

Universität Zürich

Physiologisches Institut
Direktor: Prof. Dr. med. C. Bauer

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. med. vet. Max Gassmann und
Dr. med. Hugo H. Marti

Etablierung einer quantitativen RT-PCR für humanes Erythropoietin

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich**

vorgelegt von
Vivian S. U. Aschkenasy
von Zürich

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. C. Bauer

Zürich 1997

Danksagung

Ich danke Herrn Dr. med. Hugo Marti für seine wertvolle fachliche Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit, sowie für die grosse Geduld und die vielen Anregungen bei der Erstellung des Manuskripts.

Herrn PD Dr. med. vet. Max Gassmann danke ich für seine Anregungen bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. Roland Wenger danke ich für die Hilfe bei den Klonierungsarbeiten und die wertvollen Ratschläge zu den Problemen, die im Laufe der Arbeit auftraten.

Dr. Norbert Arnold sowie allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts danke ich für ihre Hilfe und Erklärungen in allen Bereichen.

Nicht zuletzt danke ich Herrn Prof. Dr. med. Christian Bauer für die vielen lehrreichen Diskussionen und für die Möglichkeit, an seinem Institut die vorliegende Arbeit erstellen zu können.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
Die Hämatopoese.....	1
Die Entdeckung des Erythropoietin.....	2
Die Struktur des Erythropoietins.....	3
Wann und wo wird Erythropoietin gebildet ?.....	3
Wie wirkt Erythropoietin ?.....	4
Erythropoietin beim gesunden Menschen.....	4
Erythropoietin in der Therapie renaler Anämien.....	4
Methoden der Erythropoietin-Quantifizierung.....	5
<i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Bioassay.....	5
Radio immuno assay (RIA).....	6
Ribonuclease Protection Assay.....	6
RT-PCR des hEPO.....	7
Kompetitive RT-PCR des hEPO.....	9
2. Ziel der Arbeit.....	10
3. Material und Methoden.....	11
3.1. Material.....	11
3.1.1. Eukaryote Zellen.....	11
3.1.2. Prokaryote Zellen.....	11
3.1.3. Plasmide.....	11
3.1.4. PCR-Primer.....	12
3.1.5. Enzyme.....	12
3.2. Methoden.....	13
3.2.1. Präparation von DNA und RNA.....	13
3.2.1.1. Phenolextraktion.....	13
3.2.1.2. Ethanol-Fällung.....	13
3.2.1.3. Gewinnung von Plasmid-DNA.....	13
3.2.1.4. Gewinnung von Gesamt-RNA aus Zellen.....	14
3.2.1.5. Gewinnung von RNA aus menschlichem Gewebe.....	15
3.2.2. Klonierung.....	15
3.2.2.1. Präparative Spaltung von Plasmid-DNA.....	15
3.2.2.2. Analytische Spaltung.....	16
3.2.2.3. Linearisierende Spaltung.....	16
3.2.2.4. Gel-Elektrophorese.....	16
3.2.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten.....	16
3.2.2.6. Phosphatase-Behandlung von DNA-Fragmenten.....	17
3.2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten.....	17
3.2.2.8. Transformation von Bakterien.....	17
3.2.2.9. Charakterisierung rekombinanter Plasmide.....	18
3.2.3. Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA.....	18
3.2.4. <i>In vitro</i> Transkription von mRNA.....	19
3.2.5. PCR und RT-PCR.....	20
3.2.6. Kompetitive RT-PCR.....	20
4. Ergebnisse.....	22
4.1. Klonierung des externen Standards pEPO64.....	22
4.2. Quantitative RT-PCR des humanen EPO.....	25
4.2.1. Primer.....	25
4.2.2. RT-PCR des humanen EPO.....	26
4.2.3. Bestimmung der Nachweisgrenze der RT-PCR.....	27
4.2.4. Quantitative RT-PCR.....	29
4.3 Erythropoietin im menschlichen Gehirn ?.....	31
5. Diskussion.....	32
6. Zusammenfassung.....	36
7. Literaturnachweis.....	37
8. Anhang.....	42
8.1. Verwendete Abkürzungen.....	42
8.2. Curriculum vitae.....	43

1. Einleitung

Die Hämatopoiese

Die Zahl der Blutzellen im gesunden menschlichen Körper ist weitgehend konstant. Die altersbedingt sterbenden Zellen werden durch die Hämatopoiese, die Blutbildung, ersetzt. Der Ort der Blutbildung verlagert sich im Laufe der Entwicklung vom Dottersack des Embryos über Leber und Milz des Feten zum roten Knochenmark beim Neugeborenen und Adulten. Während Neugeborene noch ihr ganzes Knochenmark zur Hämatopoiese benutzen, wird beim Erwachsenen nur noch in den kleinen und platten Knochen Blut gebildet.

Alle Blutzellen entwickeln sich aus einem Pool pluripotenter Stammzellen, die ständig proliferieren. Durch Wachstumsfaktoren (Glykoprotein-Hormone und parakrine Peptide) entwickeln sich die Tochter-Zellen in Richtung Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten oder Lymphozyten. Die Zahl der proliferierenden und sich differenzierenden Zellen kann als Antwort auf eine Blutung oder während einer Infektion stark ansteigen. Die Erythropoiese, also die Bildung der roten Blutkörperchen, wird hauptsächlich durch das Glykoprotein-Hormon **Erythropoietin [EPO]** reguliert.

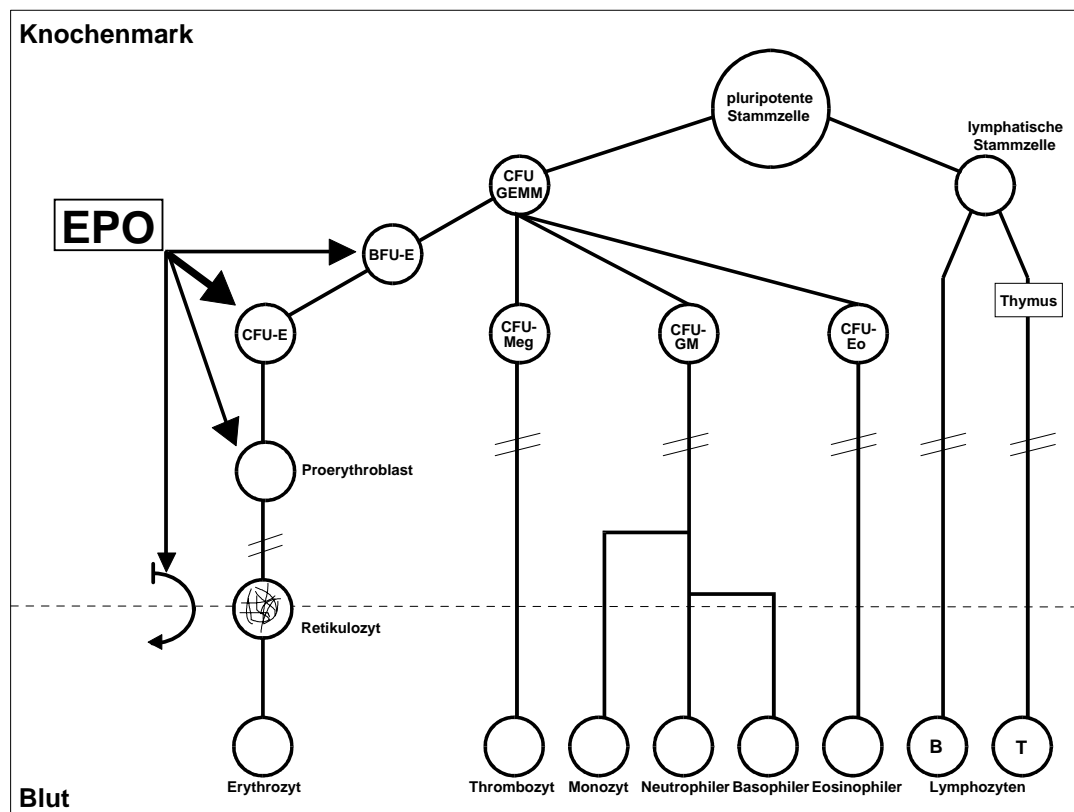


Abbildung 1: Die Hämatopoiese in der Übersicht. Legende: CFU = "colony forming unit"; GEMM = granulozytär, erythrozytär, monozytär und megakaryozytär; E = erythrozytär; GM = granulozytär/monozytär; Eo = eosinophil; Meg = megakaryozytär; BFU-E = erythrozytäre "burst formung unit"

Erythrozyten leben im Durchschnitt 120 Tage. Durch den Alterungsprozess wird die Membran unelastisch und die Passage durch die engen Milzsinus unmöglich. Sie platzen schliesslich beim Versuch, die Milz zu passieren und ihr Hämoglobin wird vom Blut in die Leber transportiert. Die Leber baut das Häm zu Bilirubin und Eisen und das Globin zu Aminosäuren ab. Täglich gehen 1% der Erythrozyten ($2-3 \times 10^{11}$ Zellen!) zugrunde und werden vom Knochenmark durch Retikulozyten ersetzt. Abbildung 1 zeigt den Verlauf der Hämatopoiese in stark vereinfachter Form. Die pluripotente Stammzelle teilt sich in eine gemischt determinierte Zelle (CFU-GEMM), aus welcher sich die Erythrozyten, die Thrombozyten und die Granulozyten bilden, sowie in eine lymphatische Stammzelle als Vorläufer der B- und T-Lymphozyten. Mikroskopisch sind diese Vorläuferzellen nicht voneinander zu unterscheiden, man kann sie jedoch in Kultur unter speziellen Bedingungen indirekt nachweisen. Die Zellen bilden im Medium typische Kolonien und werden deshalb als *colony forming units* (CFU)

bezeichnet. Von der erythropoietischen Zellreihe kennt man eine weitere, noch vor der CFU-E gebildete Vorläuferzelle, die erythrozytäre *burst formig unit* (BFU-E). Aus der CFU-E bildet sich durch Proliferation und Differenzierung der Proerythroblast, der jetzt aber durch seine typischen Strukturen mikroskopisch von seinen Vorläufern unterscheidbar ist. Als nächstes bildet sich der Erythroblast, welcher über Zwischenstufen schliesslich zum Retikulozyten wird. Der Retikulozyt verlässt das Knochenmark und tritt ins Blut über, wo er zum Erythrozyten reift. Auf dem Weg von der Stammzelle zum reifen Erythrozyten im Kreislauf spielt das Hormon *Erythropoietin* auf verschiedenen Ebenen eine wichtige Rolle (s. auch Abbildung 1). Die Geschichte der Entdeckung des EPOs reicht ins letzte Jahrhundert zurück und soll hier zur Übersicht kurz aufgerollt werden.

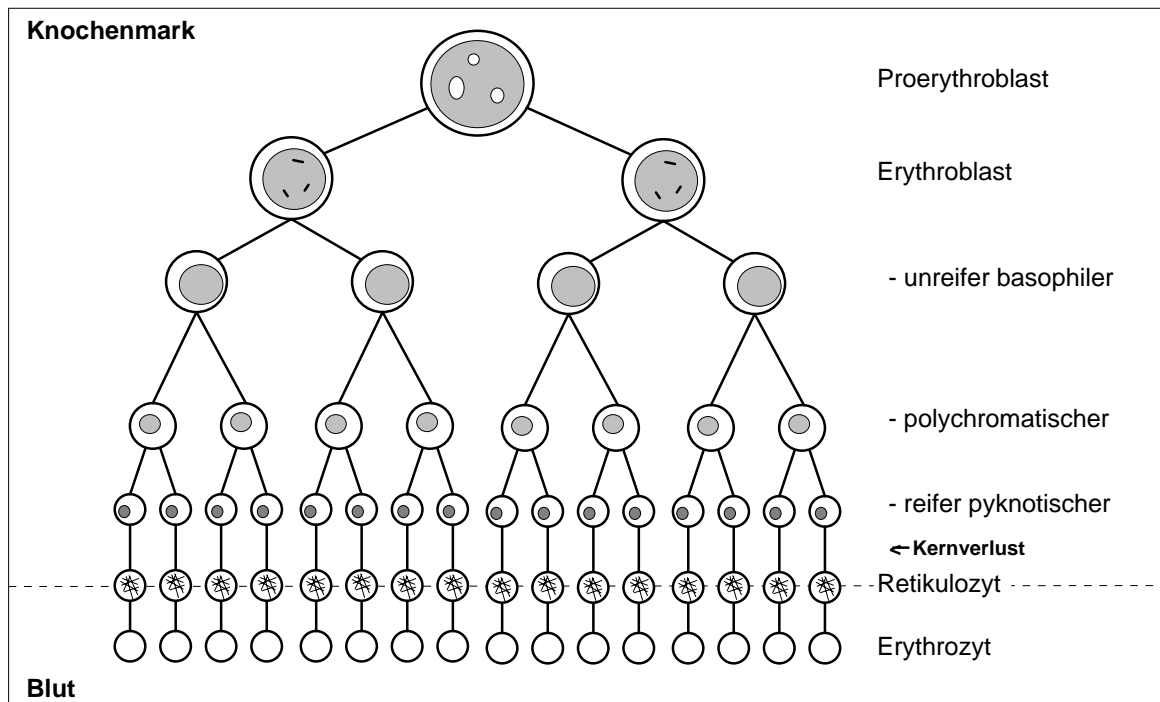


Abbildung 2: Die mikroskopisch unterscheidbaren Zellen der Erythropoese.

Die Entdeckung des Erythropoietin

Ein Absinken des Sauerstoffpartialdrucks (P_{O_2}), also der Sauerstoffkonzentration, im Blut führt nach einer Latenzzeit von einigen Tagen zum Anstieg der Erythrozytenzahl. Diese Tatsache wurde schon 1890 vom französischen Histologen Viault entdeckt, der anlässlich einer dreiwöchigen Expedition ins Hochland von Morococha (Peru, 4400 m) einen Anstieg der Zahl seiner Blut-Erythrozyten [Ec] von 5×10^6 auf $8 \times 10^6/\mu\text{l}$ beobachtete (Viault, 1890). Erste Hinweise für die Beteiligung eines Hormons bei der Regulation der Erythropoese fanden Carnot und Deflandre 1906. Sie stellten fest, dass die Ec-Zahl im Blut von Hasen 2 Tage nach einer Transfusion mit Blut von anämischen Tieren stark anstieg (20-40%) und gaben dem blutbildenden Stoff den Name "Haemopoietin" (Carnot und Deflandre, 1906). Dieser starke und eindeutige Effekt auf die Ec-Zahl konnte in der Folge aber nicht bestätigt werden und somit begann ein Gelehrtenstreit über die Existenz eines solchen Faktors, der erst 50 Jahre später zugunsten von Carnot und Deflandre entschieden werden sollte.

Gestolpert waren die frühen Nachweisversuche alle an der langen Latenzzeit zwischen Verabreichung des Hormons (damals in Form einer Infusion von Blut anämischer Tiere) bis zum Eintritt der Wirkung in Form des Anstiegs der Ec-Zahl. Erst Erslev gelang es 1953 endgültig den Beweis zu erbringen, dass ein humoraler Faktor die Erythropoese reguliert (Erslev, 1953). Er zeigte, dass nach einiger Zeit die *Retikulozytenzahl* sowie der Hämatokrit (das Verhältnis von festen Blutbestandteilen zum Blutplasma) im Blut von Hasen anstieg, wenn man diesen über längere Zeit grössere Mengen Blut von stark anämischen Tieren transfundierte. Auch Kritiker mussten zugeben, dass eine erhöhte Retikulozytenzahl nicht durch eine fehlerhafte Konzentrierung entstehen kann, sondern Zeichen vermehrter

Blutbildung ist. Schon damals erkannte Erslev, dass dieser Stoff, wäre er in gereinigter Form erhältlich, von grossem therapeutischen Nutzen sein würde. Der Name **Erythropoietin** wurde 1948 von Bonsdorff und Jalavisto geprägt (Bonsdorff und Jalavisto, 1948).

1957 stellten Jacobson et al. fest, dass die erythropoietische Aktivität von Plasma anämischer Tiere *ohne Nieren* nicht erhöht war. Des Weiteren fand man einen Epo-Mangel bei Personen, welche an chronischem Nierenversagen litten (Gurney et al., 1957).

Wieder fanden sich Kritiker, die ein in der Niere produziertes Hormon, einen Botenstoff, der *direkte* Wirkung auf die Blutbildung im Knochenmark hat, für unmöglich hielten. Sie postulierten ein unter Hypoxie durch die Niere gebildetes Enzym namens "Erythrogenin". Dieses Enzym sollte dann die Umwandlung einer in der Leber produzierten Vorstufe des Erythropoietin zum aktiven Hormon katalysieren. Diese Hypothese wurde erst 1974, wiederum von Erslev, widerlegt. Er zeigte erythropoietische Aktivität in serumfreiem Medium von isoliert perfundierten Hasennieren (Erslev, 1974).

Jacobs et al. isolierten aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie 10µg EPO (die aplastische Anämie ist durch eine Knochenmarksschädigung bedingt, die normale Niere reagiert mit sehr hohen EPO-Titern). Das EPO wurde mit Trypsin zu kleinen Fragmenten verdaut, deren Aminosäuresequenz dann bestimmt wurde. Aus der Aminosäuresequenz der Peptide wurde dann die Nukleotidsequenz bestimmt und nach dieser synthetische Oligonukleotide hergestellt, welche als Sonden zur Isolierung der cDNA aus λ-Phagen Bibliotheken führte.

Als Meilenstein in der EPO-Forschung gilt die Gewinnung einiger Milligramm reinen Erythropoietins durch Miyake et al. 1977. Die Erhältlichkeit des gereinigten Hormons ermöglichte es in der Folge zwei unabhängig voneinander forschenden Gruppen (Jacobs et al., 1985 und Lin et al., 1985) die Gensequenz des Hormons zu entschlüsseln. Nachdem die Gen-Sequenz bekannt war, konnte gezielt nach der EPO-mRNA gesucht werden. Mit dem Nachweis von EPO-mRNA in der adulten humanen Niere und der fetalen Leber (Beru et al., 1986; Bondurant und Koury, 1986; Schuster et al., 1987) war die Niere als Hormonproduzent endgültig etabliert.

Die Struktur des Erythropoietins

Das menschliche EPO-Gen befindet sich auf Chromosom 7 und besteht aus fünf Exons und vier Introns. Es kodiert für eine einzige Polypeptidkette bestehend aus 193 Aminosäuren, von denen aber nur 165 im biologisch aktiven, 30'400 Dalton schweren, Glykoprotein-Hormon zu finden sind. 27 hydrophobe Aminosäuren am N-terminalen Ende sorgen als Anhang-Peptid für die Sekretion des Proteins (Jacobs et al., 1985; Lin et al., 1985) und werden zusammen mit dem C-terminalen Arginin in einer posttranslationalen Modifikation entfernt (Recny et al., 1987; Imai et al., 1990).

Wann und wo wird Erythropoietin gebildet ?

Vor der Geburt ist die Leber das wichtigste EPO-bildende Organ (Lucarely et al., 1968), danach übernimmt die Niere diese Aufgabe (Jacobson et al., 1957). Die EPO-Konzentration im Blut kann bei Hypoxie um ein Tausendfaches ansteigen. Dies geschieht durch EPO-mRNA Neubildung und Proteinsynthese. Wie genau der Sauerstoffmangel zur Induktion des EPO-Gens und damit zur Neubildung von EPO-mRNA führt, wird zurzeit intensiv erforscht. Bekannt ist bisher, dass ein Transkriptionsfaktor, der Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) genannt wurde, ein Enhancer-Element bindet, welches sich im 3'-flankierenden Bereich des EPO-Gens befindet (Semenza et al., 1992). 1995 wurde HIF-1 biochemisch gereinigt und die cDNA isoliert (Wang und Semenza, 1995; Wang et al., 1995). HIF-1-Protein wird durch Hypoxie aktiviert (Jiang et al., 1996) und seine Bindung ans Enhancer-Element aktiviert das EPO-Gen (Semenza et al., 1991). Abgesehen vom EPO-Gen induziert HIF-1 auch die Expression glycolytischer Enzyme und anderer Gene (Bunn und Poyton, 1996; Wenger und Gassmann, 1997).

