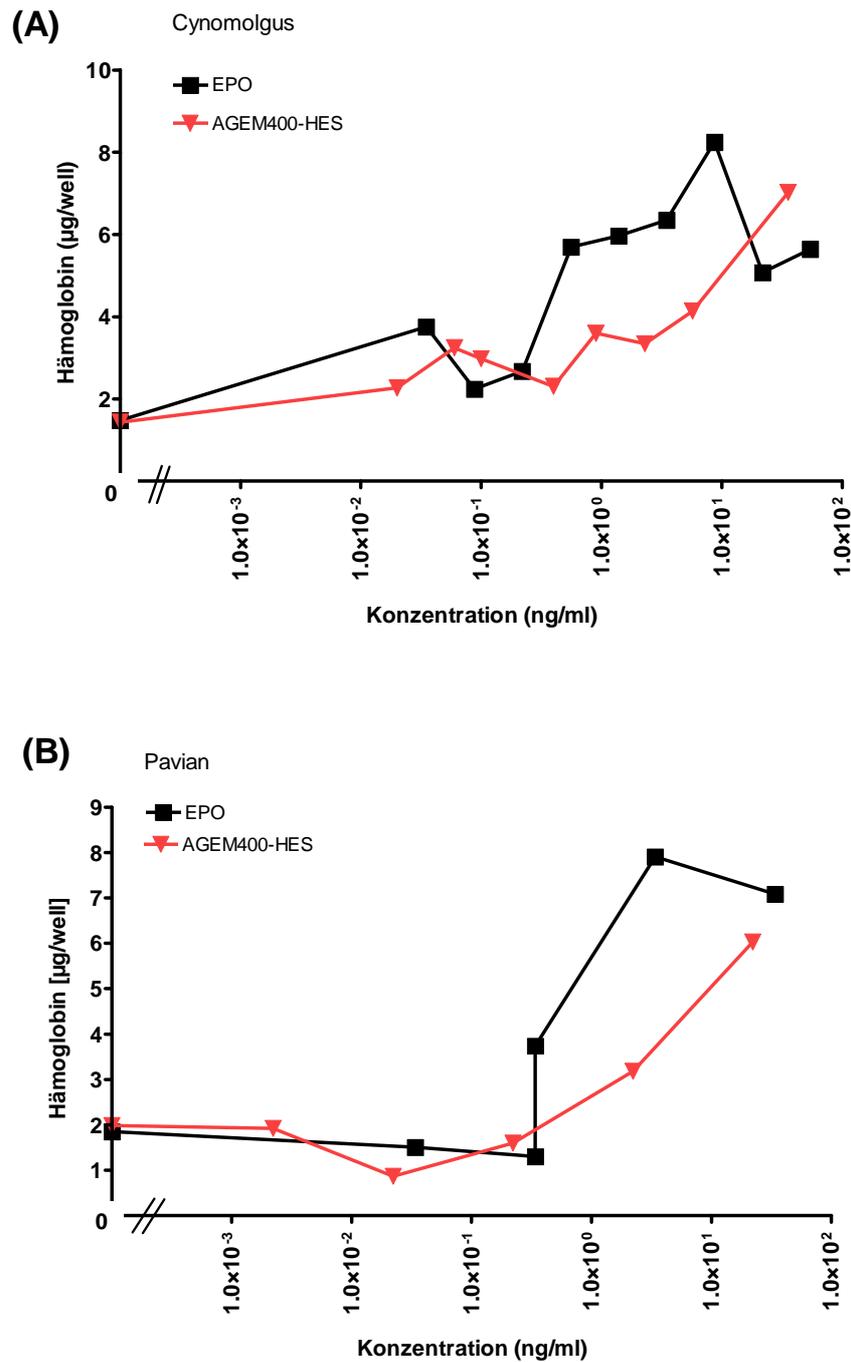


Abb. 3.22: Erythropoese von Knochenmarkzellen (MNC) aus Cynomolgus und Pavian

Die Hämoglobin-Werte beziehen sich auf den Inhalt einer 1.1 ml Methylcellulosekultur von Knochenmarkzellen im 6-Well-Format nach 10-tägiger Inkubation mit Konzentrationsreihen von AGEM400-HES bzw. EPO.

(A): Knochenmarkzellen aus Cynomolgus

(B): Knochenmarkzellen aus Pavian

3.7 Untersuchungen zur Rezeptorbindung

3.7.1 Kompetitionsassays

In den hämatopoetischen Zelllinien TF-1 und UT-7/EPO konnte nachgewiesen werden, dass AGEM400-HES spezifisch an den EPO/R bindet. Die Ko-Kultivierung der Zellen mit einem löslichen EPO/R (sEPO/R) und verschiedenen Konzentrationen von EPO oder AGEM400-HES, bewirkte in beiden Zelllinien die Inhibierung der proliferationsstimulierenden Effekte von EPO bzw. AGEM400-HES. Der stimulatorische Effekt von IL-3 auf die Proliferation von TF-1-Zellen wurde durch sEPO/R dagegen nicht gehemmt (vgl. Abb. 3.23). AGEM400-HES zeigte eine mit EPO vergleichbare Effizienz.

Darüberhinaus wurde die Bindung von AGEM400 und AGEM400-HES an den EPO/R in einem Radioliganden-Bindungs-Experiment bestätigt. Abb. 3.24 zeigt eine gleichmäßige konzentrationsabhängige Verdrängung eines radioaktiv markierten rekombinanten EPOs von einem immobilisierten EPO/R durch EPO, AGEM400 bzw. AGEM400-HES. EPO zeigte mit einer durchschnittlichen IC₅₀ von 9.69 ng/ml den stärksten kompetitiven Effekt. AGEM400 und AGEM400-HES zeigten jeweils vergleichbare Effekte. Für AGEM400 lag die IC₅₀ 1.9-fach und für AGEM400-HES 1.4-fach höher als die IC₅₀-Konzentration von EPO (vgl. Tab. 3.8).

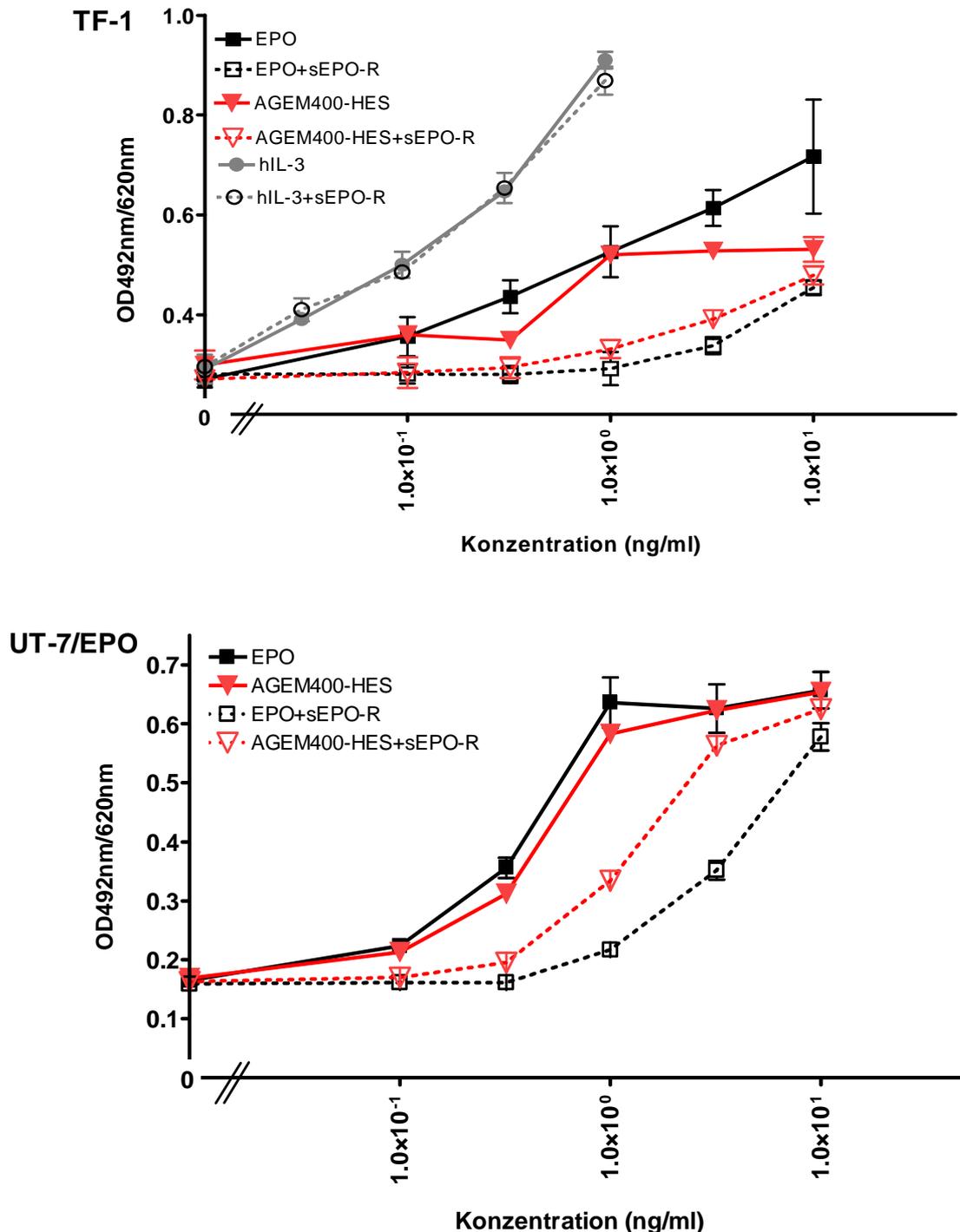


Abb. 3.23: Bindung von AGEM400-HES an den EPO/R von TF-1 und UT-7/EPO

Ein löslicher EPO/R (sEPO/R) kompetierte den membranständigen EPO/R und fing die Liganden EPO oder AGEM400-HES ab. Eine Inhibierung des proliferationsstimulierenden Effekts von EPO bzw. AGEM400-HES auf die Zellen spiegelte die spezifische Rezeptorbindung der beiden Substanzen wider. Die proliferationsstimulierende Wirkung von IL-3 in TF-1-Zellen wurde nicht beeinflusst.

