

**Ein neuer und ungewöhnlicher Signalweg  
erlaubt physiologischen Konzentrationen  
von Erythropoetin mitogene Kinasen  
in primären erythroiden Vorläuferzellen  
zu aktivieren**

**Dissertation**

**zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Enrico Schmidt**

**aus Altenburg/Thüringen**

**Würzburg 2004**



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 1999 bis 2001 im Labor für Molekulare Onkologie des Instituts für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ) der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, sowie von 2001 bis 2003 in der Cell Signalling Group von Cancer Research UK am Weatherall Institute of Molecular Medicine in Oxford unter der Betreuung von Dr. habil Stephan M. Feller angefertigt. In der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg wurde die Arbeit durch Prof. Dr. Georg Krohne betreut.

**Eingereicht am:**

**Mitglieder der Promotionskommission:**

**Vorsitzender:**

**Gutachter:**

**Gutachter:**

**Tag des Promotionskolloquiums:**

**Doktorurkunde ausgehändigt am:**

## Inhalt

<b>1. Summary</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Protoonkogene und Signaltransduktion</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. Mitogen-aktivierte Signalwege</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3. Erythropoese in Säugetieren</b> .....	<b>8</b>
2.3.1. Der Ursprung des Bluts .....	9
2.3.2. Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) zu erythroiden Vorläuferzellen .....	10
2.3.3. Transkriptionsfaktoren in der Erythropoese .....	12
2.3.4. Terminale Reifung erythroider Vorläuferzellen.....	13
2.3.5. Änderungen der Zelloberfläche.....	14
2.3.6. Änderung der Genexpression während der erythroiden Differenzierung .....	15
2.3.7. Kontrolle der Erythropoese.....	16
2.3.8. Hypoxie.....	17
<b>2.4. Erythropoetin (Epo)</b> .....	<b>18</b>
2.4.1. Struktur .....	18
2.4.2. Ort und Regulierung der Epo-Produktion.....	19
2.4.2.1. Epo und tumorbedingte Anämie.....	20
2.4.2.2. Epo im Gehirn und anderen nichterythropoetischen Geweben.....	20
<b>2.5. Epo-induzierte Signalwege</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6. Aufgabenstellung</b> .....	<b>26</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1. Generierung von CD36<sup>+</sup> erythroiden Vorläuferzellen</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2. PI3-Kinase-abhängige Aktivierung von Ras, MEK und Erk durch minimale Konzentrationen an Epo</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3. PI3-Kinase gamma (PI3K<math>\gamma</math>) wird durch Epo aktiviert</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4. SHIP als möglicher negativer Regulator der PI3K</b> .....	<b>38</b>
<b>3.5. Die Aktivierung von B-Raf durch Epo ist nicht essentiell für die Aktivierung von MEKs und Erks</b> .....	<b>39</b>
<b>3.6. PKC-Inhibitoren blockieren die Epo-induzierte Aktivierung von MEKs und Erks</b> .....	<b>42</b>