Die EPO-Antwort auf einen Hypoxie-Stress ist interessanterweise dynamisch. Initial (erste 6 bis 72h) finden sich im Blut sehr hohe EPO Konzentrationen (Eckardt et al., 1989) und obwohl die Hypoxie persistiert, sinkt in der Folge die EPO-Konzentration im Blut. Der feed-back Mechanismus, der zum Absinken der EPO-Konzentration führt, ist bisher noch nicht geklärt.

Da die Zahl der Erythrozyten, die infolge der EPO-Auschüttung gebildet werden, erst zu einem späteren Zeitpunkt ansteigt (Fried et al., 1970; Jelkmann, 1982; Seferynska, 1989), kann der feed-back Mechanismus nicht auf dieser Ebene liegen. Auch hohe EPO-Konzentrationen im Blut hemmen eine weitere EPO-Bildung nicht (Eckardt et al., 1990; Fried und Barone-Varelas, 1984).

Die Niere ist beim Erwachsenen das wichtigste EPO-Bildende Organ, jedoch produzieren auch andere Organe (Leber, Hirn, Hoden sowie verschiedene Tumoren) kleine Mengen von EPO (Marti et al., 1996). Um im Labor die Induktion der EPO-Bildung studieren zu können, braucht man Zellen, welche abhängig von der O₂-Exposition EPO produzieren. Hepatom-Zell-Linien (von Lebertumoren abgeleitete Zellen, Hep G2 und Hep 3B) können abhängig von der Sauerstoffkonzentration der Umgebung EPO produzieren (Goldberg et al., 1987) und sind heute in der EPO-Forschung das wichtigste Modell.

Wie wirkt Erythropoietin ?

Früher glaubte man, EPO stimuliere die Proliferation und Differenzierung erythrozytgener Vorläuferzellen und aktiviere die mitotische Teilung der Proerythroblasten und der basophilen Erythroblasten (s. Abb. 1) (Udupa et al., 1986). Neuere Untersuchungen zeigen hingegen, dass der Mechanismus darin besteht, die Apoptose der Vorläuferzellen zu verhindern (Koury und Bondurant, 1990). Zusätzlich zu dieser Wirkung beschleunigt das Erythropoietin auch die Freisetzung der Retikulozyten aus dem Knochenmark (Papayannopoulou und Finch, 1972). Die maximale Retikulozytenzahl wird 3 bis 4 Tagen nach Anstieg des Hormons erreicht.

Erythropoietin beim gesunden Menschen

Die EPO-Konzentration im Serum ist beim Mann und bei der Frau gleich hoch (Rege et al., 1982), obwohl Männer einen höheren Hämatokrit haben (Jelkman und Wiedeman, 1989). Auch das Alter spielt für die EPO-Konzentration keine Rolle (Cotes und Brozovic, 1982; Hellebostad et al., 1988; Miller und Hovard, 1979, Mori et al., 1988). Mit tiefen Werten am Vormittag und Höchstwerten am Abend zeigt sich ein leichter zirkadianer Rhythmus (Cotes und Brozovic, 1982).

Während des Menstruationszyklus zeigt sich kein signifikanter Wechsel im Erythropoietin-Spiegel (Cotes, 1989; Cotes et al., 1983), bei Schwangeren jedoch steigt mit Beginn des zweiten Trimenon, parallel zum Anstieg des Blutvolumens (Verdünnungsanämie), auch der Erythropoietin-Spiegel um ein Mehrfaches an (Beguin et al., 1990; Cotes, 1989; Cotes und Brozovic, 1982; Widness et al., 1984).

Erythropoietin in der Therapie renaler Anämien

Die von Jacobs et al. und Lin et al. klonierte und isolierte cDNA konnte zur *in vitro* Produktion von rekombinantem humanen Erythropoietin (rhEPO) verwendet werden. Die in einen Expressionsvektor klonierte cDNA wurde in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) (Lin et al., 1985) transfektiert und exprimiert. Damit konnte nun erstmals rhEPO hergestellt werden (Jacobs et al. 1985 benutzten dazu die Nierenzellen des African green monkey). Das rekombinante EPO spielt heute in der Therapie renal bedingter Anämien eine grosse Rolle. Bei schweren Nierenerkrankungen (z.B. Glomerulonephritiden), sowie bei zystischen Erkrankungen der Niere fällt im terminalen Stadium mit dem Verschwinden des gesunden Nierengewebes die EPO-Produktion aus, wodurch diese Patienten in eine Anämie geraten. Da diese Patienten dialysepflichtig sind und die Erythrozyten im Dialysegerät zusätzlich noch einer mechanischen Hämolyse unterliegen, sind sie doppelt belastet und brauchten bisher in kurzen Zeitabständen Erythrozytentransfusionen, um den Verlust der roten Blutzellen auszugleichen. Abgesehen von der grossen Infektionsgefahr (Hepatitis, Zytomegalie, Retroviren) ist diese Behandlung auch deswegen problematisch, weil die Patienten Antikörper gegen die fremden Lymphozyten MHC-Antigene bilden und so eine spätere Nierentransplantation erschwert wird. Behandelt man die Anämie nicht, so versucht der Körper den Sauerstoffmangel im Gewebe durch eine erhöhte Auswurfleistung des

Herzens zu kompensieren, was früher oder später zum Kreislaufversagen führt. Seit der Verfügbarkeit des rhEPO kann die renale Anämie an ihrer Wurzel erfasst und bis zur Nierentransplantation medikamentös therapiert werden.

Zur Zeit wird rhEPO bei einigen anderen Erkrankungen getestet. Erste Erfolge wurden bei der durch Chemotherapie mit Zytostatika bedingten Anämie von Tumorpatienten erzielt. Speziell der negative Effekt des Medikaments Cisplatin scheint sich mit rhEPO teilweise kompensieren zu lassen. Eine spezielle Form der Anämie stellt die hyporegeneratorische, hypochrome Anämie des (meist frühgeborenen) Neugeborenen dar. Auch hier erhofft man sich in Zukunft Therapiemöglichkeiten mit rhEPO. Schliesslich denkt man auch daran, bei Patienten, denen eine grössere Operation mit entsprechendem Blutverlust bevorsteht, präoperativ die Blutproduktion durch rhEPO zu stimulieren, um sie dann mehrere Beutel Blut spenden zu lassen. Dieses Eigenblut kann dann bei der Operation zur autologen Bluttransfusion verwendet werden.

Methoden der Erythropoietin-Quantifizierung

Im Laufe der letzten Jahre wurden verschiedene Methoden zur Quantifizierung von Erythropoietin-Protein und -mRNA entwickelt. Gemessen wird EPO in IU (internationale Einheiten), wobei 1IU Erythropoietin als die Menge definiert wurde, welche die Erythropoese gleich stark stimuliert wie dies im Tierexperiment 5µmol Cobalt tun.

Die zu Beginn der 70er Jahre aufgestellte Definition wurde vor kurzem von der WHO auf das nun erhältliche rekombinante EPO bezogen. Nach der Definition der WHO ist 1mg rhEPO gleich 130'000IU. Im Prinzip kann EPO auf verschiedene Arten nachgewiesen werden. Zunächst kann die Menge *EPO-mRNA*, danach das *EPO-Protein* selbst und zuletzt die *Wirkung* des EPO (Anstieg des Hämatokrits bzw. der Anstieg der Retikulozytenzahl) bestimmt werden.

In vivo und *in vitro* Bioassay

Bis zur Strukturaufklärung von EPO, also noch in den 80er Jahren, waren die Bioassays der wichtigste EPO-Nachweis. Beim *in vivo*-Bioassay wurde Versuchstieren, deren eigene Blutbildung durch übermässige Transfusionen oder im Anschluss an die mehrtägige Aussetzung einer hypobaren hypoxischen Umgebung zum Stillstand gebracht worden war, die zu testenden Substanzen injiziert. Die erythropoietische Potenz des jeweiligen Stoffes wurde mittels des Einbaus von radioaktiv markiertem Eisen in neugebildete Erythrozyten gemessen. Diese Methode ist zwar sehr genau und EPO-spezifisch, jedoch ist sie mit einer unteren Nachweisgrenze von mindestens 25mU Erythropoietin in nicht konzentrierten Plasma- und Urinproben wenig sensitiv (normaler Plasma Spiegel ca 8 mU/ml).

Beim *in vitro*-Bioassay wurden Kulturen bestehend aus erythropoietischen Zellen der Maus (McLeod et al., 1974) oder Ratte (Bartley und Powsner, 1974; Goldwasser, 1975) bzw. fetale Leber-Zellen von 12-15 Tagen alten Mäusen (Stephenson et al., 1971) verwendet. Den Kulturen wurden diverse zu testende Substanzen zugegeben, um deren erythropoietische Aktivität zu bestimmen. Gemessen wurde dabei die Aufnahme radioaktiv markierten Eisens in Häm-Moleküle (Ward, 1967, Stephenson und Axel, 1971, Bartley und Posner, 1974), die c-Glycosaminaufnahme (Dukes et al., 1970), der Einbau von ³H-Thymidin in DNA (Frederickson et al., 1977) oder die CFU-E Cluster-Bildung (McLeod et al., 1974). Die Nachweisgrenze des *in vitro* Bioassay liegt mit 1-5mU/ml Serum deutlich niedriger als diejenige des *in-vivo* Bioassays, ausserdem ist er billiger, schneller und benötigt viel weniger Material. Von Nachteil ist die Tatsache, dass Serumbestandteile für die Kulturen oft toxisch sind und die zu testenden Substanzen deswegen durch Dialyse von Toxinen befreit werden müssen. Dies kann sehr aufwendig sein. Mit *in vivo* Bioassays wurde eine EPO-Konzentration im normalen humanen Serum von 5-18mU/ml mit Durchschnittswerten um 8mU/ml (Erslev et al., 1979) gemessen, was mit den später im Radioimmunoassay (RIA) gemessenen Werten weitgehend übereinstimmt. Die mit den *in vitro* Bioassays gemessenen Werte lagen um 10 bis 100mU/ml, also wesentlich höher (De Klerk et al., 1978; Kristal et al., 1981).

Radio immuno assay (RIA)

Während sich mit den bisher genannten Messmethoden Aussagen über die biologische Aktivität des Erythropoietins machen liessen, konnte man, sobald Erythropoietin in gereinigter Form erhältlich war, erstmals quantitative Aussagen über das Protein selbst (auch inaktives) machen. Mit Hilfe des Radio Immuno Assay (RIA) kann man Erythropoietin mit wesentlich kleinerem Aufwand und auch genauer messen.

Um Erythropoietin im RIA zu messen, braucht man einerseits radioaktiv markiertes EPO und andererseits einen Antikörper (AK) gegen EPO. Wie Abbildung 3 zeigt, erstellt man 2 Röhrchen mit der identischen Menge an radioaktiv markiertem EPO (A). In eines der Röhrchen wird dann die zu quantifizierende Probe zugegeben und gemischt (B). Danach gibt man beiden Ansätzen EPO-Antikörper zu, die sich sofort an das EPO binden (C). Schliesslich wird ein weiterer Antikörper zugegeben, der seinerseits die EPO-AK bindet und agglutiniert. Das nicht gebundene EPO wird aus den Röhrchen entfernt und zurück bleibt ein Klumpen agglutiniertes EPO-AK-Komplexe (D). Im Kontrollansatz befand sich nur radioaktiv markiertes EPO und somit haben alle AK auch solches gebunden. In der zu untersuchenden Probe aber hat der AK sowohl markiertes wie auch nicht-markiertes EPO gebunden und dieses Röhrchen ist somit weniger radioaktiv. Aus dem Verhältnis der Radioaktivität der Ansätze kann nun die EPO-Konzentration in der Probe berechnet werden. Das Verdrängungsverhältnis ist aber nicht linear sondern logarithmisch. Aus diesem Grund muss vor jedem RIA eine Eichkurve mit bekannten Konzentrationen von markiertem und nicht markiertem EPO sowie AK erstellt werden.

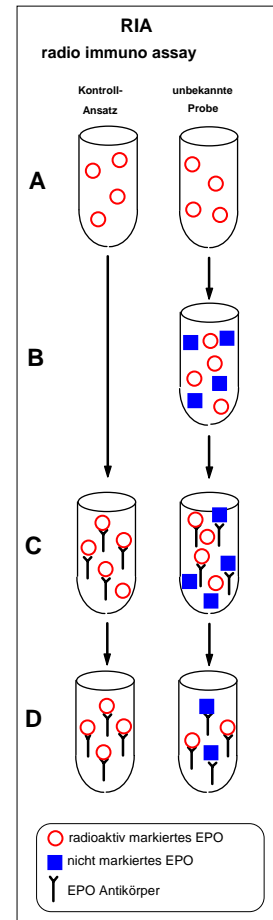


Abb 4 EPO-RIA

Ribonuclease Protection Assay

Der RNase protection assay ist ein qualitativer und quantitativer Test zum Nachweis von mRNA und basiert auf dem Prinzip, dass die RNase nur einzelsträngige RNA verdauen kann. Gelingt es die gesuchte RNA mit einem komplementären Fragment zu verbinden und so vor dem Verdau zu schützen, dann kann man Sie nach einer Inkubation mit RNase gelelektrophoretisch nachweisen.

Mit Hilfe der PCR erstellten Ratcliffe et al. 1990 zuerst eine zur EPO-DNA komplementäre cDNA, die dann isoliert und in einen pSP64-Vector kloniert wurde. Mit diesem rekombinanten Plasmid wurde dann *in vitro* mit Hilfe einer RNA-Polymerase radioaktiv markierte cRNA hergestellt.

Die cRNA wird mit der aus den Zellen isolierten RNA inkubiert und bindet spezifisch an die EPO-mRNA. Nach ca. 30 Minuten wird dem Reaktionsansatz RNAase zugegeben, welche einzelsträngige RNA verdaut jedoch doppelsträngige RNA verschont. Durch eine gelelektrophoretische Auftrennung des Ansatzes und dem radiografischen Nachweis der Radioaktivität erkennt man, ob und wieviel mRNA im Ausgangsmaterial vorhanden war. Ratcliffe et al. (1990) und Tan et al. (1991) haben so bei der Ratte die sauerstoffbedingte EPO-mRNA-Modulation in der isoliert perfundierten Niere nachgewiesen. Der RNAase protection assay eignet sich zum Nachweis von mRNA, vorausgesetzt es stehen grössere Mengen RNA zur Verfügung.

RT-PCR des hEPO

Die *Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction)*, kurz **PCR**, ist heute die empfindlichste Methode für den Nachweis minimalster Mengen einer bestimmten DNA. Die PCR dient der *in vitro* Replikation einer frei wählbaren DNA-Sequenz. Sie wurde 1974 von Khorana und Panet vorgestellt (Khorana und Panet, 1974; Mullis und Faloona, 1987). Mit der PCR kann man nur *DNA* amplifizieren, um *RNA* nachzuweisen muss von der RNA-Vorlage zuerst eine DNA-Kopie (cDNA) erstellt werden. Diesen Vorgang nennt man *reverse Transkription (RT)*. Die Kombination einer *reversen Transkription* und einer *Polymerase Ketten Reaktion* ist die **RT-PCR**.

Zur Transkription einer RNA in cDNA wird die RNA-Vorlage mit Nukleotiden, Puffer, einem Primer und einem Enzym (reverse-transcription Polymerase) für 15-60 Min. inkubiert. Ein Primer ist eine kurze DNA-Sequenz, die zu einem Bereich der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz komplementär ist und so an diesen Bereich binden kann. Dies wird benötigt, da eine Polymerase nicht von selbst beginnen kann (priming), DNA (oder hier RNA) zu kopieren, sondern immer eine nur bestehende DNA (RNA) verlängern kann. Der Primer ist ca. 20 Nukleotide lang und kann bei der reversen Transkription entweder spezifisch oder unspezifisch sein. Ein unspezifischer Primer ist eine Nukleotid-Sequenz, welche komplementär zu einer in vielen RNA's zu findenden Sequenz ist, während ein spezifischer Primer komplementär zu einem ausgesuchten Bereich eines ganz bestimmten Gens ist. Für diese Arbeit wurde ein unspezifischer Primer und zwar eine Oligo-dT Sequenz, verwendet. Diese kurze dT (desoxy-Thymidin) Sequenz ist komplementär zum poly-dA-Schwanz (dA steht für desoxy-Adenin), der Teil einer jeden mRNA ist. Bei der Verwendung eines Oligo-dT Primers werden während der reversen Transkription *alle* vorhandene mRNA's (von vielen verschiedenen Genen) in DNA umgeschrieben.

Die durch die reverse Transkription gewonnene cDNA (Transkriptionen der in der RT-Reaktion vorhandenen mRNA Moleküle) wird als Ausgangsmaterial verwendet, um durch vielfaches Kopieren bis zu 10^9 Kopien *einer ganz bestimmten* cDNA zu erstellen.

Um aus den tausenden von cDNA Molekülen nur das gesuchte zu amplifizieren, gibt man der cDNA Desoxy-Nukleotide, Puffer, eine DNA-Polymerase und *2 für das gesuchte Gen spezifische Primer* zu und unterstellt diesen Ansatz einem trizyklischen Temperaturwechsel.

Als erstes wird bei 94°C die DNA-Doppelhelix (im ersten Zyklus RNA-DNA Helix) denaturiert. Bei einer Temperatur zwischen 55 und 65°C binden die Primer an die nun einzelsträngige DNA und werden schliesslich bei 72/73°C von der Taq-DNA-Polymerase verlängert. Das Ansetzen der Primer an die DNA (annealing) muss bei möglichst hohen Temperaturen erfolgen, um die Spezifität zu erhöhen. Aus diesem Grunde und weil die DNA-Helix erst bei 94°C vollständig denaturiert, verwendet man die DNA-Polymerase des Bakteriums *thermus aquatius* (kurz Taq). Dieses Bakterium lebt in heissen Quellen und seine Enzyme überstehen diese hohen Temperaturen. Die drei jeweils ca. einminütigen Phasen werden je nach Aufgabenstellung 20 bis 50 mal wiederholt. (s. Abb.5)

Prozess	Temperatur
DNA-Denaturierung	94°C
Primer-Annealing	55-65°C
Primer-Extension	72/73°C

Nach erfolgter PCR wird die so gewonnene DNA mit Hilfe der Gelelektrophorese (s. Abb.6) nachgewiesen. Im winzigen Agarose-Netz des Gels laufen nach Anschliessen einer Spannung kurze DNA-Fragmente schneller als längere (die DNA ist negativ geladen, läuft also in Richtung Anode). Lässt man eine Kombination von DNA-Fragmenten bekannter Länge (ein 'Marker') in einer zweiten Bahn neben der untersuchten Probe mitlaufen, so kann man die Länge der in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente ablesen. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidium-Bromid zugegeben. Dieser Stoff bindet an die DNA und wird durch UV-Licht zum Leuchten gebracht. Das Gel kann dann mit Hilfe eines UV-Filters fotografiert werden (Beispiele s. Fotos ab Seite 28).