Die Zellen wurden in Dreifach-Bestimmungen drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen von EPO ohne sEPO/R (-■-) oder mit 2 µg/ml sEPO/R (-□-) oder mit verschiedenen Konzentrationen von AGEM400-HES ohne sEPO/R (-♦-) oder mit 2 µg/ml sEPO/R (-◇-) bzw. mit IL-3 ohne (-●-) und mit 2 µg/ml sEPO/R (-○-) kultiviert. Anschließend wurde der Umsatz eines Farbreagens durch metabolisch aktive Zellen photometrisch bestimmt. Aus den OD-Werten der Einzelbestimmungen wurden die Mittelwerte berechnet und gegen die Konzentration aufgetragen. Die Datenpunkte jeder Konzentrationsreihe wurden durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve miteinander verbunden.

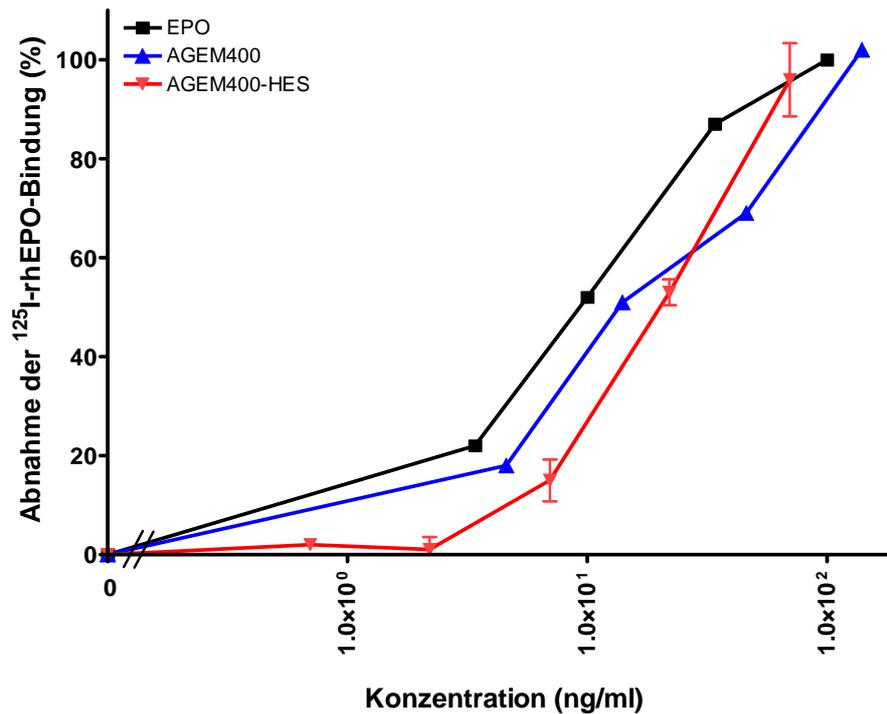


Abb. 3.24: Radioliganden-Bindungsassay

Konzentrationsabhängige Verdrängung eines ^{125}I -markierten rhEPO von einem immobilisierten EPO/R durch EPO (-■-), AGEM400 (-▲-) bzw. AGEM400-HES (-▼-)

Tabelle 3.8: Radioliganden-Bindungs-Assay; IC50-Werte

Angegeben sind die IC50-Werte mit Standardabweichung (SD) und Anzahl der Einzel-Bestimmungen pro Konzentration (n), die bei der halbmaximalen Verdrängung eines radioaktiv-markierten rhEPO vom EPO/R durch EPO, AGEM400 und AGEM400-HES als Abnahme der Bindung des radioaktiven EPOs an einen immobilisierten EPO/R ermittelt wurden. Die Werte, die in der IC50-Spalte in Klammern angegeben sind, geben relative IC-50-Werte an, bei denen der IC-50-Wert von EPO als 1 definiert wurde. Die anderen Werte wurden darauf als x-facher Effekt bezogen.

Substanz	IC50 (ng/ml)	SD	n
rhEPO	9.69 (1x)	1.43	4
AGEM400	17.99 (1.9x)	3.73	3
AGEM400-HES	13.52 (1.4x)	0.63	3

Zur weiteren Untersuchung der Spezifität der für EPO und AGEM400-HES gezeigten Competition wurden UT-7/EPO mit verschiedenen Konzentrationen von EPO und gleichzeitiger Zugabe eines löslichen EPO/R kultiviert. Dies wurde für jeweils neun verschiedene Konzentrationen des löslichen EPO/R wiederholt. Als Referenz diente die Kultivierung der Zellen mit verschiedenen EPO Konzentrationen ohne Zugabe des löslichen EPO/R (vgl. Abb. 3.25).

Der lösliche EPO/R antagonisierte den membranständigen EPO/R und bewirkte in UT-7/EPO-Zellen eine konzentrationsabhängige Zunahme der EC50 von EPO. In Abb. 3.25 erkennt man diesen Effizienzverlust aufgrund der Dosis-abhängigen Competition durch den löslichen EPO/R an der Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurven mit zunehmender Konzentration des löslichen EPO/R. Die ermittelten EC50-Konzentrationen (vgl. Tab. 3.9) wurden für eine Schild-Plot-Analyse herangezogen (vgl. Abb. 3.26), um die Qualität des Antagonismus zu überprüfen.

Da die Steigung der Regressionsgeraden im Schild-Plot nahe an eins ist, wurde ein kompetitiver Antagonismus bestätigt. Bei dem eingesetzten Antagonisten handelt es sich nicht um einen Liganden, sondern ebenfalls um einen Rezeptor. Dies könnte der Grund sein, dass die Steigung nicht gleich eins, sondern nur 0.9 betrug.

Mit Hilfe linearer Regression wurde der Zusammenhang zwischen Effizienzverlust und antagonistischer Rezeptorkonzentration in Abb. 3.27 graphisch verdeutlicht.

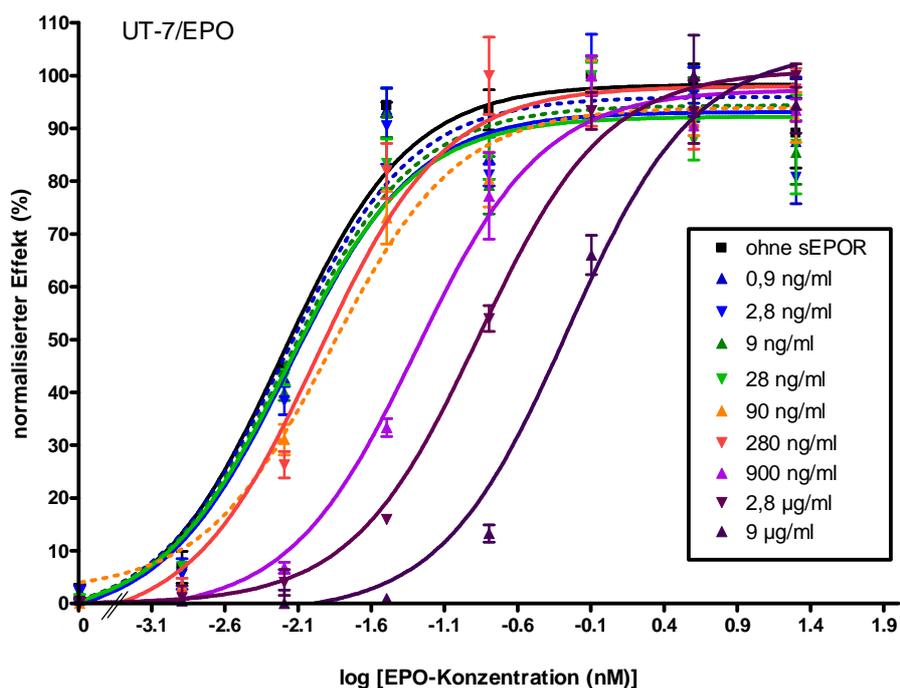


Abb. 3.25: UT-7/EPO, MTS-Assay: Konkurrenz des membranständigen EPO/R

UT-7/EPO-Zellen wurden mit einer 1:5-Verdünnungsreihe von EPO im Konzentrationsbereich von 20 nM bis 2×10^{-4} nM und jeweils 9 verschiedenen Konzentrationen eines löslichen EPO/R (sEPO/R) bzw. ohne Zugabe des sEPO/R (Kontrollansatz) drei Tage als Dreifach-Bestimmungen kultiviert. Die Zunahme metabolisch aktiver Zellen wurde photometrisch im Rahmen eines MTS-Assays detektiert. Im Anschluss wurden die Dosis-Wirkungskurven und die EC₅₀-Werte mittels nicht-linearer Regression ermittelt.

Tabelle 3.9: EC-50-Werte: kompetitive Abnahme der Proliferation in UT-7/EPO

Aufgelistet sind die EC₅₀-Werte (Abb. 3.29) mit der entsprechenden zugehörigen Antagonistenkonzentration (sEPO/R).

Antagonist µg/ml	EC ₅₀ nM
0	0.0062
0.0009	0.0064
0.0028	0.0069
0.009	0.0067
0.028	0.0066
0.09	0.0132
0.28	0.0107
0.9	0.0507
2.8	0.1355
9	0.5468

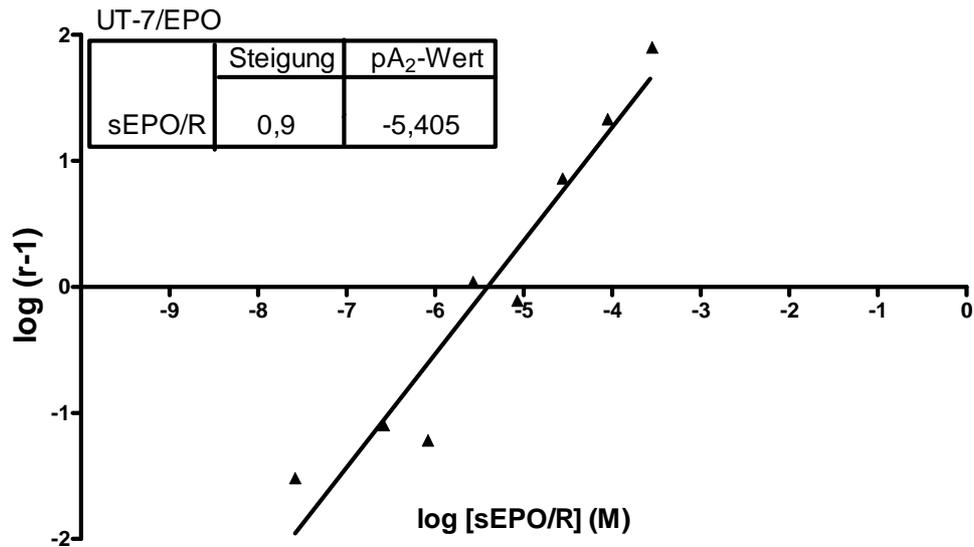


Abb. 3.26: UT-7/EPO, Schild-Plot-Analyse: kompetitiver Antagonismus

r gibt die Verhältnisse zwischen den aus den Dosis-Wirkungskurven ermittelten EC₅₀-Konzentrationen und der EC₅₀-Konzentration des Kontrollansatzes an. Eine Steigung von 1 kennzeichnet einen kompetitiven Antagonismus. Der pA₂-Wert gibt die antagonistische Potenz an und stimmt bei einer Steigung von 1 mit der Affinitätskonstanten K_D des Antagonisten überein.