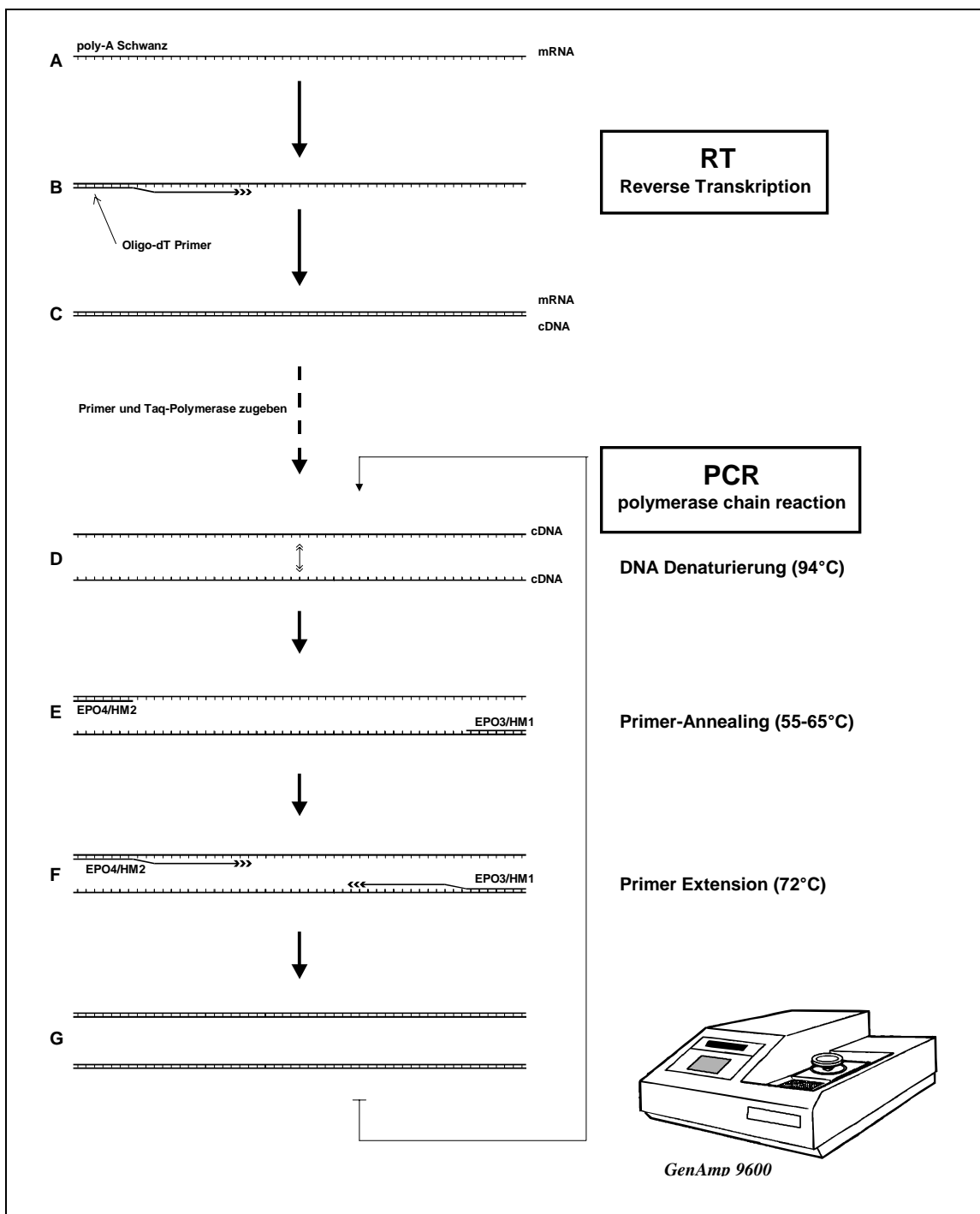


Abbildung 5: Schema der EPO RT-PCR. Während der RT befinden sich im Ansatz nur die RNA, der oligo-dT Primer und die reverse Transkriptase (+Puffer). Der Ansatz wird je nach Enzym für 15-60 min bei 37-42°C gehalten. Danach hat die reverse Transkriptase den auf der RNA angesetzten Primer zu einem vollständigen, zur RNA komplementären, Strang verlängert (A-C). Nun werden die 2 spezifische Primer und die Taq-Polymerase zugegeben. Der Doppelstrang wird denaturiert und 2 neue komplementär-Stränge werden erstellt (D-G). Danach beginnt der 3-Temperaturen-Zyklus wieder vorne. Bei 30 Zyklen entstehen so theoretisch 10^9 Kopien.

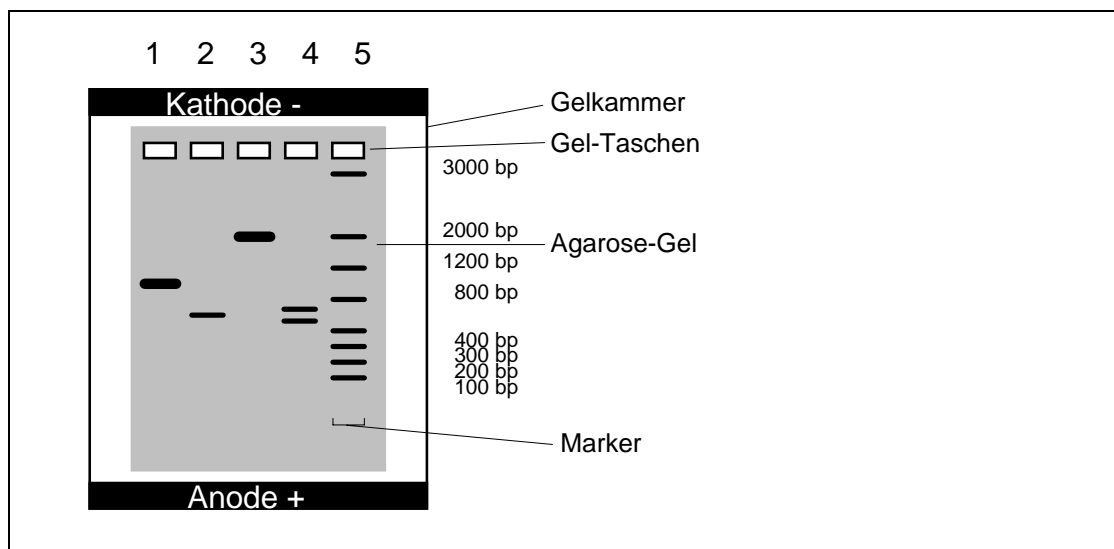


Abbildung 6: Beispiel einer Agarose Gel-Elektrophorese. Die in die Geltaschen eingefüllte DNA wandert nach An-schließen einer Spannung von der Kathode in Richtung Anode. Anhand des in Spur 5 mitlaufenden Markers lässt sich die Grösse der DNA-Fragmente in den Spuren 1 bis 4 feststellen. Die Intensität der Bande ist der DNA-Menge proportional. In Spur 4 sind 2 Banden der Grösse 500bp und 650 bp erkennbar. Zu sehen sind die Banden nur unter UV-Licht, welches das an die DNA gebundene Ethidium-Bromid zum Leuchten bringt

Mit der RT-PCR lässt sich somit nachweisen, dass eine gesuchte RNA in der getesteten Substanz zu finden ist. Will man jedoch quantitative Aussagen machen, so muss man zur *kompetitiven RT-PCR* greifen.

Kompetitive RT-PCR des hEPO

Bei der *kompetitiven RT-PCR* wird zusätzlich zur nachzuweisenden RNA ein *externer Standard* (ES), *in vitro* hergestellte RNA (cRNA) von genau *bekannter Konzentration* zur Amplifikation gebracht. Dieser *externe Standard* muss die gleichen Primerbindungsstellen haben wie die wildtyp-RNA (wt), darf jedoch nicht von gleicher Länge sein, damit sich die beiden DNA's in der Gel-Elektrophorese durch ihre Länge unterscheiden. Für die vorliegende Arbeit wurde aus der cDNA des Erythropoietingens ein Fragment von 102bp entfernt und dann von dieser gekürzten cDNA *in vitro* cRNA hergestellt.

Die beiden Typen von RNA (wt und ES) werden während der reversen Transkription (RT) in cDNA kopiert und konkurrieren in der PCR. Da die Konzentration des *externen Standards* bekannt ist, kann die Konzentration der zweiten RNA anhand der Intensität der bei der Gelelektrophorese erkennbaren Banden festgestellt werden. Die Konzentrationen sind dort identisch, wo die beiden Banden gleiche Intensität haben. Um einen grösseren Bereich testen zu können, wird von der *in vitro* transkribierten RNA eine Verdünnungsreihe erstellt.

Abbildung 7 zeigt das erwartete Ergebnis einer kompetitiven RT-PCR.

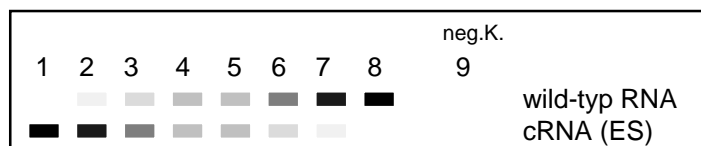


Abbildung 7: Kompetitive RT-PCR.

Der kürzere externe Standard läuft in der Gel-Elektrophorese schneller und findet sich somit unten, die wildtyp RNA oben. Die Konzentration der cRNA nimmt von links nach rechts ab, dementsprechend sinkt auch die Bandenintensität. Die obere Bande wird ständig intensiver, da die in allen Ansätzen in gleicher Menge vorhandene wildtyp RNA in den weiter rechts liegenden Ansätzen weniger konkurriert und somit stärker amplifiziert wird. Auf diese Weise ist es möglich, sehr genau die Konzentration, ja sogar die Anzahl mRNA-Moleküle, in beliebigen Zellen zu bestimmen. In obiger Abbildung entsprechen die Spuren 4/5 der zu bestimmenden Konzentration.

2. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Methode zum quantitativen Nachweis der mRNA des Hormons Erythropoietin beim Menschen. Mit der Methode sollten auch geringste Mengen (5-10 Femtogramm) der mRNA nachweisbar sein, damit verschiedene menschliche Gewebetypen auf eine eventuelle EPO-mRNA-Produktion hin untersucht werden können.

Die neu etablierte Methode wurde daraufhin dazu verwendet, in menschlichem Hirngewebe EPO-mRNA nachzuweisen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Eukaryote Zellen

Hep G2

1987 wurden eine Reihe von Zellen von Goldberg und Mitarbeitern in Bezug auf regulierte EPO-Produktion untersucht und dabei die HepG2 und Hep3B Zellen entdeckt. Wichtig ist die Tatsache, dass diese Zellen nicht nur EPO produzieren, sondern dass diese Produktion sauerstoffabhängig geschieht. Sie bilden also, wie die gesunde Niere, beim Absinken des Sauerstoffpartialdrucks (PO_2) der Umgebung vermehrt EPO und können als Modell im Labor verwendet werden (Goldberg et al., 1987).

Die HepG2 - Zellen stammen von einem 15jährigen kaukasischen Patienten, der sich 1975 (in Argentinien) einer Lobektomie unterziehen musste. Die Zelle wurde von Anden et al. (1979) erstmals beschrieben. Hep G2-Zellen produzieren unter anderem auch Albumin und α -Fetoprotein, morphologisch entsprechen sie Leberparenchymzellen.

Die Zellen werden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose, HEM, 1 mM Na-Pyruvat, 2mM L-Glutamat, 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin kultiviert.

3.1.2. Prokaryote Zellen

HB101

Für die Klonierung des externen Standards wurde durchwegs der Bakterienstamm HB101 benutzt. HB101 ist ein Derivat von *Escherichia coli* K12 (Roulland-Dussoix und Boyer, 1969).

Die Bakterien wurden in LB-Medium (10g NaCl; 10g Caseinhydrolysat; 5g Hefeextrakt auf 1l Wasser) bzw. auf LB-Agar (zusätzlich 10g Agar) bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden zur Belüftung geschüttelt. Stammkulturen wurden auf LB-Agarplatten bei 4°C aufbewahrt, bzw. längerfristig als Glycerinkulturen (180 μ l Glycerin auf 820 μ l Bakteriensuspension) bei -70°C gelagert.

Rekombinante Bakterien wurden zur Selektion in LB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten mit einem Zusatz von Ampicillin (100 μ g/ml) kultiviert (Selektionsmedium bzw. -agar).

3.1.3. Plasmide

Plasmide sind natürlich vorkommende, ringförmige DNA-Moleküle (1000 - 30000bp), die in Bakterien als zusätzliche Chromosomen fungieren. Auf Plasmiden lokalisierte Gene kodieren für Proteine, die unter normalen Umständen für das Bakterium nicht lebenswichtig sind. Als Beispiel wären Antibiotika-Resistenz-Gene zu nennen. Jedes Plasmid muss einen sog. origin of replication (ori) besitzen, um in einer Wirtszelle mit der wirtseigenen DNA amplifiziert werden zu können. Das Plasmid **pe49f** enthält die komplementäre DNA (cDNA) des humanen Erythropoietin-Gens (1,2kb lang).

Vektoren zur Klonierung des externen Standards

Ein Promotor ist eine spezifische Bindungsstelle für Polymerasen. An dieser Stelle setzt das Enzym an und beginnt die Transkription des Gens. Ziel der Klonierungsarbeiten ist es, das humane Erythropoietin-Gen hinter einen Promotor in ein Plasmid zu setzen, um damit *in vitro* mRNA des Erythropoietin-Gens zu erstellen. Nach erfolgreicher Bakterien-Transformation mit dem rekombinierten Plasmid kann dieses in beliebiger Menge gewonnen werden. Um das Wachstum anderer Bakterien zu verhindern, verfügen kommerziell erhältliche Plasmide über ein Resistenz-Gen gegen ein Antibiotikum. Die Zugabe dieses Antibiotikums (hier Ampicillin)

verhindert das Wachstum aller nicht transformierten und somit nicht ampicillinresistenten Bakterien im Kulturmedium.

pT7/T3 α -18

Der Vektor ist ein Produkt der Firma GIBCO BRL. Das Plasmid *pT7/T3 α -18* besitzt 2 Promotoren, T3 und T7, die zur *in vitro* Transkription benützt werden können. Sie flankieren eine Multiple Cloning Site (MCS). Bei der MCS handelt es sich um eine Region, die auf 50 bp 14 verschiedene Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen besitzt, die sonst im Plasmid nirgends vorkommen. Das Vorhandensein der MCS erleichtert das Einfügen eines DNA Fragments wesentlich.

pSP64 Poly(A)

Der Vektor *pSP64 Poly(A)* stammt von der Firma Promega. Dieser besitzt einen Promotor für das Enzym SP6 und eine *poly-A Sequenz*. Verwendet man dieses Plasmid als Template für die *in vitro* Transkription, so wird der cRNA ein poly-A-Schwanz angehängt. Die cRNA kann dann in der RT-Reaktion mit Hilfe eines oligo-dT-Primers reverse transkribiert werden (s. Einführung, Seite 7).

3.1.4. PCR-Primer

Die DNA-Polymerase katalysiert die schrittweise Addition von Desoxyribonukleotiden (dNTP's) an das 3'-OH Ende eines bereits vorhandenen DNA-Stranges. Da nur eine Addition nicht aber ein Neubeginn möglich ist, benötigt das Enzym einen sogenannten *Primer* mit einer freien 3'-OH Gruppe. Da bei der PCR-Reaktion jeweils sowohl das Template sowie auch sein Komplementärstrang dupliziert werden müssen, werden ein upstream- und ein downstream-Primer benötigt (s. Einleitung).

Die Primer wurden am Zoologischen Institut der Universität Zürich synthetisch in automatisiertem Verfahren nach der sog. Phosphoramid-Technik hergestellt.

Als unspezifischer Primer für die *in vitro* Transkription und reverse Transkription wurde ein Oligo-dT Primer: (5'-dT₍₁₅₎-3') von Promega verwendet.

3.1.5. Enzyme

RT-Polymerase:	AMV Polymerase (Promega)
Taq-Polymerase:	SuperTaq (Stehelin Basel)
Restriktionsendonukleasen:	Sca I (Pharmacia) BamH I, EcoR I, Hind III (Promega) Apa I, Sac I, Xba I (Boehringer-Mannheim) Pvu II (Stratagene)
Phosphatase und T4-Ligase:	beide (Boehringer-Mannheim)

3.2. Methoden

3.2.1. Präparation von DNA und RNA

3.2.1.1. Phenolextraktion

Die gelöste DNA wird mit gleichem Volumen Phenol (äquibriert gegen TE-Puffer [Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM]) versetzt und kräftig gemischt. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation (5 Minuten, 5000 rpm) wird die wässrige Phase in ein frisches Eppendorf-Cup überführt (Interphase mit denaturierten Proteinen nicht tangieren). Mit Chloroform wird die wässrige Phase mehrfach ausgeschüttelt, um Phenolreste zu entfernen.

3.2.1.2. Ethanol-Fällung

Zur weiteren Reinigung und Konzentrierung der DNA wird diese mit EtOH gefällt.

Die gelöste DNA wird mit 1/10 Volumen Ammonium-Acetat (7.5M) und 2.5fachem Volumen kaltem Ethanol (94%) vermischt und mindestens 30 Minuten bei -20°C gelagert. Danach wird die DNA bei 12000 rpm während 30 Minuten präzipitiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet mit eiskaltem Ethanol (80%) gewaschen (5 Minuten, 12000 rpm). Die in der Speed-Vac getrocknete DNA wird dann in zweifach destilliertem Wasser (Aqua Bid.) aufgenommen.

3.2.1.3. Gewinnung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde mit der modifizierten und vereinfachten Methode von Birnboim und Dolby (1979) gewonnen.

Zuerst werden die Bakterienzellwände durch EDTA und die hypotone Glukoselösung partiell zerstört. Danach wird die gesamte bakterielle DNA durch Natriumhydroxid denaturiert. Durch Zugabe von Natriumacetat wird die Renaturierung der niedermolekularen, ringförmigen Plasmid-DNA ermöglicht, nicht aber der hochmolekularen chromosomalen DNA. Die beiden DNA-Typen lassen sich dann durch Zentrifugation trennen.

Vollständiges Protokoll:

1. Ernten von 1-1,5 ml Bakterienkultur (5 Min., 5000 rpm Eppendorf-Zentrifuge)
2. Zum Bakteriensediment 100 µl Lösung 1 zugeben.
gut mischen
30 Min. auf Eis
3. 200µl Lösung 2 zugeben
vorsichtig mischen
5 Min. auf Eis
4. 150 µl Lösung 3 zugeben
60 Min. auf Eis
5. 10 Minuten bei 12000 rpm zentrifugieren (Sedimentation von Proteinen und hochmolekularer DNA).
Überstand mit 2,5fachem Volumen Ethanol (94%) versetzen und für min. 60 Min. bei -20°C lagern. Zentrifugieren (30' bei 12000 rpm)
Überstand dekantieren
Waschen in 80% Ethanol
DNA trocknen (Speed-Vac)
Aufnahme in 50 µl Aqua Bid.

Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3
Glukose 50 mM Tris-HCl 25 mM, pH 8.0 EDTA 10 mM	NaOH 200 mM SDS 1% [w/v]	KAc 3M, HAc 5M pH 4,8

3.2.1.4. Gewinnung von Gesamt-RNA aus Zellen

RNA muss äusserst sorgfältig gehandhabt werden, damit es nicht durch die im Schweiss, Speichel etc. befindlichen RNasen kontaminiert und zerstört wird. Alle Experimente werden mit Handschuhen durchgeführt und das zur Präparation benutzte Material muss autoklaviert und steril sein. Die RNA wird nach der Präparation in Aqua Bid. DEPC (Diethyl-Pyrocbonat, 0.2% DEPC/H₂O, bei 37°C über Nacht schütteln, danach autoklavieren) aufgenommen. DEPC denaturiert RNAsen und wird selbst durch das Autoklavieren inaktiviert.

Die RNA-Extraktion aus den Zellen erfolgte mit RNAzol™ (BIOTEX LABORATORIES INC., TEXAS). Die genaue Zusammensetzung von RNAzol™ ist nicht bekannt.