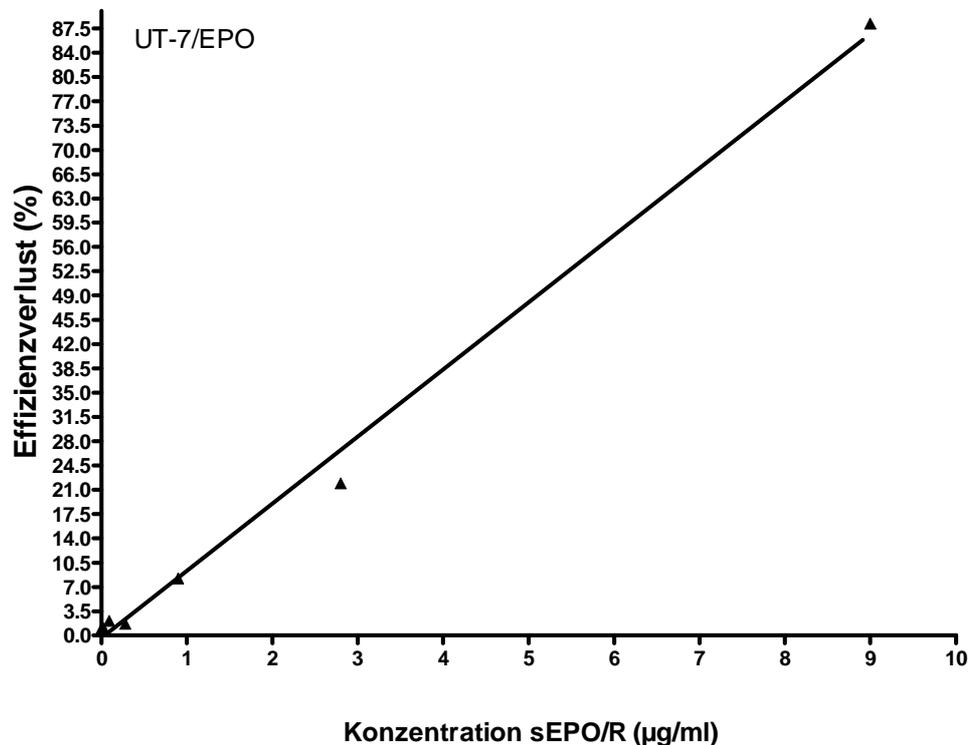


Abb. 3.27: UT-7/EPO, lineare Regression: Abnahme EPO-induzierter Proliferation durch kompetitiven Antagonisten

Die EC₅₀-Werte, die für jede sEPO/R-Konzentration ermittelt wurden, wurden in Bezug zur EC₅₀-Konzentration gesetzt, die bei der Dosis-Wirkungsbeziehung durch EPO ohne Antagonist erreicht wurde. Die berechneten Verhältnisse wurden anschließend als prozentuale Effizienzverluste gegen die Konzentration des löslichen EPO/R aufgetragen. Eine lineare Regressionsgerade stellt den Zusammenhang zwischen Effizienz und Antagonistenkonzentration graphisch dar.

3.8 Aktivierung von STAT5 und ERK1/2 in UT-7/EPO

AGEM400 und AGEM400-HES aktivierten wie EPO Komponenten erythroider Signalwege wie z.B. die Phosphorylierung von STAT5 (JAK/STAT-Signalweg) oder die Phosphorylierung von ERK1/2 (Ras-Raf-Signalweg).

Nach Stimulation von UT-7/EPO Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von EPO, AGEM400 bzw. AGEM400-HES und anschließender Western Blot Analyse der Zellextrakte konnte eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung von STAT5 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.28). Die Signalstärken, die durch AGEM400 bzw. AGEM400-HES erreicht wurden, waren gleich stark und nur minimal schwächer als die Signale, die mit entsprechenden EPO-Konzentrationen erreicht wurden.

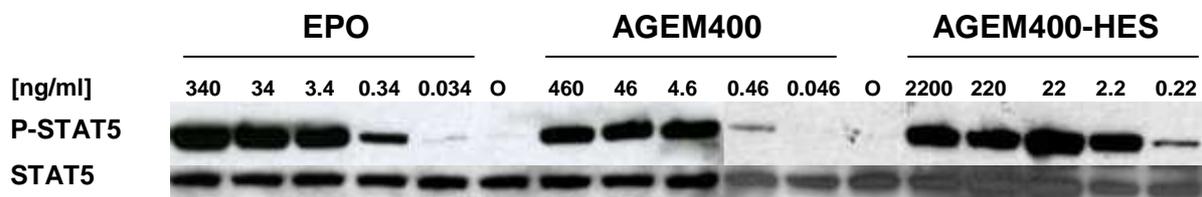


Abb. 3.28: Western Blot Analyse: Aktivierung von STAT5 in UT-7/EPO

UT-7/EPO-Zellen wurden 30 min. mit verschiedenen Konzentrationen der drei Testsubstanzen bzw. ohne Testsubstanz (O) bei 37°C stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Zellextrakte für die Western Blot Analyse zum Nachweis von Phospho-STAT5 (P-STAT5) bzw. STAT5 verwendet. Nach der Immunfärbung der Blotmembranen war das konstitutive STAT5-Signal und die konzentrationsabhängigen P-STAT5-Signale bei etwa 90 kD erkennbar. Die Signale von P-STAT5 nahmen ab Konzentrationsbereich der Testsubstanzen von 1×10^0 bis 1×10^{-1} ng/ml kontinuierlich ab.

Ein maximales P-STAT5-Signal wurde durch Stimulation mit EPO, AGEM400 oder AGEM400-HES mit Konzentrationen im Bereich von 3.4 bzw. 4.5 ng/ml bereits innerhalb von 30 min. erreicht. Nach zwei Stunden konstanter Stimulation der Zellen mit EPO, AGEM400 (400) oder AGEM400-HES (400-HES) war das Signal deutlich abgeschwächt und nach 24 Stunden konstanter Stimulation kaum noch detektierbar (vgl. Abb. 3.29).

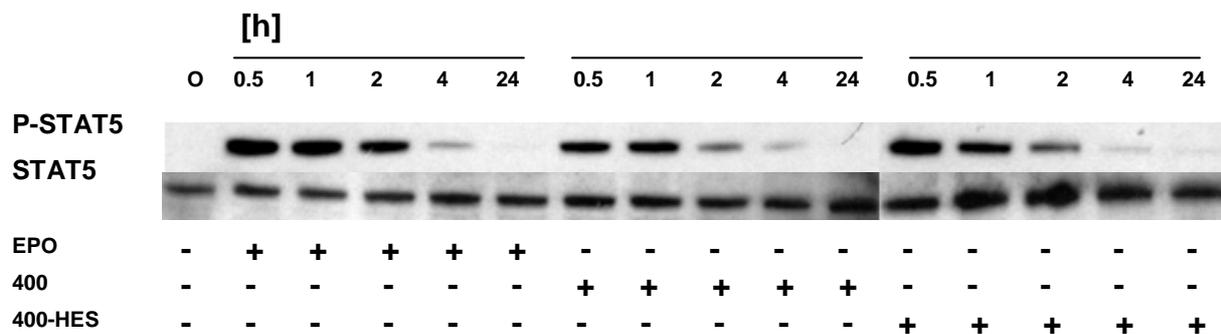


Abb. 3.29: Western Blot Analyse: Aktivierungsdauer von STAT5 in UT-7/EPO

UT-7/EPO-Zellen, die zuvor 48h ohne EPO kultiviert wurden, wurden konstant über **0.5; 1; 2; 4 und 24 Stunden (h)** mit **3.4 ng/ml EPO**, **4.5 ng/ml AGEM400 (400)** oder **4.5 ng/ml AGEM400-HES (400-HES)** maximal stimuliert. Als Negativkontrolle erhielten die Zellen Medium ohne Testsubstanz (**O**). Anschließend erfolgte der Nachweis von Phospho-STAT5 (P-STAT5) bzw. STAT5 mittels Western Blot Analyse. Nach der Immunfärbung der Blotmembranen war das konstitutive STAT5-Signal und die konzentrationsabhängigen P-STAT5-Signale bei etwa 90 kD detektierbar.

Beim Nachweis der Phosphorylierung von MAP-Kinasen ERK1/2 (p44/42 MAPK) zeigte sich im Western Blot die charakteristische Doppelbande von 42 bzw. 44 kD. EPO (E) und AGEM400-HES (H) bewirkten eine vergleichbar starke Phosphorylierung von ERK1/2 (P-ERK1/2) innerhalb von 30 min. Nach vier Stunden war das P-ERK-Signal nach Stimulation mit EPO oder AGEM400-HES jeweils nur noch sehr schwach detektierbar (vgl. Abb. 3.30).