Die in Kulturflaschen gewachsenen Zellen werden zuerst trypsinisiert (die Zellen lösen sich so vom Flaschenboden). Die Zellen werden nach dem Sedimentieren durch Zentrifugation mit PBS gewaschen und ausgezählt, das Trypsin wird dann durch Zugabe von Serum inaktiviert. Die danach wieder sedimentierten Zellen werden dann in RNAzol gelöst (1ml pro 10⁶ Zellen), wobei man die Zellen für min. 2-3 Minuten gut schütteln muss um sicherzustellen, dass wirklich alle Zellen lysiert wurden.

Protokoll RNA-Präparation

1. Zellen gewinnen
Kultur trypsinisieren.
Serum den Zellen zugeben und in zentrifugierbaren Behälter überführen.
Zentrifugieren (~2000 rpm), Überstand abkantieren
2. Zellen auflösen.
RNAzol™ zugeben. - 2ml / 10⁷ Zellen.

Die weiteren Schritte werden bei 4°C durchgeführt.

3. RNA extrahieren.
+0.2ml Chloroform / 2 ml Homogenat
15 sec. vortexen.
5 min auf Eis.

15 min bei 12900 rpm zentrifugieren (**4°C**)

Wässrige Phase (Überstand) in neue Eppendorf-Cup's überführen

4. RNA fällen.
Zur wässrigen Phase gleiche Menge an Isopropanol geben.
15 min bei 12900 rpm zentrifugieren (**4°C**)
Überstand abkantieren

Um die RNA in Enzym-Reaktionen benutzen zu können, muss sie speziell rein sein. Deswegen wird eine weitere Fällung angeschlossen.

5. Zweite Fällung.
RNA Pellet
+480 µl Aqua Bid.
+ 20 µl NaCl 5M (=0.2M Endkonzentration)
+500 µl Isopropanol

mischen
1h bei -20°C stehenlassen.

15 min bei 12900 rpm zentrifugieren (**4°C**)

Die weiteren Schritte können bei Zimmer-Temperatur durchgeführt werden.

6. RNA waschen.
75% Ethanol zum Pellet zugeben (min. 0.8 ml EtOH / 50-100µg RNA)
vortexen
8 min bei 9800 rpm zentrifugieren (**4-20°C**)
7. RNA Pellet trocknen.
in Speed-Vac 10 min.

in 30µl Aqua Bid. + DEPC lösen.

3.2.1.5. Gewinnung von RNA aus menschlichem Gewebe

Menschliches Hirngewebe wurde von 6 Patienten (2 Frauen und 4 Männern) gewonnen. Sie alle haben sich wegen einer medikamentös nicht einstellbaren Temporallappen-Epilepsie einer selektiven Amygdala-Parahippocampektomie unterziehen müssen. Biopsien von Temporal-Cortex, Amygdala und Hippocampus wurden gleich nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren.

Die RNA-Extraktion aus dem Gewebe erfolgte wie oben bei den Zellen beschrieben, wobei 2ml RNeasyTM pro 100 mg Gewebe verwendet wurden.

3.2.2. Klonierungsarbeiten

3.2.2.1. Präparative Spaltung von Plasmid-DNA

Zum Aufbau des externen Standards bzw. seiner Vorstufe war es notwendig, bestehende Plasmide an ganz bestimmten Stellen aufzuschneiden und entweder neue Fragmente einzusetzen, oder bestimmte Fragmente herauszuschneiden. Damit eine Verknüpfung möglich wird, müssen Vektor und Insert kompatible Enden haben. Man erreicht dies, indem die Fragmente entweder mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten werden, oder aber mit solchen, die gleichartige DNA-Enden erzeugen.

Ein Reaktionsansatz von 300 µl aus gelöster DNA, dem vom Lieferanten der Restriktionsendonuklease gelieferten Puffer in richtiger Konzentration und dem Enzym wird für min. 2h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Der Erfolg der Spaltung wird durch eine elektrophoretische Auftrennung eines Aliquots des Spaltungsansatzes überprüft. Bei noch unvollständiger Spaltung wird die Inkubationszeit nach nochmaliger Enzymzugabe verlängert.

Die DNA kann durch eine Inkubation mit RNase (10ng/µl, 10', 37°C) von RNA-Verunreinigungen befreit werden.

3.2.2.2. Analytische Spaltung

Restriktionsendonukleasen werden auch zur Charakterisierung von rekombinanter DNA benutzt. Bei bekannter Nukleotid-Sequenz einer DNA kennt man auch die Länge der zu erwartenden DNA-Fragmente nach Inkubation mit einer bestimmten Restriktionsendonuklease. Für analytische Spaltungen werden Ansätze zu 20µl (2µl Puffer, 17µl DNA und Aqua Bid., 1µl Enzym) verwendet. Diese werden ca. 1h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Auch hier werden RNA-Verunreinigungen mit RNase (1µl, 5', 37°C) beseitigt.

3.2.2.3. Linearisierende Spaltung

Um ein Plasmid mit einer Polymerase kopieren zu können, muss das Plasmid zuerst in linearer Form vorliegen. Dies erreicht man, indem man das Plasmid an einer Stelle aufspaltet. Das verwendete Enzym sollte dabei so gewählt werden, dass die Schnittstelle ausserhalb des benötigten Bereichs liegt. Das Vorgehen entspricht dem der präparativen Spaltung.

3.2.2.4. Gel-Elektrophorese

Da in wässriger Lösung die DNA eine negative Ladung trägt, kann sie in einem elektrischen Feld proportional zum Logarithmus ihrer Masse aufgetrennt werden. DNA-Fragmente ab 100 bp werden in 1%igen Agarose-Gelen aufgetrennt, kleinere Fragmente mit Vorteil in Polyacrylamid-Gelen.

Agarose-Gelelektrophorese

Agarose wird in TAE-Puffer (40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA) durch Erhitzen geschmolzen und in horizontale Gele gegossen. In diesen Gelen werden die DNA-Proben, gemischt mit Ladepuffer (ca 1/5 Volumen [50% Glycerin; 50mM EDTA; 0.005% Bromphenolblau]), bei einer Stromstärke von 60-120 mA aufgetrennt. Als Laufpuffer wird wiederum TAE-Puffer benutzt. Die Gele werden in Ethidiumbromid ca. 10 Minuten lang gefärbt und unter UV Licht (254nm) fotografiert (Polaroid SW-Film Land Type 667, Orangefilter 23A).

Die Banden werden anhand eines mitgelaufenen Grössenstandards beurteilt. Die folgenden Marker wurden verwendet: λ-DNA EcoR I, Hind III (Fragmentgrössen: 21227, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 974, 831, 564, 125); sowie ein 100 bp-Marker zur Beurteilung von PCR - Ergebnissen (Fragmentgrössen: 1000bp bis 100bp in 100bp Schritten).

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Fragmente von 30-500 bp werden auf 7,5%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Aus 2.5 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (40% [w/v] Acrylamid; 1,2% [w/v] Bisacrylamid); 1,5 ml 10fach E-Puffer (400 mM Tris-HCL, pH 8,3; 200 mM Na-Acetat; 20 mM EDTA); 9.9 ml Aqua Bid.; 750 µl 1% (w/V) AMPS und 17 µl TEMED werden vertikale Gele gegossen. Die DNA-Proben werden, wie auch bei den Agarose-Gelen, mit Bromphenolblau versetzt und dann bei 150 V aufgetrennt. Als Laufpuffer wird 1fach E-Puffer benutzt. Auch diese Gele werden im Ethidiumbromid-Bad gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

3.2.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten

Die durch Restriktionsendonukleasen erhaltenen Plasmid-Fragmente, die für weitere Klonierungsschritte benötigt werden, müssen von den nicht benötigten DNA-Fragmenten getrennt werden. Diese Trennung erfolgt elektrophoretisch, indem man den Spaltungsansatz in einem präparativen Gel auftrennt und die gewünschten Banden nach der Färbung im Ethidiumbromid-Bad unter UV-Licht (366 nm) ausschneidet. Die ausgeschnittenen Gelstücke werden dann mit etwas Agarose-Puffer in Dialyseschläuche gelegt, deren Enden mit Klammern verschlossen werden. Diese 'DNA-Bonbons' werden dann während 30-60 Minuten in einer Gelkammer bei einer Spannung von ca. 120V gehalten, wodurch die DNA aus den Gel-

Streifen austritt und sich im Puffer sammelt. Die im Puffer befindliche DNA wird dann durch Phenolextraktion und Ethanol-Fällung gereinigt.

3.2.2.6. Phosphatase-Behandlung von DNA-Fragmenten

Wenn ein Vektor mit einer einzigen Restriktionsendonuklease geschnitten wird (wobei kompatible Enden entstehen), oder aber befürchtet wird, dass trotz zweier verschiedener Restriktionsendonukleasen sich der Vektor ohne Insert schliessen könnte, kann man mit Hilfe von Phosphatasen die 5'-Phosphor-Gruppe entfernen. So kann eine intramolekulare Ligation stark vermindert werden.

Zur Diphosphorisierung erstellt man einen Ansatz aus gefällter Vektor-DNA, dem vom Hersteller gelieferten Puffer und der Phosphatase. Dieser Ansatz wird dann während ca. 2h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

3.2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die wie oben beschrieben präparierten DNA-Fragmente werden schliesslich im Ligationsansatz zu einem neuen Plasmid rekombiniert. Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Veresterung der 3' und 5' Enden der beiden Fragmente unter ATP-Verbrauch.

Die 50µl des Ligationsansatzes setzen sich zusammen aus dem Vektor und dem Insert im Verhältnis 1:3 (bestimmt durch die Farbintensität der gelelektrophoretisch aufgetrennten Fragmente unter Berücksichtigung der grössenbedingt unterschiedlichen Anfärbbarkeit) sowie dem vom Hersteller gelieferten Puffer in der benötigten Konzentration, ATP und der T4-Ligase.

Der Ansatz wird über Nacht bei 4°C gehalten, damit sich bei niedriger Molekularbewegung die H-Brücken ausbilden können und dann nach erneuter ATP- und Ligase-Zugabe für 4 Stunden bei 37°C gehalten. Danach erfolgt eine EtOH-Fällung und die Aufnahme der DNA in 20µl Aqua Bid.

In einem Ansatz ohne Insert, der sogenannten Vektorkontrolle wird kontrolliert, ob eine Vektorligation erfolgreich verhindert werden konnte. Zu diesem Zweck wird auch die Vektorkontrolle transformiert, wobei auf der Kontrollplatte keine Bakterienkolonien wachsen dürfen.

3.2.2.8. Transformation von Bakterien

Die rekombinierten Plasmide müssen nun in geeignete Bakterien eingebracht werden. Diesen Vorgang nennt man *Transformation von Bakterien*. Unter natürlichen Bedingungen nehmen Bakterien kaum DNA auf, deshalb müssen die sie zuerst *kompetent* gemacht werden. Dies geschieht zB. mit CaCl₂ (Cohen et al., 1972; Cohen et al., 1973; Dagert und Ehrlich, 1979). Das in der Ketodesoxyoctonsäure der Lipopolysaccharide der Bakterien-Membranen eingelagerte Mg²⁺ wird durch das Ca²⁺ des CaCl₂ ersetzt. Die so destabilisierten Bakterienwände sind für DNA wesentlich durchlässiger, so dass die rekombinanten Plasmide bei anschliessenden Temperaturschocks in die Bakterien eindringen können.

100 ml LB-Medium wird mit einer Übernachtskultur eines geeigneten Bakterienstammes (hier HB101) 1:100 angeimpft. Die Kultur wird bei 37°C inkubiert und geschüttelt, bis sie eine optische Dichte (OD_{600nm}) von 0.3 erreicht hat. Nach dem Abkühlen auf Eis werden die Bakterien sedimentiert (5000rpm, 7 min, 4°C, Sorvall GS4), danach folgt eine Inkubation auf Eis in 20 ml 100 mM CaCl₂ während 20 min. Einer erneuten Sedimentation folgen 60 Min. auf Eis in 0,5 ml 100 mM CaCl₂. Es ist darauf zu achten, dass die Bakterien nach der Sedimentation jeweils vollständig im CaCl₂ resuspendiert werden.

100µl dieser Bakteriensuspension werden nun mit 10µl der rekombinierten DNA gemischt und dann abwechselnd 15 min auf Eis und 5 min bei 37°C gehalten. Dies wird einmal wiederholt. Zuletzt wird die Kultur nochmals für 5 min auf Eis gehalten.

Das Transformationsgemisch wird nun in 1,5ml LB-Medium überführt und bei 37°C während 60 min geschüttelt. Schliesslich wird das Gemisch auf LB-Selektionsplatten (hier Ampicillin-haltiges LB-Medium) ausgestrichen. Nach 12-stündiger Inkubation der Platten bei 37°C können die gebildeten Bakterienkolonien gepickt, in LB-Selektionsmedium hochgeschüttelt und dann charakterisiert werden.

3.2.2.9. Charakterisierung rekombinanter Plasmide

Da bei einer *in vitro* Neukombination von DNA und der Transformation von Bakterien nicht nur Klone mit den gewünschten Eigenschaften entstehen, ist eine Charakterisierung der entstandenen Klone auf DNA-Ebene nötig.

Nach der Gewinnung der Plasmid-DNA wird diese mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und die Grösse der gelelektrophoretisch aufgetrennten Fragmente mit der erwarteten Fragmentgrösse verglichen. Zur vollständigen Charakterisierung gehören 3 Spaltungstypen.

1. Rückspaltung

Die Rückspaltung des Plasmids in den Vektor und das Insert zeigt, ob das Insert in den Vektor aufgenommen wurde, oder ob sich der Vektor ohne Insert wieder geschlossen hat. Man verwendet dazu die gleichen Schnittstellen.

2. Umgreifende Spaltung

Durch Spaltung des Vektors mit einem Restriktionsenzym, das im Vektor 2 Schnittstellen hat, im Insert jedoch keine, kann aus der Länge der gelelektrophoretisch erhaltenen Fragmente erkannt werden, ob das Insert mehrfach hintereinander in den Vektor aufgenommen wurde.

3. Orientierende Spaltung

Man wählt eine Schnittstelle im Vektor und eine (asymmetrisch) im Insert und schneidet das rekombinierte Plasmid mit den jeweiligen Enzymen. So kann man erkennen, ob das Insert mit der richtigen Orientierung (sense oder antisense) in den Vektor eingesetzt wurde (s. Abbildung 12, Seite 25).

3.2.3. Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA

Nukleinsäuren haben photometrisch ein Absorptionsmaximum bei kurzwelligem UV-Licht der Wellenlänge 260nm, Proteine ein solches bei 280nm. Diesen Umstand macht man sich bei der Quantifizierung von DNA und RNA zunutze.

Die Quantifizierung von RNA und DNA-Proben erfolgte im Photometer bei $\lambda=260\text{nm}$, wobei zur Bestimmung von Proteinverunreinigungen dieser Wert mit der optischen Dichte der gleichen Probe bei $\lambda=280\text{nm}$ verglichen wurde.

$$\frac{OD_{260}}{OD_{280}} \geq 1.9$$

Ab einem Wert von 1.9 ist die DNA oder RNA weitgehend proteinfrei. In der Praxis liegen die Werte bei aus Hep G2 extrahierter RNA zwischen 1.5 und 2.0.

Die Konzentration wird folgendermassen aus der optischen Dichte berechnet.

$$OD_{260} \cdot k \cdot D = \text{Konzentration in } \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

D ist der Verdünnungsfaktor und **k** eine Nukleotid-abhängige Konstante.

	k
RNA	0.04
DNA	0.05
single-strand DNA	0.02

3.2.4. In vitro Transkription von mRNA

Die *in vitro* Transkription wurde mit dem Promega-Kit (Riboprobe Gemini System II) durchgeführt.

Benötigte Reagenzien

5x SP6 Transkriptionsbuffer

200mM Tris HCL, pH 7.5; 30mM MgCl₂; 10mM spermidine; 50mM NaCl

Chloroform:Isoamylalcohol

24 Teile Chloroform mit 1 Teil Isoamylalcohol mischen

TE-Puffer

10mM Tris-HCl, pH 8.0 mit 1mM EDTA.

TE-gesättigtes Phenol/Chloroform

TE-Puffer und Phenol 1:1 mischen und die Trennung der Phasen abwarten. 1 Teil der unteren (Phenol) Phase mit 1 Teil Chloroform:Isoamylalcohol (24:1) mischen.

Protokoll der *in vitro* Transkription von cRNA

5x SP6 Transkriptionsbuffer (Promega)	20µl
100 mM DTT	10µl
rRNasin RNase Inhibitor 100u	100u
Ribonukleotide (ATP, GTP, CTP, UTP)	je 2.5mM
linearisierte Template DNA in Aqua Bid.	2-5µg
SP6 Polymerase	15-20u
Nuklease freies Wasser	auf 100µl auffüllen

Der Ansatz wird 120 Min. bei 37°C inkubiert.

Entfernung des Templates.

Zugabe von RQ1 RNase freier DNase (Promega), (1u/µg cDNA)
15 Min. bei 37°C inkubieren.

Phenolextraktion

+100µl TE gesättigtes Phenol/Chloroform
1 Min. mischen (Vortex)
5 Min. bei 12'000 rpm zentrifugieren.

Obere (wässrige) Phase in ein neues Eppendorf-Cup pipetieren und 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol zugeben.
1 Min. mischen (Vortex)
5 Min. bei 12'000 rpm zentrifugieren.

Obere wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Cup pipetieren

Ethanol-Fällung:

+0.5 Volumen 7.5M Ammonium Acetat
+2.5 Volumen Ethanol (100%)

mischen und für 30 Min. bei -20°C lagern.
5 Min. bei 12'000 rpm zentrifugieren und den Überstand vorsichtig abpipetieren.

Pellet in 1ml Ethanol (70%) waschen.

Pellet vakuum-trocknen und die RNA in 10-20µl Aqua Bid. resuspendieren.

Die Konzentration der RNA wird photometrisch bestimmt. Pro Reaktion können ca. 0.5-1µg cRNA gewonnen werden.

3.2.5. PCR und RT-PCRReverse Transkription (RT)

Mit der reversen Transkription wird aus RNA eine cDNA erstellt. Die cDNA wird für die PCR benötigt. Die dazu benötigten Reagenzien entstammen dem Promega RT-PCR Kit.

Die RNA wird für mindestens 5 Minuten bei 65°C inkubiert und danach auf Eis gehalten, um eventuelle tertiär-Strukturen aufzulösen. Die so vorbereitete RNA wird dann mit RT-Puffer, Desoxy-Nukleotiden, MgCl₂, RNasin (verhindert den Abbau der RNA durch einige der häufigsten RNAsen), oligo-dT Primer, A.Bid. sowie der RT-Polymerase in einem Eppendorf Cup für 1h bei 42°C und danach für 5 Minuten bei 75°C inkubiert. Die Inkubation bei 75°C dient der Inaktivierung der RNA-Polymerase.

Zur Inkubation bei 42°C wurde ein Wasserbad verwendet, zur Erhitzung auf 65°C und 75°C ein Ölheizblock.

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasen Kettenreaktion wurde mit Hilfe des programmierbaren Inkubators *GenApm 9600* der Firma *PERKIN ELMER CETUS* durchgeführt. In speziellen Tubes wird die DNA mit Taq-Polymerase Puffer, MgCl₂, Desoxy-Nukleotiden, den spezifischen up- und downsteam-Primern und Aqua Bid. inkubiert und auf 94°C erhitzt. Erst nach Erreichen dieser Temperatur wird die Promega AMV-Taq Polymerase (Promega) zugegeben und die PCR gestartet (Hot-start PCR, s. Seite 26).

3.2.6. Kompetitive RT-PCR

Bei der kompetitiven RT-PCR wird zusätzlich zur RNA, deren Konzentration bestimmt werden soll (wildtyp-RNA, wt-RNA), ein externer Standard mit amplifiziert.

Die Konzentrationen des externen Standards werden so titriert, dass sie die erwartete wt-RNA Konzentration umschliessen. Die Zyklenzahl muss einerseits hoch genug sein, um deutliche Banden zu erhalten, andererseits geht bei zu hohen Zyklenzahlen die Linearität verloren. Abbildung 7 auf Seite 9 zeigt das Schema einer optimal gelungenen RT-PCR. In der Spur, in der die Banden des externen Standards und der wt-RNA die gleicher Intensität haben, ist auch deren Konzentration gleich.

Negative Kontrollen sind unbedingt nötig, um die Echtheit der Ergebnisse beurteilen zu können und falsch positive Banden zu erkennen. Pro RT-PCR wurden jeweils 3 negative Kontrollen mitgeführt.

1. RNA wird ohne RT-Polymerase inkubiert; keine RT-Reaktion.

Dies ermöglicht, cDNA Verunreinigung eines oder mehrerer Reagentien im Laufe der RT oder der PCR zu erkennen.

2. RT-Reaktion ohne RNA; Template fehlt

Dies ermöglicht, es RNA oder cDNA Verunreinigung eines oder mehrerer Reagentien im Laufe der RT oder der PCR zu erkennen.

3. Einem PCR-Ansatz wird keine cDNA zugegeben.

Dies zeigt Verunreinigungen in den zur PCR verwendeten Reagentien.

Sind eine oder mehrere der negativen Kontrollen positiv, so kann man aufgrund der unterschiedlichen Kontrollen auf den Ursprung der Kontamination schliessen.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung des externen Standards pEPO64

Zur Klonierung des externen Standards wurde von der humanen EPO-cDNA ausgegangen, die aus dem Plasmid pe49f gewonnen wurde. Aus dem 1200bp langen cDNA Fragment wurde durch eine präparative Spaltung mit den Restriktions-Enzymen Kpn I (Pos. 1314) und Sac I (Pos. 3062) ein 744 bp langes Fragment herausgeschnitten.¹ Im Fragment sind die Exone 2 (teilweise) bis 5, sowie ein Teil des 3' untranslatierten Bereiches enthalten.

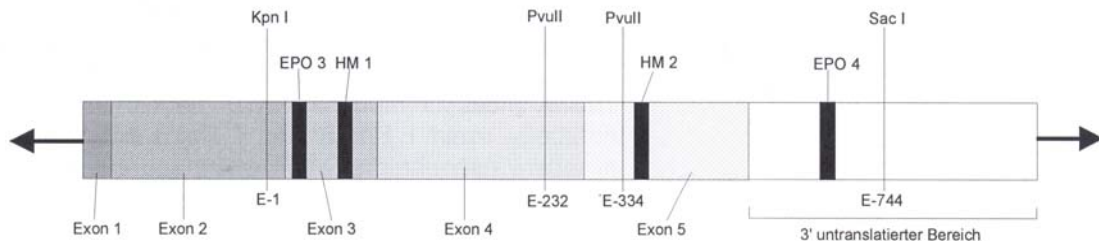


Abbildung 8: Ausschnitt aus dem hEPO-Gen-Insert im Plasmid pe49f. Die Grauschattierungen entsprechen den Exons 1 bis 5. Primer-Bindungsstellen sind schwarz.

Das hEPO-cDNA Fragment wurde in den Vektor pT7T3 α -18 ligiert, nachdem auch dieser durch eine präparative Spaltung mit den Enzymen Kpn I und Sac I geöffnet worden war. Danach wurde das Plasmid, das **pEPO7** bezeichnet wird, in den Bakterienstamm HB101 transformiert.

Der externe Standard muss kürzer oder länger sein als die wildtyp cDNA, damit er in der Gelelektrophorese von dieser unterschieden werden kann. Im Insert befinden sich an den Positionen 232 und 334 zwei Pvu II Schnittstellen. Deletiert man aus dem Insert mittels Pvu II diese 102bp, so erhält man den benötigten externen Standard. Da sich das Insert jedoch im Vektor pT7T3 α -18 befindet und dieser auch zwei Pvu II Schnittstellen hat, wurde primär versucht, mittels einer partiellen Spaltung nur die Insert-Schnittstellen zu schneiden. Einem Reaktionsansatz von 50 μ l werden nach 1;2;5;10;20;30 und 60 Min. jeweils 5 μ l entnommen, 3 μ l Bromphenolblau zur Enzyminaktivierung zugegeben und dann in flüssigem Stickstoff tiefgefroren um die Reaktion zu stoppen. Die 7 Ansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anhand der Bandenlänge versuchte man den Zeitpunkt zu finden, an welchem nur die zwei gewünschten Stellen geschnitten waren. Kennt man diesen Zeitpunkt, so kann man eine grössere Menge DNA bis zu diesem Punkt spalten und die benötigten Fragmente gelelektrophoretisch gewinnen. Dieser Weg führte jedoch trotz mehrerer Versuche nicht zum Ziel, weil die Ergebnisse des Testlaufs sich bei der späteren Präparation nicht reproduzieren liessen. Es war nicht möglich, den um die 102bp verkürzten Vektor in genügender Menge aus dem Gel zu isolieren.

¹ Die in Klammern angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Positionen innerhalb der genomischen DNA. Das Plasmid pe49f enthält jedoch die cDNA des Erythropoietin-Gens, die Introns sind nicht darin enthalten. Somit kann man aus der Angabe einer Position im Genom nicht mehr auf eine Fragmentlänge der cDNA schliessen. Zur Vereinfachung werden deswegen in der Folge die Positionen im hier beschriebenen Fragment mit 1 (Schnittstelle Kpn I) bis 744 (Sac I) numeriert, was nicht mehr den reellen Positionen im Genom entspricht. In allen Abbildungen sind die Positionen im Plasmid mit den Abkürzungen E - Epo-Gen Insert (pe49f), T - pT7T3 α -18 und S - pSP64-Poly(A) beschriftet. Abgesehen von den bei E angegebenen Positionen handelt es sich jedoch immer um die absoluten Positionen im Plasmid, entsprechend den jeweiligen Herstellerangaben.

Deshalb wurde aus pEPO7 mit den Enzymen BamH I und EcoR I (Positionen 218/239 im Vektor, s. Abb. 10) ein Fragment herausgeschnitten und gereinigt, das nur die zwei erwünschten Pvu II Schnittstellen enthielt (Abbildung 9, a). Danach wurde es mit dem Enzym Pvu II gespalten. Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden die zwei benötigten Fragmente (246 bp und 412 bp) isoliert und das zu deletierende Fragment (102 bp) verworfen (b). Nach erfolgreicher Isolierung wurden die Fragmente mit Hilfe einer T4-Ligase wieder zu einem (jetzt 102bp kürzeren) Insert kombiniert. Die Fragmente besitzen jeweils eine Pvu II und eine EcoR I bzw. eine Pvu II und eine BamH I Schnittstelle. Nur wenn sich die beiden Fragmente über die Pvu II Schnittstelle verbinden, entstehen brauchbare Inserts. Um zu verhindern, dass sich 2 gleiche Fragmente über die Schnittstellen BamH I - BamH I bzw. EcoR I - EcoR I verbinden, fügt man dem Ligations-Ansatz die Enzyme EcoR I und BamH I hinzu. Dadurch werden alle unerwünschten Verbindungen wieder in ihre Fragmente zerlegt und nur die Verbindung Pvu II - Pvu II ist stabil. Nach Inaktivierung der Enzyme (15 min bei 75°C) wird der Ansatz mit Ethanol gefällt und in Aqua Bid. resuspendiert. Nun können das verkürzte Fragment (c) und der Vektor wieder ligiert und in den Bakterienstamm HB101 transformiert werden. Die Abbildung 10 zeigt das so entstandene Plasmid pEPO10.

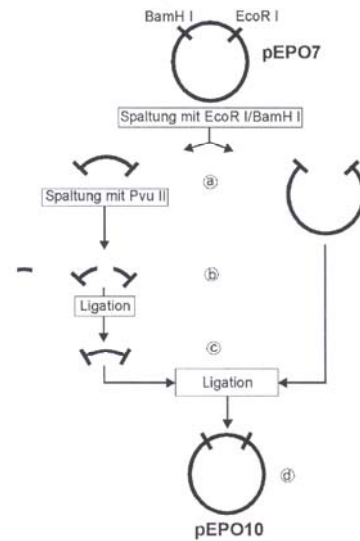


Abbildung 9: Klonierung vom pEPO10. Aus dem mit EcoR I und BamH I herausgeschnittenen Fragment wird mit Pvu II ein 102bp langes Stück deletiert. Danach werden die Fragmente wieder zu einem Plasmid kombiniert.

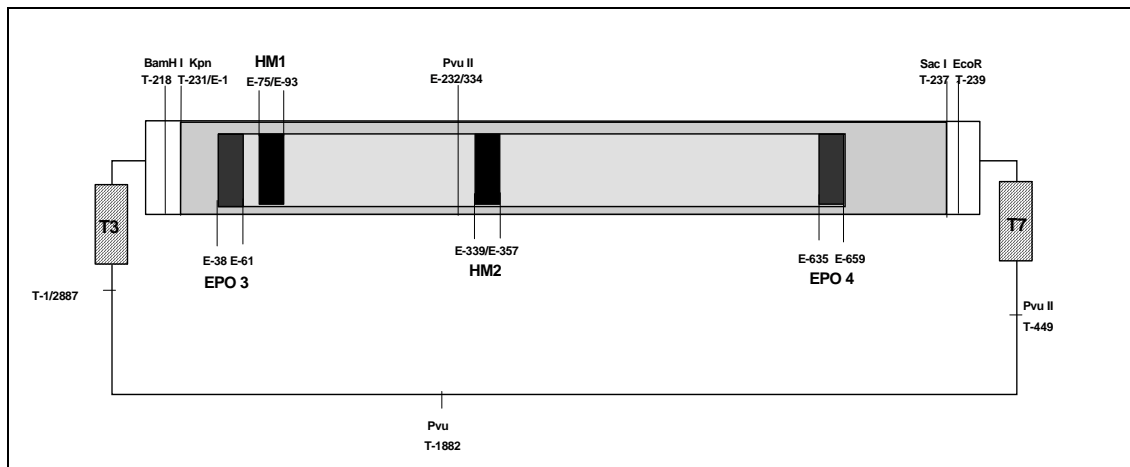


Abbildung 10: pEPO10: Die cDNA im Vektor T7T3α-18 nach Deletion von 102bp mit Pvu II (s. Text).

Mit pEPO10 als Vorlage wurde *in vitro* cRNA transkribiert. Die durch *in vitro* Transkription gewonnene cRNA wird als externer Standard in der RT-PCR verwendet, sie darf also keinerlei Template-Moleküle (EPO-cDNA) mehr enthalten. Auch ein einziges übrig gebliebenes cDNA Molekül kann zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Nur durch die Zugabe von RNase freier DNase gelingt es jedoch nicht, alle cDNA-Moleküle zu zerstören. Da sich während der Transkription bei 37°C die cDNA überall im Reaktions-Cup verteilt hat, muss vor Zugabe der DNase der Ansatz in ein frisches Cup pipetiert werden. Am besten sollte die DNase-Lösung bereits im neuen Cup sein, so dass der Transkriptionsansatz *in* die DNase-Lösung pipetiert werden kann.

Mit der so gewonnenen cRNA wurden mehrere RT-PCR's durchgeführt. Die Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen, weil sie oft negativ waren und, falls dies nicht der Fall war, viele unspezifische Banden auftraten. Erst nachdem die RT bei 70°C durchgeführt wurde, wurden die Ergebnisse akzeptabel.

Die hohen Temperaturen waren durch die Verwendung des spezifischen Primers EPO4 während der RT bedingt. Dieser Primer hat eine hohe Schmelztemperatur² (70°C), was wiederum eine hohe annealing Temperatur³ erzwingt. Bei niedrigeren Temperaturen bindet EPO4 auch an andere, nicht spezifische Regionen der DNA.

Diese hohen Temperaturen sind in der Praxis jedoch nicht akzeptabel, da die verwendete RT-Polymerase (RT-Kit der Firma Promega) bei 42°C optimal aktiv ist und bei höheren Temperaturen schnell inaktiviert wird. Um die Reaktion dennoch bei 70°C durchzuführen, benötigt man sehr hohe Enzym-Konzentrationen und die Ergebnisse sind je nach Alter des Enzyms unterschiedlich.

Da beim Einsatz eines Primers mit niedrigerer Schmelztemperatur bessere Ergebnisse zu erwarten waren, wurde pEPO10 erneut umklontiert. Diesmal wurde ein Vektor mit einer Poly-(A)-Sequenz (pSP65) verwendet. Eine Poly-(A)-Sequenz ermöglicht den Einsatz eines unspezifischen oligo-dT Primers, der eine wesentlich niedrigere Schmelztemperatur hat (s. Einleitung, Seite 7).

pEPO10 wurde mit den Enzymen BamH I und Sac I gespalten und danach das 642bp lange Insert mittels Gelelektrophorese isoliert und gereinigt. Anschliessend wurde das Fragment in den gleichermassen vorbereiteten Vektor pSP65-Poly-(A) ligiert und in den Bakteriumstamm HB101 transformiert. Dieses Plasmid wurde **pEPO64** genannt (s. Abb. 11).

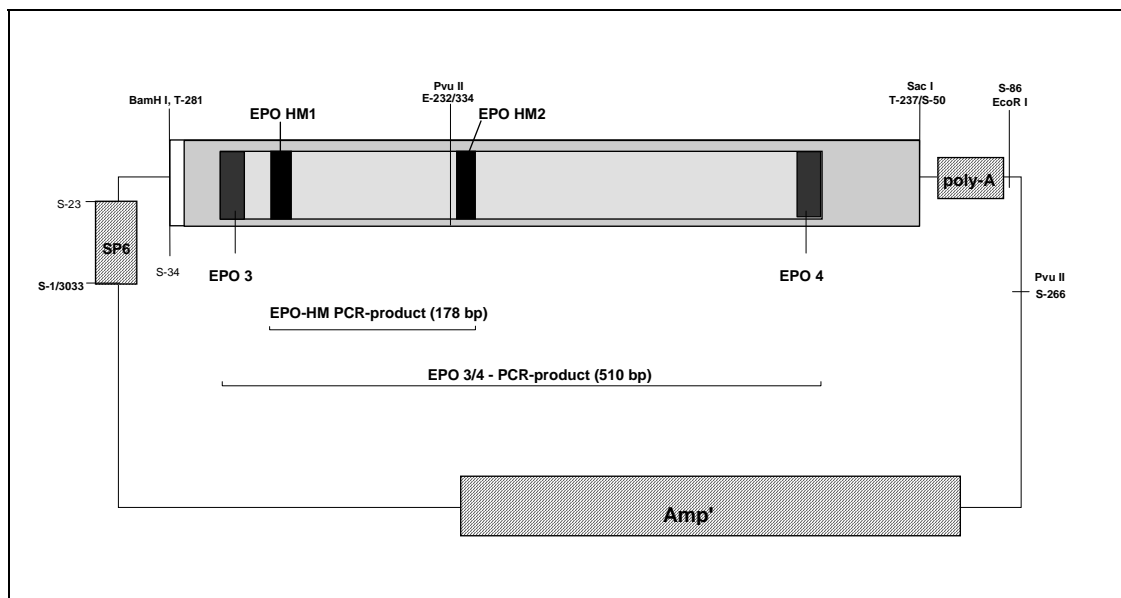


Abbildung 11: Das Plasmid pEPO 64. Promoter, EPO-cDNA und Poly-A-Schwanz. (Amp = Ampicillin-Resistenz Gen).

Die fehlerfreie Ligation wurde mit den folgenden drei analytischen Spaltungen bestätigt.

1. Rückspaltung

pEPO64 wurde mit EcoR I und BamH I wieder in Vektor und Insert zerlegt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die erwarteten Fragmente sind 2851bp und 678pb gross. Sollte sich der Vektor bei der Ligation (Abbildung 9, d) ohne das Insert geschlossen haben, so erkennt man auf dem Gel lediglich ein 2851bp grosses Fragment.

2. umgreifende Spaltung

Durch eine analytische Spaltung mit den Enzymen Sca I und Hind III wurde aus pEPO64 ein Fragment herausgeschnitten. Beide Schnittstellen liegen im Vektor und so zeigt die

² Unter der Schmelztemperatur versteht man die Temperatur, bei welcher sich der Primer von einer komplementären DNA löst. Man berechnet sie, indem pro C oder G 4°C und pro A oder T 2°C addiert werden. Je näher die Inkubationstemperatur bei der Schmelztemperatur liegt, desto spezifischer wird die Reaktion. Bei tieferen Temperaturen bindet der Primer auch an nicht vollständig komplementäre Regionen der DNA, und dies führt zu unspezifischen Produkten.

³ Die Annealing-Temperatur ist die Temperatur, bei welcher sich zwei komplementäre DNA- oder RNA-Fragmente zu einer doppelstrang-Nukleotidsequenz verbinden können. Auch hier gilt, dass die Bindung bei höheren Temperaturen (möglichst nahe der Schmelztemperatur) spezifischer ist.

Länge der Fragmente, ob das Plasmid mehrere Inserts hintereinander aufgenommen hat. Die erwarteten Fragmentgrößen sind 2446bp und 1038bp.

3. orientierenden Spaltung

Mit dieser Spaltung wird die richtige Orientierung des Inserts im Plasmid kontrolliert. Die Apa I Schnittstelle liegt dezentral im Insert, die Xba I Schnittstelle 6bp hinter dem Insert im Vektor. Bei richtiger Orientierung sind die Fragmente 2935bp und 594bp gross, bei falscher Orientierung 3430bp und 99bp (s. Abbildung 12).

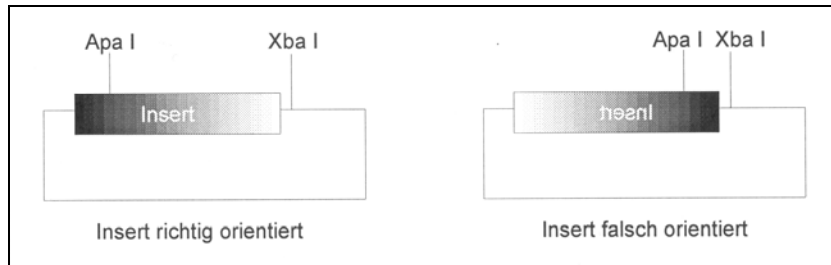


Abbildung 12: Schema zur Verdeutlichung der Orientierenden Spaltung. Die dezentral im Insert liegende Apa I Schnittstelle führt je nach Orientierung zu unterschiedlich grossen Fragmenten nach einem Verdau mit Apa I / Xba I.

Das vollständige Klonierungsschema für pEPO64 lautet:

	<u>Insert</u>	<u>Vektor</u>
pEPO7:	pe49f Kpn I Sac I	+ pT7T3 α -18 Kpn I Sac I
pEPO10:	pEPO7 BamH I Eco R I Δ Pvu II	+ pEPO7 BamH I Eco R I
pEPO64:	pEPO10 BamH I Sac I	+ pSP65-Poly-(A) BamH I Sac I

Mit dem Enzym EcoR I wurde pEPO64 an Position S-86 linearisiert, gelelektrophoretisch isoliert und unter RNasefreien Bedingungen gereinigt. Danach konnte dieses Fragment als EPO-Template gebraucht werden. Die *in vitro* Transkription erfolgte mit dem Riboprobe[®] Gemini System II - Kit der Firma Promega (s. Seite 19).

4.2. Quantitative RT-PCR des humanen EPO

4.2.1. Primer

Die verwendeten spezifischen Primer liegen im Exon 3 (EPO 3 und HM 1) im Exon 5 (HM 2) sowie (EPO 4) im 3' untranslatierten Bereich des humanen EPO-Gens.