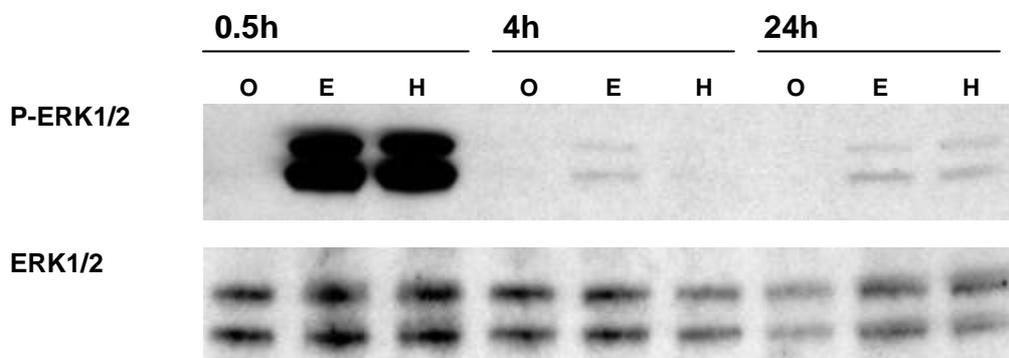


Abb. 3.30: Western Blot Analyse: Aktivierungsdauer von ERK1/2 in UT-7/EPO

UT-7/EPO-Zellen, die zuvor 48 Stunden ohne EPO kultiviert wurden, wurden konstant über **0.5; 4 und 24 Stunden** mit **3.4 ng/ml EPO (E)** bzw. **10 ng/ml AGEM400-HES (H)** stimuliert. Als Negativkontrolle erhielten die Zellen Medium ohne Testsubstanz (**O**).

3.9 Immunologische Untersuchungen

Nach Immunisierung von Kaninchen mit EPO, mit dem Peptidmonomer BB68 oder mit AGEM400 wurden die entsprechenden Antiseren gewonnen. Mittels Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass weder die Peptide mit dem anti-EPO Antiserum SA4893 noch EPO mit den beiden anti-Peptid Antiseren SA5047 (anti-BB68) bzw. SA5048 (anti-AGEM400) nachgewiesen werden konnten. Alle Substanzen wurden hingegen spezifisch mit ihrem zugehörigen Antiserum detektiert (vgl. Abb. 3.31).

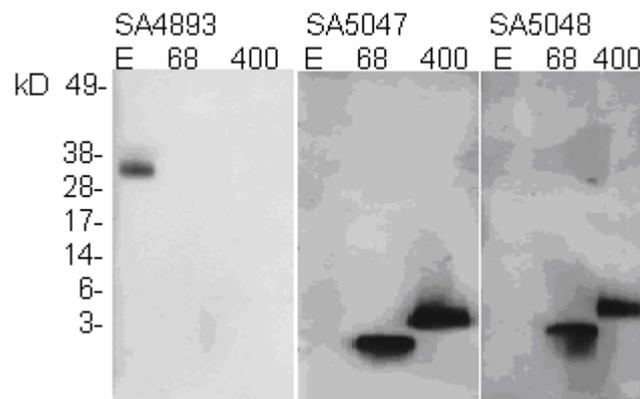


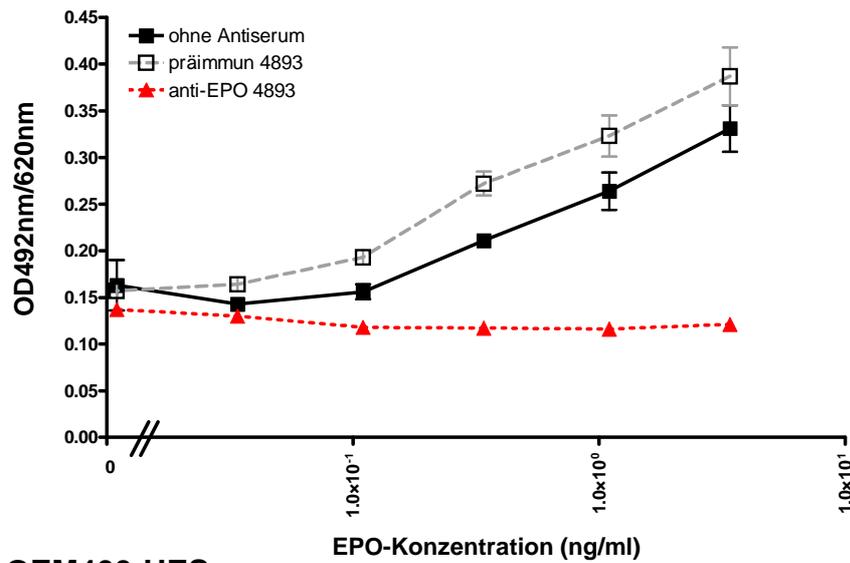
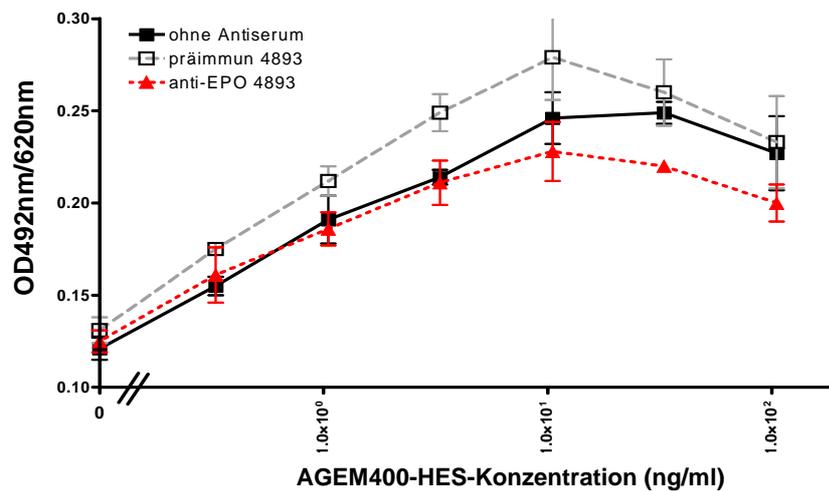
Abb. 3.31: Western Blot Analyse: immunologische Divergenz zwischen EPO und EPO-mimetischen Peptiden

EPO, BB68 und AGEM400 wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membranen geblottet und anschließend mit den zugehörigen Antiseren inkubiert. Die Antikörper, die an EPO oder die Peptide gebunden hatten, wurden über einen HRP-markierten anti-rabbit Antikörper und Chemilumineszenz detektiert und zeigten das erwartete Molekulargewicht (kD).

Anti-EPO Antikörper aus dem Kaninchen Antiserum (**SA4893**/anti-EPO) reagierten nur mit EPO (E), aber nicht mit den EMPs BB68 (68) oder AGEM400 (400). Umgekehrt reagierten anti-BB68 Antikörper (**SA5047**/anti-BB68) bzw. anti-AGEM400 Antikörper (**SA5048**/anti-AGEM400) aus den jeweiligen Kaninchen Antisera nur mit den EMPs, aber nicht mit EPO.

3.9.1 Nachweis von Kreuzreaktionen zwischen anti-EPO-Antikörpern und EPO-mimetischen Peptiden

Ein Proliferationsassay mit TF-1-Zellen zeigte, dass die proliferationsstimulierende Wirkung von AGEM400 bzw. AGEM400-HES nicht durch anti-EPO-Antikörper aus dem Serum des mit EPO immunisierten Kaninchens (anti-EPO Antiserum) blockiert wurde (vgl. Abb. 3.32(A)). Eine Inkubation der Zellen mit EPO und dem anti-EPO Antiserum hemmte dagegen den Effekt von EPO auf die Proliferation bzw. das Überleben der TF-1-Zellen (vgl. Abb. 3.32(B)).

(A) TF-1/EPO**(B) TF-1/AGEM400-HES****Abb. 3.32: TF-1, MTS-Assay: immunologische Divergenz zwischen EPO und AGEM400-HES**

TF-1-Zellen wurden in Dreifach-Bestimmungen mit verschiedenen Konzentrationen von EPO (Abb. A) oder AGEM400-HES (Abb. B) ohne Zusatz eines Serums (-■-), in Gegenwart des Präimmunserums 4893 (-□-) bzw. in Gegenwart des anti-EPO Antiserums SA4893 (-▲-) kultiviert. Anschließend wurde die Umsetzung eines Farbreagens durch metabolisch aktive Zellen photometrisch durch Absorptionsmessung bei 492 nm (Referenzfilter 620 nm) bestimmt. Die OD-Mittelwerte wurden mit Standardabweichung gegen die Konzentration aufgetragen und durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve miteinander verbunden.

3.10 ELISA: Nachweis von AGEM400 und AGEM400-HES in verschiedenen Verdünnungsmedien

Mit Hilfe eines bei der Firma Charles River generierten anti-AGEM400 Antikörpers konnte ein sensitiver Sandwich-ELISA mit einer Nachweisgrenze deutlich unterhalb von 1 ng/ml von AGEM400 bzw. AGEM400-HES, etabliert werden (vgl. Abb 3.33).

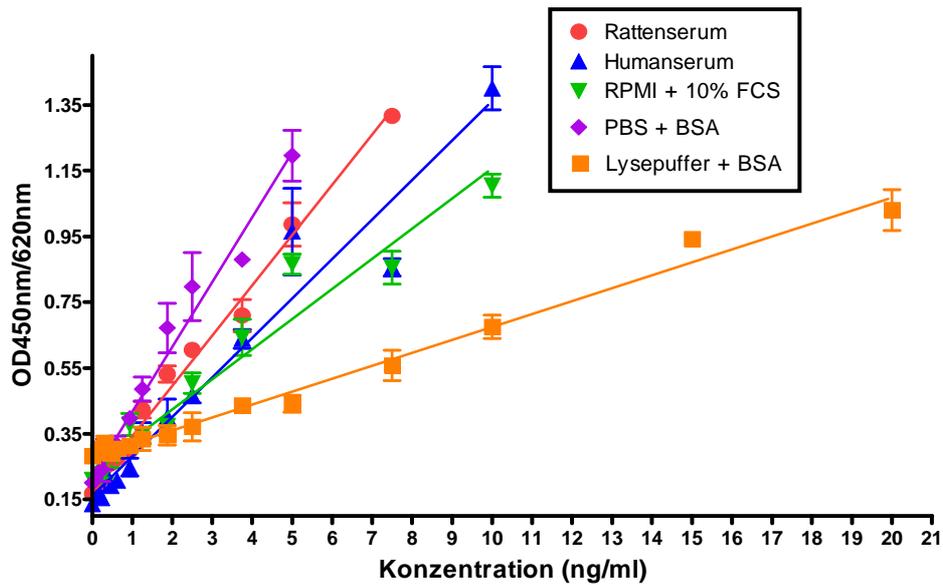
In Tabelle 3.10 sind die ermittelten OD-Werte für die Verdünnungen von AGEM400 bzw. AGEM400-HES in verschiedenen Verdünnungsmedien für Konzentrationen bis 5 ng/ml aufgeführt.