Upstream-Primer HM1

Typ: **19mer, im hEPO-Gen von Position 1646 bis 1664.**
 Sequenz: **5'- TGTCC CAGAC ACCAA AGTT -3'**
 C/G: **9**
 A/T: **10**
 Schmelztemperatur: **56°C**

Downstream-Primer HM2

Typ: **19mer, im hEPO-Gen von Position 2655 bis 2683.**
 Sequenz: **5'- AGTGA TTGTT CGGAG TGGA -3'**
 C/G: **9**
 A/T: **10**

Schmelztemperatur: **56°C**

Upstream-Primer EPO 3

Typ: **23mer, im hEPO-Gen von Position 1610 bis 1632.**
 Sequenz : **5'- CTGTG¹ CTGAA⁶ CACTG¹¹ CAGCT¹⁶ TGA²¹ -3'**
 C/G: **12**
 A/T: **11**
 Schmelztemperatur: **70°C**

Downstream-Primer EPO 4

Typ: **24mer, im hEPO-Gen von Position 2952 bis 2975.**
 Sequenz: **5'- CTGTG¹ ACATC⁶ CTTAG¹¹ ATCTC¹⁶ AGAG²¹ -3'**
 C/G: **11**
 A/T: **13**
 Schmelztemperatur: **70°C**

4.2.2. RT-PCR des humanen EPO

Die **RNA** wird jeweils vor Beginn einer reversen Transkription für mindestens **5 Minuten bei 65°C** inkubiert, um eventuelle Sekundärstrukturen zu lösen. Danach wird sie bis zum Beginn der RT auf Eis gehalten.

Die reverse Transkription wird in einem TotalVolumen von 20µl durchgeführt, die PCR in 50µl.

RT-Reaktionsansatz:

	End-Konz./Menge	µl pro Ansatz
Promega RT-Puffer 10x	1x	2
dNTP's 10mM	je 1mM	2
MgCl ₂ 25mM	5mM	4
RNAsin® ribonucl. Inhibitor 40U/µl	20U/µl	0.5
oligo dT-Primer 0.5µg/µg RNA	0.5µg	1
RNA-Sample / Aqua Bid. (DEPC)		9.9
AMV Reverse Transkriptase (10-20U/µl)	ca. 10U	0.6
Total		20.0µl

Inkubation für **1h bei 42°C** und danach für **5 Minuten bei 75°C**, um das Enzym zu inaktivieren.

5µl dieses Ansatzes (und somit 25% der cDNA) werden in die PCR eingesetzt.

PCR-Reaktionsansatz:

Reaktionsansatz PCR	Konz. Menge	µl pro Ansatz
ST-Puffer 10x (ohne MgCl ₂)	1x	5.0
MgCl ₂ 25mM	1.5mM	2.0
dNTP's 10mM	0.5mM	0.5
up- und downstr.Primer-Mix	25pmol	2.0
cDNA ex RT-Reaktion		5
Aqua Bid.		15.5
Total		30µl

Enzym-Mix zur hot-start PCR:

Ansatz 2	pro Ansatz
Aqua Bid.	19µl
Super Taq 0,2U/µl	1µl
Total	20µl

Die Spezifität der Reaktion kann erhöht werden, indem eine sogenannte **Hot-Start PCR** durchgeführt wird. Dabei werden die Reaktionsansätze ohne Enzym auf 94°C erhitzt und erst

bei dieser Temperatur erfolgt die Enzymzugabe (20µl des Enzym-Mix). Dabei wird verhindert, dass beim Erwärmen des Reaktionsansatzes die Primer unspezifisch annealen und die Polymerase mit der Elongation falscher Sequenzen beginnt.

Der PCR-Thermocycler der Firma PERKIN ELMER CETUS wurde folgendermassen programmiert:

Phase	Temperatur	Länge
Denaturierung	94 °C	60 sec
Primer Annealing	55 °C	60 sec
Primer Extension	72 °C	90 sec

Abhängig von der Menge der EPO mRNA in der Probe wurden **30-35 Zyklen** gefahren (s. Seite 20).

Anschliessend an die PCR wurden die Ansätze **5 min. bei 72°C** inkubiert. In dieser Zeit kann das Enzym begonnene Primerextensionen beenden.

4.2.3. Bestimmung der Nachweisgrenze der RT-PCR

Mit der cRNA, welche aus der *in vitro* Transkription gewonnen wurde, wurde eine Verdünnungsreihe (1:10) von 100 pg/µl bis 1fg/µl erstellt. Damit wurde die Nachweisgrenze der RT-PCR bestimmt.

Entgegen unseren Erwartungen, zeigten erste Experimente eine untere Nachweisgrenze von 1pg RNA. Der Grund liegt in der unspezifischen Bindung der Test-RNA an Plastik (Eppendorf-Cups etc.). Durch die Zugabe eines Carriers (10ng/µl tRNA) kann man diese Bindungen absättigen und dadurch die Nachweisgrenze um den Faktor 1000 senken. Mit den Primern EPO3/EPO4 bei 35 PCR-Zyklen können bis zu 5fg EPO-mRNA/µg Gesamt-RNA nachgewiesen werden, während mit den Primern **HM1/HM2** auch noch **1fg nachgewiesen** werden kann (s. Abb 13, Seite 28).

Bei dem Marker, der in Abbildung 13 erkennbar ist, liegen die einzelnen Banden jeweils 100bp auseinander. Man erkennt im oberen Teil des Gels eine Verdünnungsreihe mit Banden auf Höhe 178bp, im unteren Teil solche auf Höhe 512bp. Die unter den spezifischen Banden erkennbaren Banden (bei ca. 100bp) sind unspezifische Primer/Primer Komplexe, wie sie sich in jeder PCR finden. Die beiden rechts vom Marker befindlichen Spuren sind negative Kontrollen. Bei der ersten Reaktion wurde bei der reversen Transkription die RT-Polymerase weggelassen, bei der zweiten Reaktion wurde keine RNA zugegeben. Beide Reaktionen sind negativ.

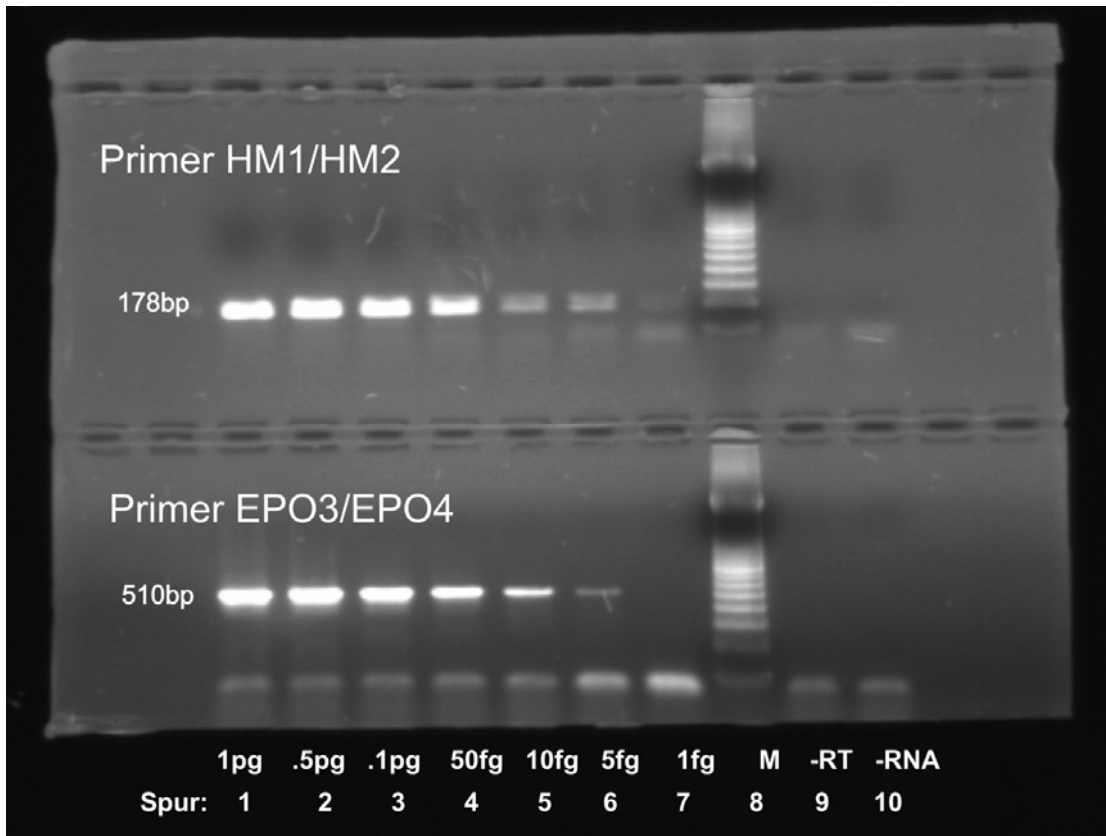


Abbildung 13: RT-PCR Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Nachweisgrenze der RT-PCR für humanes Erythropoietin (35 Zyklen). Der obere Teil der Abbildung zeigt eine RT-PCR mit den Primern HM1/HM2, der untere Teil eine solche mit EPO3/EPO4. Spur 8 enthält einen 100bp Marker, die Spuren 9 (keine RT durchgeführt) und 10 (keine RNA zugegeben) sind negative Kontrollen.

Wie viele Erythropoietin-RNA Moleküle entsprechen 1fg? Kennt man das durchschnittliche Molekulargewicht eines Nukleotids, so lässt sich das berechnen.

- *Durchschnittliches Nukleotid-Molekulargewicht:* 330 g/Mol
- *Molekulargewicht der cRNA:* $510\text{b} \times 330\text{g/Mol} = 168300\text{g/Mol}$
- 1 Mol EPO cRNA enthält $6 \cdot 10^{23}$ Moleküle und wiegt 168300g.
- *1 Molekül cRNA wiegt:* $168300\text{g} / 6 \cdot 10^{23} = 2.805 \cdot 10^{-19}\text{g}$
- *1fg (= $1 \cdot 10^{-15}\text{g}$) cRNA enthält:* $1 \cdot 10^{-15}\text{g} / 2,805 \cdot 10^{-19}\text{g} = \underline{\underline{3565 \text{ Moleküle}}}$.

Mit der RT-PCR lässt sich humanes EPO nachweisen, sofern sich mindestens 3565 EPO-mRNA-Moleküle pro μg Gesamt-RNA in der zu messenden Probe befinden.

4.2.4. Quantitative RT-PCR

Die quantitative Bestimmung des humanen Erythropoietins mittels RT-PCR war nun etabliert und ihre Nachweisgrenze bekannt. Die Methode wurde zuerst an humanen Hepatom-Zellen (HepG2) getestet. Von diesen Zellen weiss man, dass sie in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks den EPO-mRNA-level erhöhen. Dies muss mit der quantitativen RT-PCR nachweisbar sein.

Die Experimente wurden sowohl mit normoxisch (20% O₂) kultivierten Zellen wie auch mit Zellen, die während 6h einer hypoxischen Umgebung (1% O₂) ausgesetzt waren, durchgeführt. Die Zellen wurden trypsinisiert und in PBS gewaschen. Die RNA-Extraktion erfolgte mit RNAzol™. Nach der Reinigung wurde die RNA in Aqua Bid. aufgenommen (s. Seite 14).

Anhand der Bandenintensität einer RT-PCR Reaktion der zu quantifizierenden Proben wurde zuerst die ungefähre EPO-mRNA Konzentration bestimmt. So konnten die zur Kompetition benötigten Standards (10 pg bis 0.5 pg) festgelegt werden.

Als nächstes wurde eine quantitative RT-PCR mit RNA aus Kontrollzellen (Normoxie) durchgeführt. Die PCR-Zyklenzahl musste so niedrig wie möglich gehalten werden um die Kompetition im linearen Bereich zu halten. Andererseits erhält man bei allzu niedriger Zyklenzahl ein zu schwaches Signal. Der **optimale Bereich** für EPO-mRNA aus **normoxischen Zellen** lag für unsere Bestimmungen bei **35 Zyklen** (nicht gezeigt).

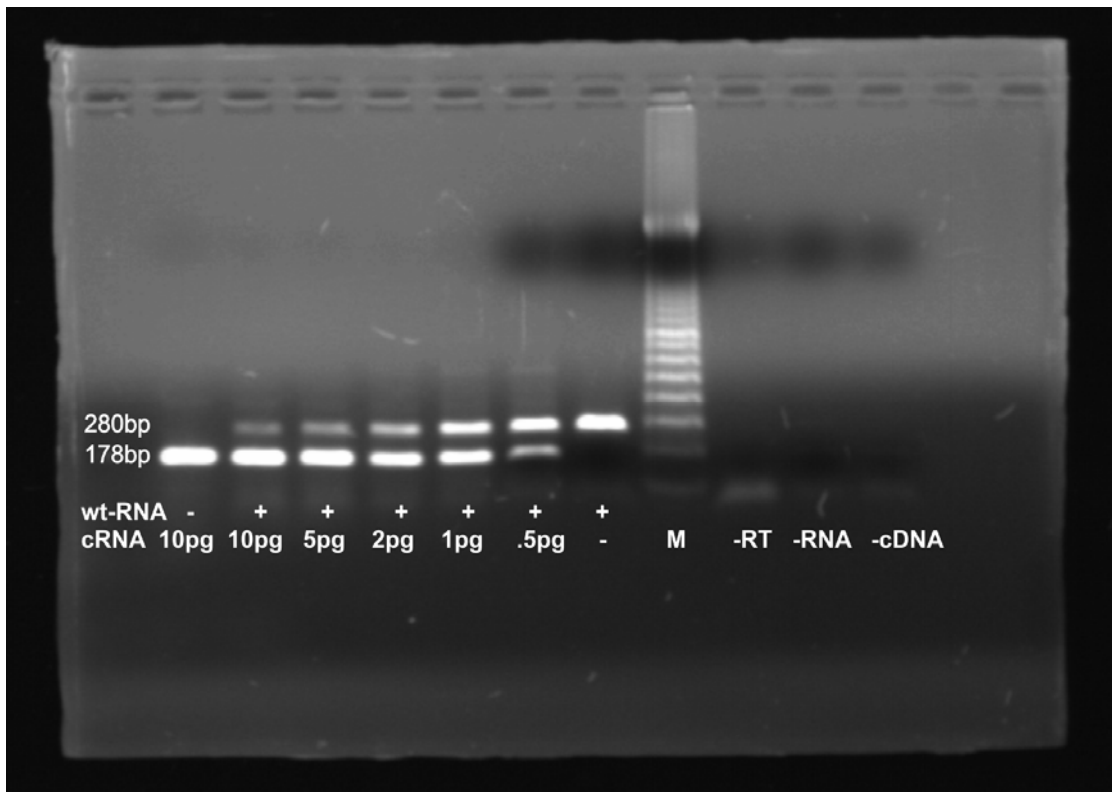


Abbildung 14: Komp. RT-PCR mit RNA aus normoxischen (20% O₂) HepG2 Zellen (35 Zyklen). Obere Bande (280bp) jeweils 1µg HepG2-Gesamt-RNA. Unten (178bp) der externen Standard (cRNA) in den angegebenen Konzentrationen. Bei 1pg ist die der cRNA entsprechende Bande intensiver, bei 0.5pg die der wt-RNA entsprechende Bande. Die Konzentration der wt-RNA liegt somit zwischen 0.5pg und 1pg. Primer Set HM1/HM2.

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis. Die obere Bande (280bp) entspricht der zu testenden RNA (wt-RNA), die untere (178bp) der des externen Standards (cRNA). Die eingesetzte

Konzentration nimmt in den Spuren 1 bis 7 von links nach rechts ab, während die wt-RNA Konzentration überall gleich gross ist. Spur 8 zeigt den Marker (M) zur Grössenbestimmung. Die Spuren 9 bis 11 enthalten negative Kontrollen und bestätigen die Spezifität. Die Konzentration der konkurrierenden wt-RNA und cRNA ist dort gleich gross, wo die entsprechenden Banden gleich intensiv sind (s. Seite 9). In Abbildung 14 ist in Spur 5 die cRNA-Bande intensiver, in Spur 6 die der wt-RNA. Die tatsächliche Konzentration muss somit zwischen 0.5pg und 1pg liegen.

Normoxischen Zellen enthalten im Durchschnitt 750fg EPO-mRNA pro 1µg Gesamt-RNA (n=3).

Zellen, welche in Hypoxie kultiviert wurden, sollten mehr EPO produzieren als normoxische. Mit der quantitativen RT-PCR müsste dies nachweisbar sein. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis einer quantitativen RT-PCR mit RNA aus HepG2 Zellen, die 6h vor der Trypsinisierung unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) inkubiert wurden.

Das Optimum der **Zyklenzahl für EPO-mRNA aus hypoxischen Zellen** liegt bei **30 Zyklen** (nicht gezeigt).

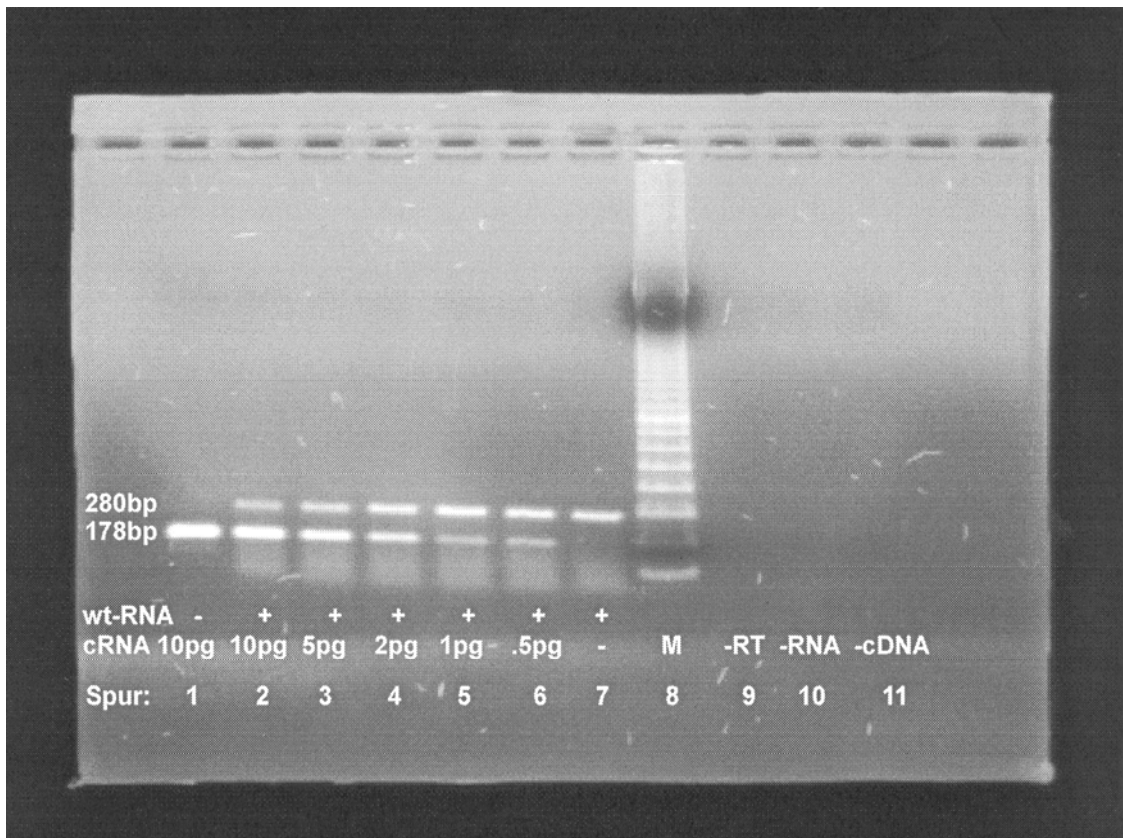


Abbildung 15: Kompetitive RT-PCR mit RNA mit hypoxischen (6h, 1% O₂) HepG2 Zellen. Die Spuren 1 bis 8 enthalten jeweils 1µg HepG2-Gesamt-RNA (wt-RNA) und den externen Standard (cRNA) in der angegebenen Konzentration. Bei 5pg ist die der cRNA entsprechende Bande (178bp) intensiver, bei 2pg die der wt-RNA entsprechende Bande (280bp). Die Konzentration der eingesetzten wt-RNA liegt somit zwischen 2pg und 5fg.

Hypoxische HepG2 Zellen enthalten im Durchschnitt etwa 4pg EPO-mRNA pro µg Gesamt-RNA (n=3).

Die Erwartung, dass hypoxische Zellen mehr EPO-mRNA enthalten als normoxische, hat sich bestätigt. Die quantitative RT-PCR ist damit als Mittel zu Quantifizierung von EPO-mRNA etabliert.

4.3 Erythropoietin im menschlichen Gehirn ?

Die Niere und die Leber sind die physiologisch wichtigsten EPO produzierenden Organe. Vor kurzem wurde EPO-mRNA im Gehirn der Ratte (Tan et al., 1992) und der Maus (Digicaylioglu et al., 1995) sowie EPO-Bindungsstellen im Gehirn der Maus (Digicaylioglu et al., 1995) nachgewiesen. Da das 30'400 Dalton grosse Protein die Blut-Hirn- Schranke kaum passieren kann, muss man annehmen, dass EPO im Gehirn lokal eine bisher unbekannte Transmitter Funktion Erfüllt.

Lässt sich auch im menschlichen Gehirn Erythropoietin nachweisen? Falls ja, wieviel mRNA kann man in einem Mikrogramm gesamt-RNA finden? Mit der quantitativen RT-PCR für hEPO lassen sich diese Fragen beantworten.

Für das Experiment wurde Hirngewebe von 6 Patienten verwendet, die sich wegen einer medikamentös nicht einstellbaren Temporallappen-Epilepsie einer selektiven Amygdala-Parahippocampektomie unterziehen mussten. Biopsien von Temporal-Cortex, Amygdala und Hippocampus wurden gleich nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren. Die RNA wurde mit RNAzol™ extrahiert, gereinigt und in Aqua Bid. aufgenommen (s. Seite 14).

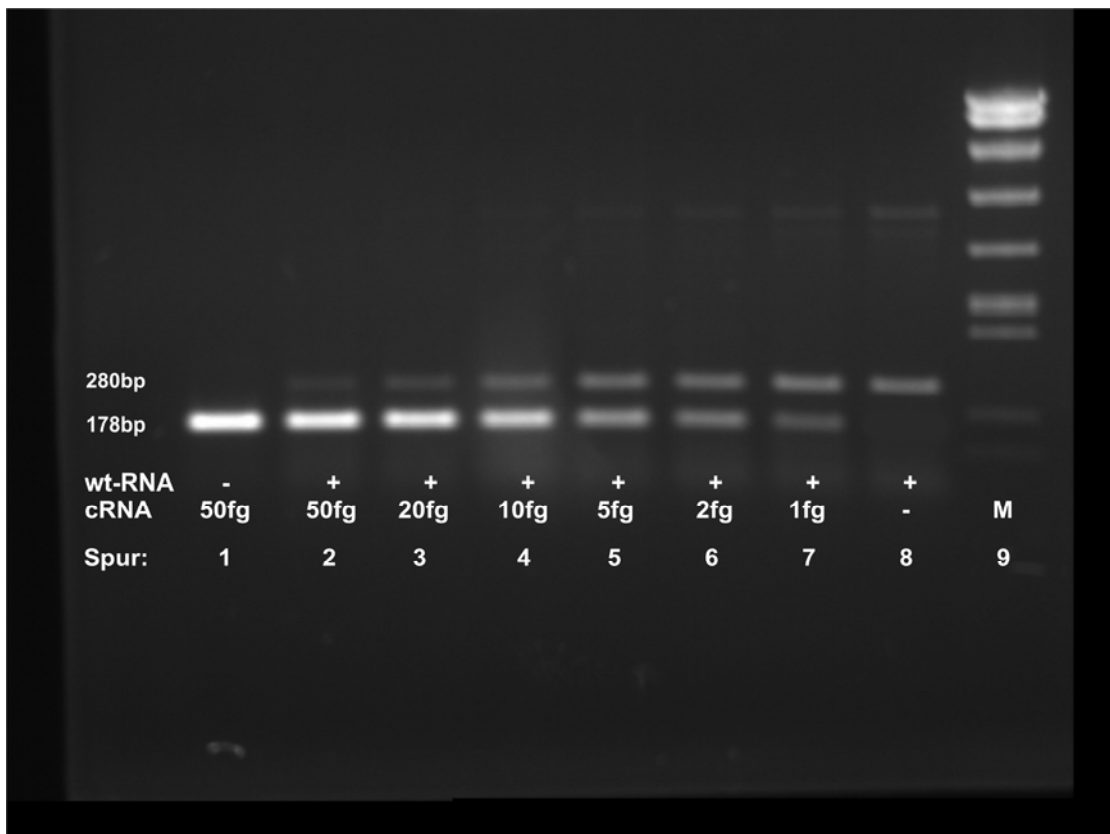


Abbildung 16: Komp. RT-PCR mit RNA aus humanem Hippocampus-Gewebe. Obere Bande (260bp) entspricht jeweils 1µg Gesamt-RNA des Hippocampus (wt-RNA). Unten der externen Standard (cRNA) in den angegebenen Konzentrationen. Bei 2fg ist die der cRNA entsprechende Bande intensiver, bei 1fg die der wt-RNA entsprechende Bande. Die Konzentration der wt-RNA liegt somit zwischen 1fg und 2fg.

Die Abbildung 16 zeigt das Resultat der quantitativen RT-PCR mit humanem Hirngewebe. Die Konzentration des externen Standards (untere Bande, 178bp) nimmt von links nach rechts ab. Die obere Bande entspricht der wt-RNA, also der RNA aus humanem Hirngewebe. Die Spuren 2 bis 6 enthalten je 1µg Gesamt-RNA. In Spur 6 ist die der cRNA entsprechende Bande (178bp) intensiver als die 280bp-Bande welche der wt-RNA entspricht. In Spur 8 ist dies umgekehrt. Die wt-RNA Konzentration liegt somit zwischen 1fg und 2fg.

Die Konzentration von EPO-mRNA im menschlichen Hippocampus beträgt 1,5fg pro µg Gesamt-RNA, (n=3). Diese Resultate wurden 1996 in der Arbeit von Marti et al. veröffentlicht.

5. Diskussion

Der Wachstumsfaktor Erythropoietin ist der wichtigste Regulator der Erythropoese. Das Hormon wird in der fetalen Leber und der adulten Niere von Säugetieren in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks (P_{O_2}) im Blut produziert und wirkt im Knochenmark auf verschiedenen Ebenen der Erythropoese.

Digicaylioglu et al. haben 1995 im Gehirn von 8 Wochen alten Mäusen sowohl EPO-RNA, wie auch EPO-Bindungsstellen nachgewiesen. Die EPO-mRNA Konzentrationen im Gehirn sind allerdings viel kleiner als die Mengen in Niere und Leber. Die physiologische Funktion des Hormons im Gehirn ist nicht bekannt; eine Wirkung auf die Hämatopoese ist wegen der Blut-Hirn-Schranke unwahrscheinlich. Vielmehr deutet der Nachweis von EPO-Bindungsstellen im Gehirn auf eine lokale Funktion im Gehirn selbst hin.

Darf man vermuten, dass Erythropoietin, abgesehen von seiner wichtigen Rolle als Regulator der Erythropoese, auch in anderen Systemen bisher unbekannt Funktionen erfüllt, oder ist die EPO Produktion im Gehirn physiologisch irrelevant und ein zufälliger Befund bei Nagern? Der Nachweis des Hormons im Gehirn weiterer Säuger, vor allem im menschlichen Gehirn, würde die Relevanz dieser Entdeckung unterstreichen. Bildet das menschliche Gehirn Erythropoietin? Wird auch im Gehirn, wie in der Niere, die EPO-Gen Expression in Abhängigkeit Sauerstoffpartialdruckes reguliert?

Zur Beantwortung dieser Fragen wird ein sensitiver, spezifischer, quantitativer und reproduzierbarer Nachweis für EPO benötigt. Da nur kleine Biopsien vorliegen, muss er auch mit wenig Material durchzuführen sein. Mit dem *radio immuno assay* (RIA) (s.S. 6) liesse sich das EPO-Protein nachweisen, jedoch ist der RIA zu wenig sensitiv und der Nachweis des Proteins allein würde eine lokale Produktion nicht beweisen, weil die Blut-Hirn-Schranke eine externe EPO Zufuhr zwar unwahrscheinlich macht, diese jedoch nicht ausschliesst. Der Beweis der lokalen EPO-Produktion lässt sich nur durch den Nachweis von EPO-mRNA erbringen, denn diese entsteht nur durch Expression des EPO-Gens in der Zelle. Mit dem *Ribonuclease Protection Assay* existiert ein quantitativer mRNA Nachweis, jedoch ist er möglicherweise zu wenig sensitiv und für den Nachweis werden grössere Mengen RNA benötigt (s.S. 6). Die *RT-PCR* ist ein äusserst sensitiver Nachweis für RNA, jedoch ist sie nicht quantitativ. Die **kompetitive RT-PCR für das humane Erythropoietin**, die mit dieser Arbeit etabliert wurde, erfüllt alle oben gestellten Forderungen. Schon mit weniger als 3600 RNA Molekülen lässt sich eine EPO-Produktion sicher und schnell quantitativ nachweisen.

In der Folge wird die etablierte Methode diskutiert und weiter auf die Funktion des EPO im Gehirn eingegangen.

1993 wurde mittels einer *kompetitiven PCR* gezeigt, dass die Konzentration von EPO-mRNA in Hep 3B Zellen unter Hypoxie ansteigt (Fandrey und Bunn, 1993). Als externen Standard wählten Fandrey und Bunn die cDNA des Erythropoietingens. Diese wurde an einem Punkt mutiert, wodurch aus einer beim Wildtyp bestehenden Acc I - Restriktionsschnittstelle eine Hind III - Schnittstelle entstand. Nach Durchführung der PCR mit cDNA aus RT-Reaktionen und einer bekannten Menge cDNA des externen Standards, wurden vor der Gel-Elektrophorese je die Hälfte des PCR-Ansatzes mit dem Restriktions-Enzym Acc I bzw. Hind III geschnitten. Durch die Restriktion wird das 253bp lange PCR-Produkt bei Vorhandensein einer Hind III-Schnittstelle (ES-cDNA) auf 215bp bzw. bei Existenz einer Acc I-Schnittstelle (wt-RNA) auf 201bp gekürzt. Die beiden so behandelten Anteile jeder Reaktion wurden dann mit einer Gelelektrophorese auf zwei nebeneinander liegenden Spuren aufgetrennt. Pro Spur sind jeweils maximal 2 Banden zu sehen. Einerseits die ungeschnittene DNA bei 253bp und andererseits die geschnittene bei 215bp bzw. 201bp. Das Verhältnis wt-cDNA (erhalten aus der RT mit wt-RNA) zu externer Standard cDNA ist dann gleich eins, wenn die beiden Banden einer Spur (bzw. alle vier Banden von zwei zusammengehörigen Spuren) gleich intensiv sind, weil sich dann jeweils die Hälfte des Ansatzes mit Acc I (wt-cDNA) und die andere Hälfte mit Hind III (externer Standard cDNA) schneiden lässt. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis einer solchen *kompetitiven PCR*.

Länge	ungeschnitten	Acc I	Hind III	Acc I	Hind III	Acc I	Hind III
253 bp	—		—	—	—	—	—
215 bp		—			—	—	—
201 bp						—	—
		wt-cDNA im Überschuss		Externer Standard im Überschuss		Probe und Ext. Std. in gleicher Konz.	

Abbildung 17: Kompetitive PCR nach Fandrey and Bunn 1993 (s. Text).

Die Banden auf Höhe 253bp entsprechen der jeweils ungeschnittenen cDNA. Unter der Voraussetzung, dass die DNA vollständig verdaut ist, entspricht die DNA der Bande auf Höhe 253bp in der Spur 'Acc I' jeweils der DNA in der Bande auf 215bp der zugehörigen Spur 'Hind III' und umgekehrt. Wird die cDNA nicht lange genug mit den Restriktionsenzymen inkubiert, so wird eine quantitative Interpretation unmöglich.

Bei der kompetitiven PCR wird die cDNA des externen Standards erst nach beendeter RT zugegeben. Um Rückschlüsse von der kompetitiven PCR auf die Mengen der in der RT eingesetzten wt-RNA machen zu können, musste experimentell die Effizienz der RT berechnet werden. Dazu wurde EPO-mRNA mit einem Zellextrakt von Hep 3B Zellen in einer Verdünnungsreihe von 7.8pg bis 7.8ng revers transkribiert, und aus dem mRNA/cDNA-Verhältnis die Effizienz der RT berechnet. Fandrey und Bunn geben $35 \pm 3\%$ als Ergebnis an.

Die hier vorgestellte *kompetitive RT-PCR* unterscheidet sich von der *kompetitiven PCR* von Fandrey und Bunn in mehreren Punkten:

- Bei der *kompetitiven RT-PCR* fällt Effizienz der RT nicht ins Gewicht, bei jedem Ansatz wieder neu sowohl wt-RNA als auch der externe Standard gemeinsam im gleichen Tube, unter identischen Bedingungen, transkribiert werden. Die RT-Effizienz ist nämlich abhängig vom verwendeten RT-Enzym, von der RNA-Qualität, der Temperatur, der Inkubationsdauer und der Pipettiergenauigkeit. Fandrey und Bunn gehen davon aus, dass diese Bedingungen von Experiment zu Experiment gleich bleiben.
- Der aufwendige Restriktions-Enzym-Verdau der PCR-Produkte entfällt. Die wt-cDNA kann von der cDNA des externen Standards durch seine Grösse unterschieden werden, was das Experiment verkürzt und vereinfacht.
- Hingegen bedeutet die Quantifizierung der cDNA-Produkte, so wie sie Fandrey und Bunn durchführen eine erhebliche Einsparung von Zeit und Geld, da die Bestimmungen mit einem cDNA- und nicht mit einem cRNA-Standard durchgeführt werden.
- Die *in vitro* Transkription des für die kompetitive RT-PCR benötigten externen Standards ist zwar aufwendig, es ist jedoch ein einmaliger Aufwand.
- Als Einwand gegen die hier vorgestellte Methode kann man geltend machen, dass der kürzere externe Standard in der Reaktion gegenüber der wildtyp-RNA einen Amplifikationsvorteil genießt. Bei der Methode von Fandrey und Bunn sind beide PCR-Templates gleich gross wodurch dieser Einwand entfällt. Bei der für die PCR gewählte Extensions-Zeit von 90 Sekunden pro Zyklus erscheint jedoch ein Längenunterschied von 102bp, bei einer Gesamtlänge von weniger als 700 bp nicht als limitierender Faktor.

Die Abbildung 18 auf Seite 34 zeigt eine Gegenüberstellung der beiden Methoden.

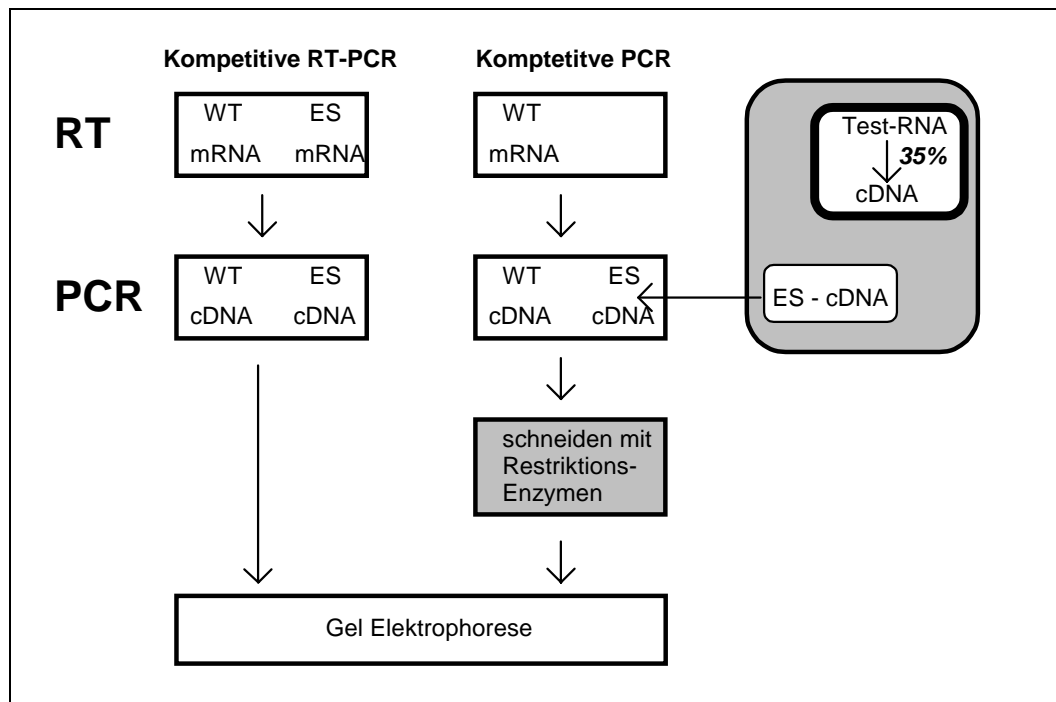


Abbildung 18: Gegenüberstellung Kompetitive RT-PCR / Kompetitive PCR. (WT = wildtyp, ES=externer Standard) Bei der Kompetitiven RT-PCR wird die cRNA des ES bereits zur RT zugegeben und durchläuft die gleichen Schritte wie die wt-RNA. Für die komp. PCR müssen zusätzlich die grau schattierten Schritte durchgeführt werden; die Effizienzberechnung der RT (hier mit 35% angegeben) und der Enzym-Verdau. Die ES-cDNA wird erst zur PCR in die Reaktion zugegeben.

Fandrey und Bunn fanden mit Ihrer Methode in Hep3B einen **Basalwert von 0.023 pg** pro 1µg gesamt RNA und 1.645 pg pro 1µg gesamt RNA bei hypoxisch stimulierten Zellen. Dies entspricht einer **Stimulationsfaktor von 72**.

Mit der **quantitativen RT-PCR** finden wir in HepG2-Zellen sich ein **Basalwert von 0.75 pg** pro 1µg Gesamt RNA und nach hypoxischer Stimulation 4.00 pg pro 1µg gesamt RNA. Dies entspricht einem **Stimulationsfaktor von 5.3**.

Wie lässt sich dieser Unterschied zwischen diesen Ergebnissen erklären? Die Antwort liegt wohl darin, dass Fandrey und Bunn für ihre Experimente Hep3B-Zellen verwendeten, während in der vorliegenden Arbeit HepG2 Zellen benutzt wurden. Beide Zelllinien wurden von Goldberg et al. (1987) bezüglich ihrer EPO-Produktion beschrieben. In der damals veröffentlichten Arbeit untersuchte Goldberg sowohl die EPO Produktion (mit RIA und Bioassay), wie auch die EPO-mRNA Produktion. Der Anstieg der EPO-mRNA wurde mit der Northern-Blot Analyse nachgewiesen. Im Durchschnitt liess sich die EPO-Produktion bei HepG2-Zellen 3fach, bei Hep3B-Zellen 18fach stimulieren. Der EPO-Basalwert bei unstimulierten HepG2-Zellen war jedoch deutlich höher als bei Hep3B-Zellen. In Anbetracht dieses Unterschieds in den beiden Zelllinien, sind die Ergebnisse von Fandrey und Bunn durchaus mit hier gefundenen Werten vergleichbar.

Die Etablierte und validierte Methode der quantitativen RT-PCR wurde nun zur Klärung der Frage verwendet, ob und wieviel EPO-mRNA im menschlichen Gehirn gebildet wird.

Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der quantitative RT.PCR mit **humanen**, nicht stimulierten **Hippocampus**-Zellen. Wie auf der Abbildung erkennbar ist, finden sich im menschlichem Gehirn **1,5fg Erythropoietin-mRNA pro Mikrogramm Gesamt-RNA**.

	Maus	Affe	Mensch
Normoxisch 21% O ₂	1-2fg	1fg	1.5 fg
Hypoxisch	20-30fg	3-4fg	
Induktion	20 fach	4fach	

Abbildung 19: Erythropoietin im Gehirn von Mensch, Maus und Ratte.

Abbildung 19 zeigt einen Vergleich der EPO-mRNA Mengen im Gehirn von Mensch, Maus und Affe. Die Daten von Maus und Affe stammen aus den Arbeiten von Digicaylioglu et al. (1995) und Marti et al. (1996). Der Vergleich zeigt, dass die im menschlichen Gehirn gefundene Konzentration mit denjenigen im Maus- und Affenhirn weitgehend übereinstimmt. Die unterschiedlichen Werte bei Stimulation durch Hypoxie (Maus/Affe) erklären sich durch die unterschiedliche Art der Hypoxiestimulation bei Maus und Affe. Die Affen wurden während 2 Stunden einem Gasgemisch von 8% O₂ ausgesetzt, während die Mäuse 4 Stunden bei 0.1% CO gehalten wurden¹. Eine Hypoxiestimulation des Menschen ist aus naheliegenden Gründen nicht möglich.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zum quantitativen Nachweis von humaner EPO-mRNA etabliert und angewandt.

Damit wurde EPO mRNA im menschlichen Gehirn nachgewiesen, in den selben Konzentrationen, wie dies zuvor schon für Affe und Maus gezeigt worden war. Kürzlich wurde zudem im humanen Liquor immunreaktives EPO nachgewiesen, dass sehr wahrscheinlich aus dem ZNS selbst stammt (Marti et al., 1997). Die Tatsache, dass das EPO-Gen durch physiologische Stimuli wie Hypoxie und Anämie induzierbar war und der Nachweis von EPO-Bindungsstellen im ZNS lassen es immer wahrscheinlicher erscheinen, dass EPO neben seiner Funktion in der Erythropoese auch eine Rolle im Gehirn spielt. Seine Aufgabe im Nervensystem ist jedoch noch nicht geklärt und bedarf weiterer Forschung.

¹ Dies zu einer funktionellen Anämie, weil durch das CO 50% der Erythrozyten blockiert werden.

6. Zusammenfassung

Das Hormon Erythropoietin [EPO] ist ein Glykoprotein, welches in der Regulation der Erythropoese eine entscheidende Rolle spielt. Erythropoietin wird in der fetalen Leber und der Niere gebildet und wirkt in erster Linie im Knochenmark.

Untersuchungen an Mäusen und Ratten haben gezeigt, dass das Hormon auch in der Leber, im Hoden, in verschiedenen Tumoren und im Gehirn vorkommt. Auch im Gehirn von Affen konnte EPO nachgewiesen werden. Die Funktion des Erythropoietins im Nervensystem ist nicht bekannt. Es ist anzunehmen, dass EPO im Gehirn eine lokale Funktion ausübt, da die Blut-Hirn-Schranke das Hormon am Verlassen des Gehirns hindert. Der Nachweis von EPO im Gehirn weiterer Spezies würde die Relevanz dieser Entdeckung erhärten. Bildet das menschliche Gehirn Erythropoietin? Falls ja, wieviel?

Diese Frage kann mit den bisher vorhandenen Nachweismethoden nicht beantwortet werden, da vom menschlichen Gehirn nur wenig Material zur Verfügung steht und dieses wahrscheinlich nur kleinsten Mengen EPO enthält. Um dennoch im menschlichen Gehirn EPO-RNA nachweisen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine **kompetitive RT-PCR für die humane EPO-RNA** etabliert.

Zur Durchführung einer kompetitiven RT-PCR amplifiziert man zwei fast identische RNA-Moleküle mit Hilfe der RT-PCR. Bei einem der beiden Moleküle handelt es sich um die zu quantifizierende wildtyp-RNA, beim Zweiten um eine künstliche RNA, deren Gensequenz der wildtyp-RNA entspricht, aus deren Mitte jedoch ein Fragment deletiert wurde. Die unterschiedliche Länge der Moleküle erlaubt es, die beiden Moleküle in der Gelelektrophorese zu unterscheiden, weil der kürzere externe Standard schneller läuft. Die Konzentration von EPO-RNA in einer Probe bestimmt man, indem mehrere solcher RT-PCR Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen des externen Standards durchgeführt werden. Die EPO-RNA-Konzentration ist gleich hoch wie die Konzentration des externen Standards, wenn Ihre Banden in der Gelelektrophorese gleich intensiv sind.

Zur Klonierung des externen Standards wurde von einer EPO-cDNA 102 Basenpaare deletiert und diese gekürzte DNA wurde in einen Expressionsvektor eingesetzt, welcher als Vorlage für eine *in vitro* Transkription verwendet wurde. Nach der photometrischen Quantifizierung des externen Standards, wurde mittels RT-PCR einer Verdünnungsreihe die Nachweisgrenze der RT-PCR bestimmt. Danach wurde mit der neuen Methode je eine kompetitive RT-PCR mit RNA aus normoxischen und RNA aus hypoxischen HepG2 Zellen durchgeführt. Es gelang, die bekannte Induktion des EPO-Gens durch Hypoxie zu zeigen, womit die kompetitive RT-PCR als quantitativer Nachweis für kleinste Mengen von EPO-RNA etabliert und validiert war.

Durch den Einsatz der neu etablierten Methode sollte nun die Frage beantwortet werden, ob und wieviel EPO-RNA im menschlichen Gehirn gebildet wird. Mit der kompetitiven RT-PCR gelang der Nachweis von 1.5fg EPO pro 1µg Gesamt-RNA in Zellen des menschlichen Hirngewebes (Hippocampus). Dies entspricht der Menge, die im Gehirn von Affen und Mäusen gefunden wurde. Die Funktion des EPO im Gehirn bleibt vorerst offen und bedarf weiterer Erforschung.

7. Literaturnachweis

- Anden D. P., Fogel A., Stanley P., Damjanov I. und Knowles B. B.** - Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282: 615-617, 1979
- Bartley E. und Powsner. E.** - Erythropoietin in vivo, a culture plate method for marrow. *Am. J. Clin. Pathol.* 61: 69-73, 1974
- Beguín Y., Lipscei G., Oris H. Thoumsin H. und Fillet G.** - Serum immunoreactive erythropoietin during pregnancy and in the early postpartum. *Br. J. Haematol.* 76: 545-549, 1990
- Beru N.J., McDonald C., Lacombe C. und Goldwasser E.** - Expression of erythropoietin gene. *Mol. Cell Biol.* 6: 2571-2575, 1986
- Birnboim H.C. und Doly J.** - A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* 7:1513-23, 1979
- Bondurant M. C. und Koury M. J.** - Anemia induces accumulation of Erythropoietin-mRNA in the kidney and the Liver. *Mol. Cell Biol.* 6: 2731-2733, 1986
- Bonsdorff E. und Jalavisto E.** - A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol. Scand.* 16: 150-170, 1948
- Bunn H. F. und Poyton R. O.** - Oxygen sensing and molecular adaption to hypoxia. *Physiol. Rev.* 76: 839-885, 1996
- Carnot P. und Deflandre C.** - Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang. *Acad. Sci. Paris* 143: 384-386, 1906
- Carnot P. und Deflandre C.** - Sur l'activité hémopoïétique des différent organes au cours de la régénération du sang. *Acad. Sci. Paris* 143: 432-435, 1906
- Cohen S.N., Chang A.C., Hsu L.** - Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic Transformation of E. Coli by R-Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114, 1972
- Cohen S.N., Chang A.C., Boyer H.W. und Helling R.B.** - Construction of biological functional bacterial Plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240-3244, 1973
- Cotes P.M.** - Physiological studies of erythropoietin in plasma. In: *Erythropoietin*, edited by W. Jelkmann and A.J. Gross. *Berlin: Springer* p. 57-79, 1989
- Cotes P. M. und Brozovic B.** - Diurnal variation of serum immunoreactiv erythropoietin in normal subject. *Clin. Endocrinol.* 17: 419-422, 1982
- Cotes P.M., Canning C.E. und Lind T.** - Changes in Serum immunoreactive erythropoietin during the mestrual cycle and normal pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 90: 304-311 1983
- Dagert M. und Ehrlich S. D.** - Prolonged incubation in calciumchlorid improves the competence of E. coli cells. *Gene* 6: 23-28, 1979
- De Klerk G., Hart A., Kruiswijk C. und Goudsmit R.** - Modified Method of erythropoietin (ESF) bioassay in vitro using mous fetal liver cells. II. Measurement of ESF in human serum. *Blood* 52: 569-577, 1978
- Digicaylioglu M., Bichet S., Marti H.H., Wenger R.H., Rivas L.A., Bauer C. und Gassmann M.** - Localization of specific erythropoietin binding sitea at defined areas of the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3717-3720, 1995

-
- Dukes P., Hammond D., Shore N. und Ortega J.** - Erythropoietin: a complex with different in vivo and in vitro activities. *J. Lab. Med.* 76: 439-444, 1970
- Eckardt K.-U., Boutellier U., Kurtz A., Schopen M., Koller E. A. und Bauer C.** - Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia *J. Appl. Physiol.* 66: 1785-1788, 1989
- Eckardt K.-U., Dittmer J., Neumann R., Bauer C. und Kurtz A.** - Decline of erythropoietin formation at continuous hypoxia is not due to feedback inhibition. *Am. J. Physiol.* 258: F1432-F1437, 1990.
- Erslev A. J.** - Humoral regulation of red cell production. *Blood* 8: 349-357, 1953
- Erslev A. J.** - In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum-free solution. *Blood* 44: 77-85, 1974
- Erslev A. J., Caro A., Kansu E., Miller O. und Cobbs E.** - Plasma erythropoietin in polycythemia. *Am. J. Med.* 66: 234-247, 1979
- Fandrey J. und Bunn F. H.** - In vivo and In vitro Regulation of Erythropoietin mRNA: Measurement by competitive Polymerase Chain Reaktion. *Blood* 81: 617-623, 1993
- Frederikson T.** - The interaktion of fetal liver cells. I. Measurement of proliferation by triated thymidin incorporation. *Exp. Haematol.* 5: 327-349, 1977
- Fried W. und Barone-Varelas J.** - Regulation of the plasma erythropoietin level in hypoxic rats. *Exp. Hematol.* 12: 706-711, 1984
- Fried W., Jhonson C. und Heller P.** - Observations on regulation of erythropoiesis during prolonged periods of hypoxia *Blood* 36: 607-616, 1970
- Goldberg M.A., Glass G.A., Cunningham J.M. und Bunn H.F.** - The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7972-7976, 1987
- Goldwasser E., Eliason J. und Sikkema D.** - An assay for erythropoietin in vitro at the milliunit level. *Endocrinology* 97: 315-323, 1975
- Gurney C.W., Goldwasser E. und Pan C.** - Studies on erythropoiesis. IV. Erythropoietin in human plasma. *J. Lab. Clin. Med.* 50: 535-540, 1957.
- Hellebostad M., P. Hågå P. und Cotes P.M.** - Serum immunoreactive erythropoietin in healthy normal children. *Br. J. Haematol.* 70: 247-250, 1988
- Imai N. N., M. Higuchi A., Kawamura A., Tomonoh K., Oh-Eda M. Fujiwara M., Shimonaka Y. und Ochi N.** - Physicochemical and biological compyrison of recombinant human erythropoietin with human urinary Erythropoietin. *J. Biochem.* 107: 352-359, 1990
- Jacobs K.C., Shoemaker R., Rudersdorf Neill S.D., Kaufmann R.J., Mufson A., Sheehra J., Jones S.S. Hewick R., Fritsch E. F., Kawakita M., Shimizu T. und Miyake T.** - Isolation and characterisation of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature London* 313: 806-810, 1985
- Jacobson L.O., Goldwasser E., Fried W. und Plzak L.** - Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature London* 179: 633-634, 1957
- Jelkmann W.** - Temporal pattern in erythropoietin titers in kidney tissue during hypoxic hypoxia. *Pfluegers Arch.* 393: 88-91, 1982
-

-
- Jelkman W. und Wiedemann G.** - Lack of sex dependence of the serum level of immunoreactive erythropoietin in chronic anemia. *Klin. Wochenschr.* 67: 1218, 1989
- Jiang B.H., Semenza G.L., Bauer C. und Marti H.H.** - Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol.* 271: C1172-C1180, 1996
- Khorana H. G. und Panet A.** - Studies on polynucleotides. The linkage of desoxyribonucleotide templates to cellulose and its use in their replication. *J. Biol. Chem.* 249: 5213-21, 1974
- Koury M. J. und Bondurant M. C.** - Erythropoietin retards DNA Breakdown and prevents programmed death in Erythroid progenitor cells. *Science* 248: 378-381, 1990
- Kristal G., Eaves A.C. und Eaves C. J.** - Determination of normal human serum erythropoietin levels using mouse bone marrow. *J. Lab. Clin. Med.* 97: 158-169, 1981
- Lin F.K., Lin C.H. Lai P.H., Browne J.K., Egrie J.C. Smalling S., Egrie J. C., Fox G.M., Chen K.K. Martin F., Strabinsky Z., Badrawi S. M., Castro M., Goldwasser E. und Suggs S.** - Monkey Erythropoietin Gene: Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7580-7584, 1985
- Lucarelli G., Porcellini A., Carnevali C., Carmena A. und Stohlman F.** - Fetal and neonatal erythropoiesis. *Ann. NY. Acad. Sci.* 149: 544-559, 1968
- Marti H.H., Wenger R.H., Rivas L.A., Straumann U., Diglicaylioglu M., Henn V., Yonekawa Y., Bauer C. und Gassmann M.** - Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur. J. Neurosci.* 8: 666-676, 1996
- Marti H.H., Gassmann M., Wenger R.H. Kvietikova I., Morganti-Kossmann M.C., Kossmann T., Trenz O., Bauer C.** - Detection of erythropoietin in human liquor: Intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidn Internat* 51: 416-418, 1997
- McLeod D., Shreeve M. und Axelrad A.** - Improved plasma culture system for production of erythrocytic colonies in vitro: quantitative assay method for CFU-E. *Blood* 44: 517-534, 1974
- Miller M.E. und Howard D.** - Modulation of erythropoietin concentrations by manipulation of hypercarbia. *Blood Cells* 5: 389-403, 1979
- Mori M., Murai Y., Hirai M., Kawakami M., Saito N. Takanashi N. Urabe A. und Takaku F.** - Serum erythropoietin titers in the aged. *Mech. Aging Dev.* 46:105-109, 1988
- Mullis K. und Faloona F.** - Methods in enzymology. *Academic Press NY and London*, 155: 335, 1987
- Miyake T., Kung C.K. und Goldwasser E.** - Purification of human Erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252: 5558-5564, 1977
- Papayannopoulou T. und Finch C. A.** - On the in vitro action of erythropoietin: a quantitative analysis. *J. Clin. Invest.* 51: 1179-1185, 1972
- Ratcliffe P. J., Johnes R. W., Phillips R. E., Nicholls G. und Bell J.I.** - Oxygen dependent Modulation of Erythropoietin mRNA Levels in Isolated Rat Kidneys studied by RNase Protection. *J. Exp. Med.* 172: 657-660, 1990
- Recny M.A., Scoble H.A. und Kim Y.** - Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 262: 17156-17163, 1987
-

-
- Rege A. B., Brookins B.J. und Fischer J. W.** - A radioimmunoassay for erythropoietin: serum levels in normal human subjects and patients with hemopoietic disorders. *J. Lab. Clin. Med.* 100: 829-843, 1982
- Roulland-Dussoix D. und Boyer H.W.** - The Escherichia coli B restriction endonuclease. *Biochim. Biophys. Acta* 195: 219-29, 1969
- Schuster E.J., Badiavas E.V. und Costa-Giomi R.** - Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* 70: 316-318, 1987
- Seferynska I., Brookins J., Rice J. C. und Fischer J. W.** - Erythropoietin production in exhypoxic polycythemic mice. *Am. J. Physiol.* 256: C925-C929, 1989
- Semenza G.L., Nejfelt M.K., Chi S.M. und Antonarakis S.E.** - Hypoxia inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Nat. Acad. USA* 88: 5680-5684, 1991
- Semenza G.L. und Wang G.L.** - A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* 12: 5447-5454, 1992
- Semenza G.L., Roth P.H., Fang H.M. und Wang G.L.** - Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269: 23757-23763, 1994
- Stephenson J., Axel A., McLeod D. und Shreeve M.** - Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1542-1546, 1971
- Tan C. C. und Ratcliffe P. J.** - Effect of inhibitors of phosphorylation of erythropoietin mRNA in isolated perfused rat kidneys. *Am. J. Physiol.* 261: F982-987, 1991
- Tan C. C., Eckhardt K. U. und Ratcliffe P. J.** - Organ distribution of Erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int.* 40: 69-76, 1991
- Udupa K. B., Crabtree D. A. und Lipschitz D. A.** - In vitro culture of proerythroblasts: characterization of proliferative response to erythropoietin and steroids. *Br. J. Haematol.* 62: 705-714, 1986
- Viault F.** - Sur l'augmentation considérable du nombre des globules rouges dans le sang chez les habitants des hauts plateaux de l'Amérique du Sud. *Acad. Sci. Paris* 111: 918-919, 1890
- Wagemaker G., van Eijk H. und Lejnse B.** - A sensitive bio-assay for the determination of erythropoietin. A modification of the post-hypoxic polycythemic mice assay. *Clin. Chim. Acta* 36: 375-361, 1972
- Wang G.L. und Semenza G.L.** - Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270: 1230-1237, 1995
- Ward H.** - An in vitro assay of erythropoietin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125: 370-374, 1967
- Wang, G. L., Jiang B.H., Rue E.A. und Semenza G.L.** - Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5510-5514, 1995
- Wenger R.H. und Gassmann M.** - Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol. Chem.* 178: 609-616, 1997
-

Widness J.A., Clemons G.K., Garcia J.F. und Schwartz R. - Plasma immunoreactive erythropoietin in normal women studied sequentially during and after pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 149: 646-650, 1984

8. Anhang

8.1. Verwendete Abkürzungen

AK	Antikörper
amp	Ampicillin (ein Antibiotikum)
AMPS	Ammoniumpersulfat
Aqua Bid.	Zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	base pair, Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
BFU	Burst forming unit
CFU	Colony forming unit
cpm	Counts per minute
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxy-Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP('s)	Desoxy-Nukleotid Triphosphat(e)
Ec('s)	Erythrozyt(en)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
hEPO	Humanes Erythropoietin
HKT	Hämatokrit
kD	kilodalton
kb	kilobasen
LB	Luria Bertani
min	Minute
mRNA	messeger ribonucleid acid, Boten-Ribonucleinsäure
OD	optische Dichte
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
P _{O₂}	Sauerstoffpartialdruck
rhEPO	Rekombinantes humanes Erythropoietin
RIA	radio immuno assay
RNA	Ribonucleid acid, Ribonucleinsäure
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamid

8.2. Curriculum vitae

Vivian S. U. Aschkenasy

Geboren am 26. Dezember 1964 in Zürich.

1971 - 1980: Primar- und Sekundarschule in der Jüdischen Schule ZH

1980 - 1983: Talmudhochschule Jerusalem

1984 - 1988: Maturitätsschule für Erwachsene (AKAD) in Zürich
Abschluss 1988 mit Matura Typus C

1989: Heirat mit Rivka Rothschild von Zürich

1989 - 1996: Studium der Medizin an der Universität Zürich
Staatsexamen Oktober 1996 an der Universität Zürich

1996 - 1998: Assistenzarzt am Institut für Anästhesiologie USZ