Tabelle 3.10: ELISA: Detektion von AGEM400 und AGEM400-HES

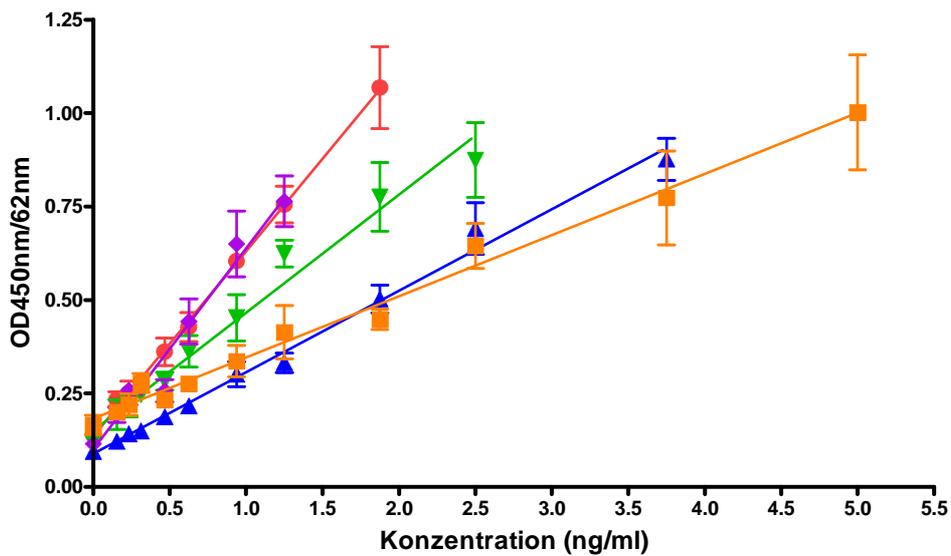
Aufgelistet sind die Mittelwerte (Mean) der photometrisch bestimmten Extinktionen (OD₄₅₀ nm) mit zugehöriger Standardabweichung (SD), die für verschiedene Konzentrationen von AGEM400 bzw. AGEM400-HES in unterschiedlichen Verdünnungsmedien ermittelt wurden. Die Nachweise erfolgten in Triplikaten.

AGEM400	Rattenserum		Humanserum		RPMI/10% FCS		PBS/BSA		Lysepuffer/ BSA	
ng per ml	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
5,00	0,99	0,07	0,96	0,13	0,87	0,03	1,20	0,08	0,44	0,03
3,75	0,71	0,05	0,64	0,03	0,64	0,06	0,88	0,02	0,44	0,01
2,50	0,61	0,02	0,47	0,02	0,50	0,03	0,80	0,10	0,37	0,04
1,88	0,53	0,02	0,40	0,05	0,37	0,01	0,67	0,08	0,35	0,03
1,25	0,42	0,02	0,35	0,03	0,34	0,03	0,49	0,04	0,33	0,03
0,94	0,30	0,01	0,25	0,03	0,38	0,03	0,40	0,02	0,31	0,02
0,63	0,28	0,02	0,21	0,01	0,28	0,01	0,32	0,03	0,30	0,02
0,47	0,26	0,02	0,19	0,01	0,28	0,03	0,32	0,02	0,29	0,02
0,31	0,25	0,02	0,24	0,06	0,27	0,05	0,29	0,05	0,32	0,03
0,23	0,21	0,03	0,15	0,01	0,22	0,00	0,24	0,04	0,31	0,02
0,16	0,20	0,01	0,16	0,00	0,23	0,01	0,23	0,01	0,29	0,01
0,00	0,17	0,01	0,14	0,02	0,21	0,01	0,20	0,00	0,28	0,01
AGEM400-HES	Rattenserum		Humanserum		RPMI/10% FCS		PBS/BSA		Lysepuffer/BSA	
ng per ml	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
5,00	1,75	0,09	1,12	0,17	1,59	0,33	1,30	0,30	1,00	0,15
3,75	1,57	0,19	0,88	0,06	1,16	0,12	1,52	0,07	0,77	0,13
2,50	1,25	0,11	0,69	0,07	0,87	0,10	1,09	0,10	0,64	0,06
1,88	1,07	0,11	0,50	0,04	0,78	0,09	0,77	0,09	0,45	0,03
1,25	0,76	0,05	0,33	0,03	0,62	0,04	0,76	0,07	0,41	0,07
0,94	0,60	0,01	0,30	0,03	0,45	0,06	0,65	0,09	0,34	0,04
0,63	0,43	0,04	0,22	0,00	0,36	0,04	0,44	0,06	0,28	0,01
0,47	0,36	0,04	0,19	0,02	0,28	0,02	0,26	0,03	0,23	0,02
0,31	0,28	0,01	0,15	0,01	0,25	0,01	0,26	0,02	0,28	0,03
0,23	0,25	0,03	0,14	0,01	0,22	0,03	0,26	0,01	0,22	0,03
0,16	0,23	0,02	0,12	0,00	0,19	0,04	0,19	0,02	0,20	0,01
0,00	0,14	0,01	0,09	0,01	0,12	0,01	0,11	0,01	0,17	0,03

(A) AGEM400



(B) AGEM400-HES

**Abb. 3.33: ELISA: Detektion von AGEM400 und AGEM400-HES**

AGEM400 (Abb. A) und AGEM400-HES (Abb. B) wurden mit verschiedenen Konzentrationen in Rattenserum (-●-), Humanserum (-▲-), RPMI/10% FCS (-▼-), PBS/1% BSA (-◆-) oder in Lysepuffer/1% BSA (-■-) verdünnt und anschließend über einen Erstantikörper Schaf-anti-AGEM400 an die Plattenoberfläche gebunden. Die Detektion erfolgte colorimetrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 492 nm (Referenzfilter 620 nm) nach Bindung eines dritten HRP-markierten Detektionsantikörpers an den Zweitantikörper aus einem Kaninchen-anti-AGEM400 Antiserum.

4 Diskussion

Das monomere Peptid BB68 unterscheidet sich von der aus der Literatur bekannten EMP-1-Sequenz [52] durch den Austausch der Aminosäuren Pro10, Trp13 und Pro17 [63]. Bisher wurde angenommen, dass es sich bei diesen drei Positionen hinsichtlich der EPO-mimetischen Wirkung um den kritischen Kern von EMP-1 handelt. In dieser Arbeit konnte diese Annahme widerlegt werden. BB68 zeigte in den hier betrachteten Testsystemen eindeutige EPO-mimetische Eigenschaften. Durch Dimerisierung von BB68 und Kopplung an ein HES-Molekül (AGEM400-HES) wurden je nach Zelllinie Effizienzen erreicht, die mit denen von EPO vergleichbar waren. AGEM400-HES aktivierte die erythroide Entwicklung hämatopoetischer Vorläuferzellen durch Induktion der Proliferation und Differenzierung. Außerdem konnte gezeigt werden, dass AGEM400-HES das Überleben hämatopoetischer Vorläuferzellen unterstützt und Apoptose inhibiert. Die Bindung an den EPO/R ist eine erste Voraussetzung, um diese Effekte zu erzielen, und konnte für AGEM400-HES spezifisch gezeigt werden. Der Wirkmechanismus von AGEM400-HES scheint auf Basis bisheriger Untersuchungen mit dem Mechanismus von EPO übereinzustimmen [68,75].

Die Kopplung von Wirkstoffen an Carrier-Moleküle ist eine gängige Methode zur Erhöhung der molekularen Masse, was *in vivo* mit einer verlängerten Halbwertszeit einhergeht. Bei den Carrier-Molekülen handelt es sich um Makromoleküle, durch die der Arzneistoff an hydrodynamischer Größe gewinnt, was neben der Stabilisierung des Wirkstoffs auch zu einer verbesserten Löslichkeit führt. AGEM400 wurde oligovalent an Hydroxyethylstärke (HES) gekoppelt. Durchschnittlich wurden fünf AGEM400-Dimere an ein HES-Molekül gebunden. Die Kopplung an HES bewirkte in TF-1 eine interessante Effizienzsteigerung von AGEM400. Die Effizienz (EC50) von AGEM400-HES lag in TF-1-Zellen je nach Assay-System 1.6x bis 4x höher als die von AGEM400. Dieser Partialagonismus von AGEM400 in TF-1-Zellen steht möglicherweise im Zusammenhang mit dem aberranten EPO-Rezeptor, der in TF-1-Zellen exprimiert wird [76]. Dabei handelt es sich um einen C-terminal trunkierten EPO-Rezeptor, der für eine gestörte STAT5-Aktivierung verantwortlich ist [77]. Offensichtlich bewirkt die Bindung von EPO an den trunkierten Rezeptor stärkere

Effekte als die Bindung von AGEM400. AGEM400-HES hingegen zeigte hingegen Effekte, die hinsichtlich der Wirkstärke mit denen von EPO vergleichbar waren. Eine multivalente Kopplung von AGEM400 an HES könnte zu einer lokalen Konzentrationserhöhung an der Zelloberfläche und damit im Vergleich zu AGEM400 zu einer stärkeren Aktivierung der EPO-Rezeptoren führen. Die verstärkte Aktivierung des Rezeptors durch eine durch Multimerisierung herbeigeführte Konzentrationserhöhung beruht vermutlich darauf, dass die Dissoziation des Peptid-Dimers vom EPO/R nur kurzfristig und schnell gefolgt von einer neuen Bindung eines an HES-gekoppelten Peptid-Dimers an den EPO/R ist. In diesem Zusammenhang kann man die höhere Aktivität von AGEM400-HES als Supravalenz- oder Multivalenzeffekt bezeichnen [64]. Dieser Effekt wurde in allen Testsystemen mit TF-1-Zellen beobachtet. Denkbar wäre auch eine Verstärkung der Aktivität durch die gleichzeitige Bindung mehrerer Peptid-Dimere eines HES-Moleküls an EPO-Rezeptoren. Hierbei wird ein weiterer Vorteil der Verwendung von HES gegenüber der von PEG als Carrier-Molekül deutlich. Mit PEG könnte ein solcher signifikanter Multivalenzeffekt nicht erreicht werden, da ein Wirkstoff an PEG nicht oligovalent gekoppelt werden kann. Die linearen Polymerketten von PEG können jeweils nur an den Termini derivatisiert werden. Interessanterweise führt eine Kopplung eines EPO-mimetischen Peptid-Dimers an PEG (Hematide®) zu einer 5-fachen Abnahme der Rezeptor-Bindungsaffinität, sowie zu einer geringeren *in vitro* Effizienz verglichen mit dem Peptid-Dimer allein [68].

Eine mögliche Erklärung für die geringere Aktivität von AGEM400 im Vergleich zu AGEM400-HES in TF-1-Zellen wird z.B. durch die Annahme des Supravalenzeffektes geliefert. Als weitere Ursache, die zu einer niedrigeren Effizienz von AGEM400 beitragen könnte, könnten verschiedene Bindungsarten von Peptid-Dimeren an die Rezeptormoleküle bzw. an die Rezeptorkomplexe sein. Abb. 4.1 zeigt Möglichkeiten mit denen AGEM400-Dimere an den EPO/R binden könnten. Es ist bekannt, dass die asymmetrische Bindung eines EPO-Proteins eine andere Konformation des Rezeptorkomplexes (intermolekulare Winkelungen) als die symmetrische Bindung eines vergleichsweise sehr kleinen Peptid-Dimers bewirkt. Vor diesem Hintergrund könnte die niedrigere Aktivität von AGEM400 verglichen mit der Aktivität von AGEM400-HES dadurch erklärt werden, dass ein EPO/R von zwei verschiedenen Dimeren gleichzeitig gebunden wird, und dies zu einer inaktiven Rezeptorkonformation führt. Bei AGEM400-HES wäre eine solche blockierende

Bindung aufgrund der räumlichen Entfernung der gekoppelten Peptid-Dimere nicht möglich.

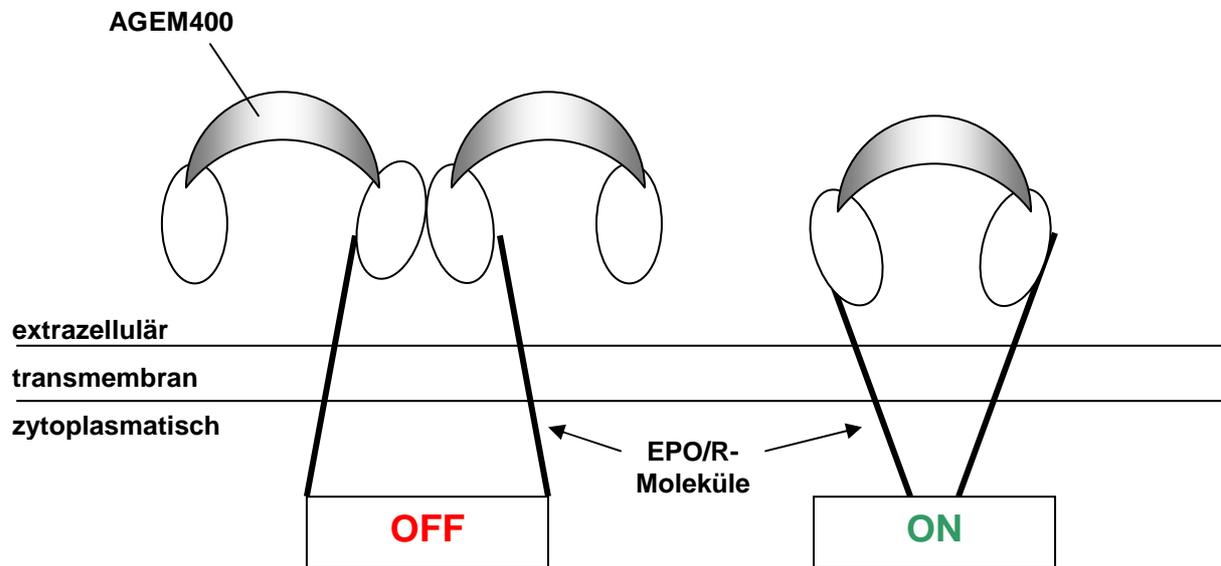


Abb. 4.1: Modell: Bindungsarten von AGEM400-Peptiden an den EPO/R

In UT-7/EPO wurde ein Partialagonismus von AGEM400 bzw. ein Multivalenzeffekt von AGEM400-HES nicht beobachtet. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass in UT-7/EPO-Zellen im Gegensatz zu TF-1-Zellen ein voll funktionsfähiger EPO/R verstärkt exprimiert wird, der sich weder quantitativ noch qualitativ limitierend auf die Wirkstärke von AGEM400 auswirkt.

PEG wird vom Organismus nicht degradiert und ausgeschieden und akkumuliert im Körper. Derzeit gibt es keine Langzeitstudien darüber, welche Auswirkungen diese Akkumulation mit sich führt. Aufgrund seiner Biodegradierbarkeit, die durch eine schnelle *Plasma Clearance* gekennzeichnet ist, wird HES in der Medizin bereits seit langem als Plasma Expander eingesetzt. Bei der Verwendung von HES als Plasma Expander wird es in hohen täglichen Dosen im zweistelligen Gramm-Bereich appliziert. Unter diesen Umständen wurde von einer Anreicherung von hochsubstituiertem (stark verzweigtem) HES in verschiedenen Organen berichtet [66,67]. Eine wiederholte Gabe von HES in diesen hohen Konzentrationen kann u.a. zu einer gestörten Nierenfunktion, zu hämostatischen Problemen oder zu Juckreiz

führen [65]. Eine Akkumulation von HES mit niedriger Substitutionsrate wurde nicht beobachtet. Die Applikation von niedrigsubstituiertem HES wird im Allgemeinen auch nach wiederholter Gabe gut vertragen [65,71,72,73].

Es muss beachtet werden, dass sich die Nebenwirkungen von HES in pharmakokinetischen bzw. toxikologischen Studien an Ratten, Schweinen und Menschen in einem Konzentrationsbereich von 0.5-1.0 g/kg Körpergewicht zeigten. Für AGEM400-HES wird zur Bekämpfung einer Anämie eine 1000-fach niedrigere effektive Dosis, die deutlich unter 1 mg/kg Körpergewicht liegt, erwartet. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die HES-Komponente des AGEM400-Konjugates in den Konzentrationsbereichen, die zur Behandlung einer Anämie nötig wären, keine Nebenwirkungen verursachen wird.

HES ist in verschiedenen Qualitäten, die sich neben dem Molekulargewicht auch im Grad der Hydroxyethylierung unterscheiden, erhältlich. Der enzymatische Abbau von HES durch Amylasen im Blut und anschließender Filterung der Fragmente in der Niere ist vor allem abhängig vom Grad der Hydroxyethylierung. Somit ist es im Gegensatz zu PEG möglich, die Halbwertszeit bzw. die Dosierung über den Wirkstoffträger durch Verwendung unterschiedlicher HES-Qualitäten zu justieren [65].

Es konnte gezeigt werden, dass AGEM400-HES bezogen auf die eingesetzte Peptidkonzentration (ng/ml) verglichen mit EPO oder mit Aranesp® in den verschiedenen *in vitro* Testsystemen äquipotente Effekte erzielte. In den Proliferationsassays zeigte AGEM400-HES in humanen TF-1 bzw. UT-7/EPO durchschnittliche EC50-Werte von 140 pM bzw. 100 pM. Diese Werte liegen unter denen, die für Hematide® (Affymax) publiziert wurden. Hier wurden durchschnittliche EC50-Werte von 900 pM bzw. 460 pM erreicht [68]. In einem kürzlich veröffentlichten Patent von Affymax wurde mit dem angegebenen effizientesten „Peptid-1“ in murinen mit dem humanen EPO/R transfizierten BA/F3-Zellen eine EC50 von 165 pM erzielt [74]. Dies ist eine Annäherung an die EC50 von AGEM400-HES. Ob die Effizienz dieses Peptides wirklich mit der Effizienz von AGEM400-HES vergleichbar ist, bleibt fraglich, da das verwendete murine und EPO/R-überexprimierende Zellsystem nicht mit den in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien TF-1 und UT-7/EPO vergleichbar ist. Es ist anzunehmen, dass humane hämatopoetische Zelllinien im

Vergleich zu einer transfizierten Mauszelllinie einen aussagekräftigeren Prognosewert hinsichtlich der Übertragung auf die *in vivo* Situation liefern.

Ein anderes EMP-1-basiertes ESA ist CNTO 530. Dabei handelt es sich um ein homodimeres Fusionsprotein, dessen monomerer Baustein aus einer Antikörper Fc-Domäne, einem Linker und einem anschließenden EMP-1-Peptid besteht. In einem Proliferationsassay mit UT-7/EPO zeigte CNTO 530 mit einer EC50 von 100 pM eine vergleichbare Effizienz wie AGEM400-HES [75].

Hinsichtlich der Wirkstärke von AGEM400-HES in murinen Systemen muss berücksichtigt werden, dass AGEM400 über Dimerisierung bzw. Konjugation an HES für den humanen EPO/R optimiert wurde. Möglicherweise führt dies zu einer geringeren Affinität für den murinen EPO/R. In Tierversuchen mit Mäusen und Ratten könnte AGEM400-HES zusätzlich durch Konkurrenz mit dem endogenen murinen EPO an Wirkstärke verlieren. Eine potentielle niedrige Wirkstärke von AGEM400-HES in Mäusen oder Ratten muss kritisch bewertet und nicht als Vorhersage für die Wirkstärke im humanen System betrachtet werden.

In klonogenen Assays mit mononukleären Zellen aus dem Knochenmark von Mensch bzw. von Cynomolgus- und Pavian-Affen wurde jeweils vergleichbar bestätigt, dass AGEM400-HES die Proliferation bzw. das Überleben myeloider Vorläuferzellen und deren Differenzierung in erythroide Zellstadien bis hin zur phänotypisch erkennbaren Hämoglin-produzierenden Zelle induziert. Die isolierten mononukleären Zellen befinden sich in einem physiologischen *in vivo*-ähnlichem Zustand, der u.a. durch einen arretierten Zellzyklus gekennzeichnet. Assays mit diesen *ex vivo* Zellen nähern sich der *in vivo* Situation wesentlich mehr an, als dies mit proliferierenden Zelllinien möglich ist. Daher sind die Ergebnisse der klonogenen Versuche zur Prädiktion der Wirkung von AGEM400-HES im humanen Organismus schwerer zu wiegen als die Ergebnisse mit den Zelllinien.

Die generierten polyklonalen Antikörper gegen EPO, gegen den monomeren Baustein BB68 bzw. gegen das dimere AGEM400-Peptid zeigten in der Western Blot Analyse untereinander keine Kreuzreaktionen. Die anti-Peptid Antikörper haben nicht an das rekombinante EPO gebunden. Umgekehrt fand keine Bindung zwischen den Peptiden und den anti-EPO Antikörpern statt. Diese immunologische Divergenz zwischen EPO und den Peptiden ist eine hervorragende Voraussetzung für die

Generierung einer neuen verbesserten Peptid-basierten Generation von ESA (=erythropoiesis stimulating agent)-Präparaten. Es ist aufgrund fehlender Sequenzhomologie sehr unwahrscheinlich, dass Peptid-basierte ESAs wie AGEM400-HES, Hematide® oder CNTO 530 die Synthese EPO-neutralisierender Antikörper induzieren können. Im Menschen bewirken EPO-neutralisierende Antikörper Erythroblastopenien (*Pure Red Cell Aplasia* [PRCA]). Für Hematide® konnte bereits ausführlich gezeigt werden, dass Antikörper gegen EPO bzw. gegen Hematide® nicht miteinander kreuzreagieren. In einem PRCA-Rattenmodell ist Hematide® in der Lage eine anti-EPO Antikörper-induzierte Anämie zu korrigieren [58].

In zukünftigen Experimenten müssen die pharmakokinetischen Parameter wie Freisetzung, Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion von AGEM400-HES ebenso wie pharmakodynamische und toxikologische Aspekte ausführlich in verschiedenen Tiermodellen untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein sensitiver ELISA zum Nachweis von AGEM400 bzw. AGEM400-HES in Ratten- oder Humanserum mit einer Nachweisgrenze von unter 1 ng/ml Peptid entwickelt und etabliert. In den verschiedenen *in vitro*-Testsystemen lagen die aktiven Konzentrationen von AGEM400-HES in einem Bereich von 1-10 ng Peptid/ml. Es ist anzunehmen, dass die Konzentrationen, die mit dem ELISA nachgewiesen werden können, in einem klinisch relevanten Konzentrationsbereich liegen. Somit wäre der ELISA ein sehr zweckdienliches Nachweisverfahren bei pharmakokinetischen Untersuchungen im Rahmen von Tierversuchen bzw. von klinischen Studien.

Um zusätzliche Details zum Wirkmechanismus von AGEM400-HES zu erlangen, wären weitere molekularbiologische Untersuchungen wie z.B. Transkriptions- und Expressionsanalysen von potentiellen Target-Genen nötig. Weiterhin wären Fragen zum Rezeptor/Wirkstoffkomplex, die im Zusammenhang mit der Rezeptor-*Clearance* oder dem Rezeptor-*Recycling* steht, zu klären.

Bisher gelangen Verbesserungen von EPO-Präparaten nur in pharmakologischen Teilbereichen aber häufig in Verbindung mit Einbußen bei anderen pharmakologischen Parametern. Beispielsweise konnte im Fall von Aranesp® die Halbwertszeit durch Hyperglykosylierung des Präparates erhöht werden, aber im Gegenzug sank die Aktivität des Wirkstoffes. Im Gegensatz zu allen bisherigen Versuchen, neue verbesserte EPO-Präparate zu entwickeln, stellt AGEM400-HES

einen potentiellen Wirkstoff dar, bei dem eine Optimierung der Pharmakodynamik und der Pharmakokinetik gleichermaßen gelungen sein könnte.

5 Literatur

1. Jelkmann, W., *Molecular Biology of Erythropoetin*. Internal Medicine 2004. **43**: 649-659
2. Obara, N. et al., *Repression via the GATA box is essential for tissue-specific Erythropoetin gene expression*. Blood 2008. **111**: 5223-5232
3. Kochling, J., Curtin, P.T. and Madan, A., *Regulation of human Erythropoetin gene induction by upstream flanking sequences in transgenic mice*. Br J Haematol 1998. **103**: 960-968
4. Bondurant, M.C. and Koury, M.J., *Anemia induces accumulation of Erythropoetin mRNA in the kidney and liver*. Mol Cell Biol 1986. **6**: 2731-2733
5. Semenza, G.L. and Wang, G.L., *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human Erythropoetin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol 1992. **12**: 5447-5454
6. Galson, D.L. et al., *The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific Erythropoetin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1*. Mol Cell Biol 1995. **15**: 2135-2144
7. Ebert, B.L. and Bunn, H.F., *Regulation of the Erythropoetin gene*. Blood 1999. **94**: 1864-1877
8. Jelkmann, W., *Erythropoetin: structure, control of production, and function*. Physiol Rev 1992. **72**: 449-489
9. Metzen, E. and Ratcliffe, P.J., *HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing*. Biol Chem 2004. **385**: 223-230
10. Maxwell, P.H. et al., *Identification of the renal Erythropoetin-producing cells using transgenic mice*. Kidney Int 1993. **44**: 1149-1162
11. Koury, S.T., Bondurant, M.C. and Koury, M.J., *Localization of Erythropoetin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization*. Blood 1988. **71**: 524-527
12. Marti, H.H. et al., *Erythropoetin gene expression in human, monkey and murine brain*. Eur J Neurosci 1996. **8**: 666-676
13. Magnanti, M. et al., *Erythropoetin expression in primary rat Sertoli and peritubular myeloid cells*. Blood 2001, **98**: 2872-2874

14. Fandrey, J. and Bunn, H.F., *In vivo and in vitro regulation of Erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction*. Blood 1993. **81**: 617-623
15. Acs, G. et al., *Erythropoietin and Erythropoietin receptor expression in human cancer*. Cancer Res 2001. **61**: 3561-3565
16. Stolze, I. et al., *Hypoxia-inducible Erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells*. Blood 2002. **100**: 2623-2628
17. Ogilvie, M. et al., *Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts*. J Biol Chem 2000. **275**: 39754-39761
18. Anagnostou, A. et al., *Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A 1994. **91**: 3974-3978
19. Morishita, E. et al., *Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and Erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death*. Neuroscience 1997. **76**: 105-116
20. Wu, H. et al., *Inactivation of Erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis*. Development 1999. **126**: 3597-3605
21. Juul, S.E. et al., *Erythropoietin and Erythropoietin receptor in the developing human central nervous system*. Pediatr Res 1998. **43**: 40-49
22. Henke, M. et al.; *Do Erythropoietin Receptors on Cancer Cells Explain Unexpected Clinical Findings?*. J Clin Onc 2006. **24**: 4708-4713
23. Masuda, S., Nagao, M. and Sasaki, R., *Erythropoietic, neurotropic, and angiogenic functions of Erythropoietin and regulation of Erythropoietin production*. Int J Hematol 1999. **70**: 1-6
24. Brines, M.L. et al., *Erythropoietin mediates tissue protection through an Erythropoietin and common β -subunit heteroreceptor*. PNAS 2004. **101**: 14907-14912
25. Santoro, A., *Anemia in renal insufficiency*. Rev Clin Exp Hematol 2002. **Suppl 1**: 12-20
26. Jelkmann, W. et al., *Inhibition of Erythropoietin production by cytokines. Implications for the anemia involved in inflammatory states*. Ann N Y Acad Sci 1994. **718**: 300-309; discussion 309-311
27. Wang, Z., Goldberg, A. and Scadden, D., *HIV-1 suppresses Erythropoietin production in vitro*. Exp Hematol 1993. **21**: 683-688
28. Jelkmann, W., Wolff, M. and Fandrey, J., *Inhibition of Erythropoietin production by cytokines and chemotherapy may contribute to the anemia in malignant diseases*. Adv Exp Med Biol 1994. **345**: 525-530

29. Lappin, T.R., Maxwell, A.P and Johnston, P.G., *EPO's alter ego: Erythropoietin has multiple actions*. Stem Cells 2002. **20**: 485-492
30. Brines, M.L. et al., *Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury*. PNAS 2000. **97**: 10526-10531
31. Ehrenreich, H. et al., *Exploring recombinant human Erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis*. Brain 2007. **130**: 2577-2588
32. Ehrenreich, H. et al., *Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human Erythropoietin*. Mol Psychiatry 2007. **12**: 206-20
33. Darnell, J.E. et al., *JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science 1994. **264**: 1415-1421
34. Klingmüller, U. et al., *Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the Erythropoietin receptor promote activation of STAT5*. Proc Natl Acad Sci 1996, **93**: 8324-8328
35. Sharpe, K., Ashenden, M. and Schumacher, Y., *A third generation approach to detect Erythropoietin abuse in athletes*. Haematologica 2006, **91**: 356-363
36. Jelkmann, W., *Recombinant EPO production-points the nephrologist should know*. Nephrol Dial Transplant 2007. Editorial Comment
37. Lundby, C. et al., *Testing for recombinant human Erythropoietin in urine: problems associated with current anti-doping testing*. J Appl Physiol 2008, **105**: 417-419
38. Nissen-Lie, G. et al., *Serum sTfR levels may indicate charge profiling of urinary r-hEPO in doping control*. Med Sci Sport Exercise 2004. **36**: 588-593
39. Cotter, D.J. et al., *Hematocrit was not validated as a surrogate end point for survival among epoietin-treated hemodialysis patients*. J Clin Epidemiol 2004. **57**: 1086-1095
40. Leyland-Jones, B. et al., *Maintaining normal hemoglobin levels with epoietin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: A survival study*. J Clin Oncol 2005. **23**: 5960-5972
41. Lasne, F., *Double-blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures*. JIM 2003. **276**: 223-226
42. Henke, M. et al., *Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anemia undergoing radiotherapy: Randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet 2003. **362**: 1255-1260
43. Wide, L. and Bengtsson, C., *Molecular charge heterogeneity of human serum Erythropoietin*. Br J Haematol 1990. **76**: 121-127

-
44. Laugsch, M et al., *Problems in identifying functional Erythropoietin receptors in cancer tissue*. J Clin Oncol 2007. **25**: 1627-8
45. Wide, L. et al., *Detection in blood and urine of recombinant Erythropoietin administered to healthy men*. Med Sci Sport Exercise 1995. **27**:1569-1576
46. Bouman-Thio, E. et al., *A phase I single and fractionated, ascending-dose study evaluating the safety pharmacokinetics, pharmacodynamics, and immunogenicity of an Erythropoietin mimetic antibody fusion protein (CNTO 528) in healthy male subjects*. J Clin Pharmacol 2008. **48**: 1197-1207
47. Elliot, S., Pham, E. and MacDougall, I.C., *Erythropoietins: a common mechanism of action*. Exp Hematol 2004. **36**: 1573-1584
48. Lundby, C. et al., *Erythropoietin treatment elevates hemoglobin concentration by increasing red cell volume and depressing plasma volume*. J Physiol 2007. **578**: 309-314
49. MacDougall, I.C., *Recent advances in erythropoietic agents in renal anemia*. Semin. Nephrol 2006. **26**: 313-318
50. Stead, R.B. et al., *Evaluation of the safety and pharmacodynamics of Hematide, a novel erythropoietic agent, in phase 1. double blind, placebo-controlled, dose escalation study in healthy volunteers*. Blood 2006. **108**: 1830-1834
51. Jelkmann, W., *Developments in the therapeutic use of erythropoiesis stimulating agents*. Br J Haematol 2008. **141**:287-297
52. Wrighton, N.C. et al., *Small peptides as potent mimetics of the protein hormone Erythropoietin*. Science 1996. **273**: 458-463
53. Bose, C. and Udupa, K., *Erythropoietin enhancement of rat pancreatic tumor cell proliferation requires the activation of ERK and JNK signals*. Am J Physiol Cell Physiol 2008. **295**: C394-405
54. Kaushansky, K., *Hematopoietic Growth Factor Mimetics*. Ann N Y Acad Sci 2001. **938**: 131-138
55. Livnah, O. et al., *Functional mimikry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å*. Science 1996. **273**: 464-471
56. Way, J.C. et al., *Improvement of Fc-Erythropoietin structure and pharmacokinetics by modification at a disulfide bond*. PEDS 2005. **18**: 111-118
57. Capon, D.J. et al., *Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy*. Nature 1989. **337**: 525-531

-
58. Woodburn, K.W. et al., *Hematide is immunologically distinct from Erythropoietin and corrects anemia induced by antiErythropoietin antibodies in a rat pure cell aplasia model*. *Exp Hematol* 2007. **25**: 1201-1208
59. Casadevall, N., *What is antibody-mediated pure red cell aplasia (PRCA)?* *Nephrol Dial Transplant* 2005. **20**: iv3-iv5
60. Schellekens, H., *Immunological mechanism of EPO-associated pure red cell aplasia*. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005. **18**: 473-480
61. Kubatzky, K. et al., *Structural Requirements of the Extracellular To Transmembrane Domain Junction for Erythropoietin Receptor Function*. *J Biol Chem* 2005. **280**: 14844-14854
62. Wrighton, N.C. et al., *Increased potency of an Erythropoietin peptide mimetic through covalent dimerization*. *Nature Biotech* 1997. **15**: 1261-1265
63. Johnson, D.L. et al., *Identification of a 13 amino acid peptide mimetic of Erythropoietin and description of amino acids critical for the mimetic activity of EMP1*. *Biochemistry* 1998. **37**: 3699-3710
64. Vadas, O. et al., *Multivalency – a way to enhance binding avidities and bioactivity – preliminary applications to EPO*. *J Peptide Science* 2007. **13**: 581-7
65. Boldt, J., *Modern rapidly degradable hydroxyethyl starches: current concepts*. *Anesth Analg* 2009. **108**: 1574-82
66. Lehmann, G.B. et al., *HES 130/0.42 shows less alterations of pharmacokinetics than HES 200/0.5 when dosed repeatedly*. *Br J Anaesth* 2007. **98**: 635-44
67. Eisenbach, C. et al., *Pharmacokinetics and organ storage of hydroxyethyl starch in acute hemodilution in pigs: influence of molecular weight and degree of substitution*. *Intensive Care Med* 2007. **33**: 1637-44
68. Fan, Q. et al., *Preclinical evaluation of Hematide, a novel erythropoiesis stimulating agent, for the treatment of anemia*. *Exp Hematol* 2006. **34**: 1303-11
69. Leuschner, J. et al., *Tissue storage of ¹⁴C-labelled hydroxyethyl starch (HES) 130/0.4 and HES 200/0.5 after repeated intravenous administration to rats*. *Drugs in R&D* 2003. **4**: 331-8
70. Knorr, K. and other inventors, *Process for forming disulfide bridges*. WIPO patent WO/2008/077621. 2008 July
71. Waitzinger, J. et al., *Pharmacokinetic and tolerability of a new hydroxyethylstarch (HES) specification [HES(130/0.4)] after single-dose infusion of 6% or 10% solutions in healthy volunteers*. *Clin Drug Invest* 1998. **16**: 151-60

72. Jungheinrich, C. et al., *The pharmacokinetics and tolerability of an intravenous infusion of the new hydroxyethylstarch 130/0.4 (6%, 500ml) in mild-to-severe renal impairment*. Anesth Analg 2002. **95**: 544-51
73. Waitzinger, J. et al., *Hydroxyethylstarch (HES) [130/0.4], a new HES specification :pharmacokinetics and safety after multiple infusions of 10% solution in healthy volunteers*. Drugs in R&D 2003. **4**: 149-57
74. Duliege, A.M. and other inventors, *Erythropoietin receptor peptide formulations and uses*. WIPO patent WO/2009/025958. 2009 Feb.
75. Bugelski, P.J. et al., *CNTO 530: Molecular pharmacology in human UT-7/EPO cells and pharmacokinetics and pharmacodynamics in mice*. J Biotechnol 2008. **134**: 171-80
76. Winkelmann, J.C. et al., *A translocated erythropoietin receptor gene in a human erythroleukemia cell line (TF-1) expresses an abnormal transcript and a truncated protein*. Blood 1995. **85**: 179-85
77. Chretien, S. et al., *Erythropoietin-induced erythroid differentiation of the human erythroleukemia cell line TF-1 correlates with an impaired STAT5 activation*. EMBO J 1996. **15**: 4174-4181

6 Veröffentlichungen

Publikation:

Greindl, A., Kessler, C., Breuer, B., Haberl, U., Rybka, A., Emgenbroich, M., Pötgens A.J.G., Frank, H.G., *AGEM400(HES), a Novel Erythropoietin Mimetic Peptide Conjugated to Hydroxyethyl Starch with Excellent in vitro Efficacy*. The Open Hematology Journal (Vol. 4) 2010

Zitierbare Abstracts/ Posterbeiträge

Frank, H.G., Pötgens, A., Rybka, A., Knorr, K., Emgenbroich, M., Casaretto, M., Breuer, B., **Greindl, A.**, Kessler, C., Kromminga, A., *An optimized supravalent EPO mimetic peptide with unprecedented efficacy*. Ann Hematol 2006. **85**: 643

Greindl, A., Pötgens, A.J.G., Kessler, C., Breuer, B., Haberl, U., Rybka, A., Emgenbroich, M., Frank, H.G., *AGEM400(HES), a novel erythropoietin mimetic peptide conjugated to hydroxyethyl starch with excellent in vitro efficacy*. FOCUS uni-luebeck – EPO Meeting Luebeck 2009, Seite 22

Pötgens, A.J.G., **Greindl, A.**, Kessler, C., Breuer, B., Haberl, U., Rybka, A., Emgenbroich, M., Frank, H.G., *SEStide, an erythropoietin mimetic peptide conjugated to hydroxyethyl starch optimized for in vivo efficacy and pharmacokinetics*. FOCUS uni-luebeck – EPO Meeting Luebeck 2009, Seite 30

7 Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

Ganz besonders möchte ich bei Prof. Dr. med. Hans-Georg Frank von der AplaGen GmbH in Baesweiler für die Ermöglichung und Unterstützung dieser Arbeit zu diesem spannenden Thema bedanken. Dr. rer. nat. Andy Pötgens und allen anderen „AplaGenies“ danke ich ebenfalls sehr für die langjährige Zusammenarbeit.

Prof. Dr. rer. nat. Ralf Weiskirchen danke ich überaus für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die engagierte Übernahme des Erstgutachtens dieser Arbeit.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Prof. Dr. techn. Werner Baumgartner ausgesprochen dankbar.

Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann bin ich sehr dankbar für die Überlassung der UT-7/EPO-Zellen, die für diese Arbeit von großer Bedeutung waren.

Dr. rer. nat. Steffen Meurer danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und für seine Diskussionsbereitschaft.

Mein herzlichster Dank geht an meine Familie:

Ich bedanke mich bei meinen Kindern Janka und Paul für ihre Liebe, für die Zeit mit ihnen und für die Zeit, die sie mir für meine Arbeit überlassen.

Elmar Hoffmann, meinem treuen Wegbegleiter, danke ich für seine fortwährende Motivation und seinen unerschütterlichen Glauben an mich.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und alle in Anspruch genommenen Hilfen in der Dissertation angegeben habe. Weiterhin versichere ich, dass ich keine früheren Promotionsanträge gestellt habe. Ich erkläre, dass mit Veröffentlichung der Dissertation keine bestehenden Betriebsgeheimnisse verletzt werden.

Lebenslauf:**Persönliche Daten:**

Name: Greindl
Vorname: Alexandra
Geburtstag: 11.09.1974
Geburtsort: Düren
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulabschluss:

1995 Abitur

Studium:

1995 – 2003 Studium der Biologie an der RWTH Aachen
Abschluss: Diplom

Promotion:

2006 – 2009 Dissertation in der Abteilung für Zell- und Molekularbiologie der AplaGen GmbH, Baesweiler

Berufstätigkeiten:

2003-2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Zell- und Molekularbiologie der AplaGen GmbH, Baesweiler
seit 2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen

Düren im Juli 2010