<b>3.7. Suche nach Epo-aktivierten Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen.....</b>	<b>45</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Systeme zur Untersuchung von Epo-induzierten intrazellulären Signalen .....</b>	<b>47</b>
4.1.1. <i>In vivo</i> Analysen im Maus-Modell.....	47
4.1.2. Zelllinien als <i>in vitro</i> Modell .....	48
4.1.3. <i>In vitro</i> Untersuchungen von primären Zellen.....	49
<b>4.2. Inhibitoren .....</b>	<b>50</b>
<b>4.3. SCF/c-Kit-Signalkaskade als distinkter Signalweg der Erk-Aktivierung.....</b>	<b>51</b>
<b>4.4. PI3K als Vermittler der Epo-induzierten Erk-Aktivierung .....</b>	<b>52</b>
<b>4.5. Die Rolle der kleinen Ras-GTPasen.....</b>	<b>54</b>
<b>4.6. Die Funktion der Raf-Kinasen.....</b>	<b>55</b>
<b>4.7. Die Beteiligung von Kinasen der PKC-Familie.....</b>	<b>56</b>
<b>4.8. Der SH2-enhaltende Inositol-5-Phosphatase (SHIP)-Komplex.....</b>	<b>58</b>
<b>4.9. Jak2 und Src-Tyrosinkinasen .....</b>	<b>59</b>
<b>4.10. Ausblick .....</b>	<b>61</b>
<b>5. Material und Methoden.....</b>	<b>62</b>
<b>5.1. Arbeitsmaterialien.....</b>	<b>62</b>
5.1.1. Geräte.....	62
5.1.2. Chemikalien und Reagenzien.....	63
5.1.3. Zellkulturmaterial.....	64
5.1.4. Inhibitoren.....	64
5.1.5. Antikörper .....	65
5.1.6. Plasmide und Expressionsvektoren .....	67
5.1.7. Zellen .....	67
5.1.8. Lösungen und Puffer .....	67
<b>5.2. Arbeitsmethoden .....</b>	<b>71</b>
5.2.1. Aufreinigung und Amplifikation humaner primärer hämato-poetischer Stammzellen...71	
5.2.1.1. Ficoll-Gradient .....	71
5.2.1.2. Magnetische Separation von CD34 <sup>+</sup> -Zellen .....	71
5.2.1.3. Magnetische Separation erythroider Vorläuferzellen.....	72
5.2.1.4. Einfrieren und Auftauen von CD34 <sup>+</sup> -Zellen.....	73
5.2.2. Immunphänotypisierungssassay .....	73
5.2.3. Zellstimulation, Lyse und Proteinquantifikation.....	74
5.2.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	75
5.2.5. Elektrottransfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Membran .....	76

5.2.6. Western-Blot (Immunblot).....	76
5.2.7. Immunpräzipitation .....	77
5.2.8. PI3-Kinase-Assay.....	77
5.2.9. Zellfraktionierung.....	78
5.2.10. Raf-MEK-gekoppelter Kinaseassay .....	79
5.2.11. Affinitätspräzipitation aktivierter GTPasen .....	79
5.2.12. Arbeiten mit Bakterienkulturen.....	80
5.2.12.1. Kultivierung und Lagerung durch Einfrieren.....	80
5.2.12.2. Herstellung kompetenter Bakterien .....	81
5.2.12.3. Transformation kompetenter Bakterien .....	81
5.2.12.4. Präparation von Plasmid-DNS aus Bakterienkulturen .....	82
5.2.12.5. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> .....	82
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>84</b>
<b><i>Danksagung</i> .....</b>	<b>94</b>
<b><i>Erklärung</i>.....</b>	<b>96</b>
<b><i>Curriculum Vitae</i> .....</b>	<b>97</b>
<b><i>Verzeichnis eigener Publikationen</i>.....</b>	<b>98</b>

## **1. Summary**

Stimulation of primary erythroid progenitors (PEPs) with erythropoietin (Epo) leads to the activation of the mitogenic kinases (extracellular signal-regulated kinases (Erks) and mitogen-activated protein kinase/Erk-activating kinases (MEKs)). So far, it has been unclear how this is mechanistically accomplished. Moreover, several research groups unexpectedly found that truncation and mutation of the cytoplasmic tail of the Epo receptor (EpoR), which prevents binding of numerous signal-transducing proteins, had apparently little effect on EpoR signalling. These results are supported by viability and normal erythrocyte counts of mutant mice. A novel pathway, now unraveled by biochemical studies in human cord blood-derived PEPs, might explain these puzzling findings.

We show, for the first time, that Ras and the class Ib enzyme of the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) family, PI3K $\gamma$ , are activated in response to physiological Epo concentrations. Surprisingly, Ras, MEK and Erk activation by Epo in PEPs can be blocked by three structurally different PI3K inhibitors. Furthermore, Erk activation in PEPs is insensitive to the inhibition of Raf kinase but suppressed upon protein kinase C (PKC) inhibition. In contrast, Erk activation induced by stem cell factor (SCF), which activates c-Kit in the same cells, is sensitive to Raf inhibitors and insensitive to PI3K and PKC inhibitors.

These results indicate that the activation of MEKs and Erks by minimal concentrations of Epo in PEPs does not occur through the classical cascade Src homology 2 domain-containing transforming protein C (Shc), growth factor receptor bound protein 2 (Grb2), son of sevenless (Sos), Ras, Raf, MEK and Erk. Instead, MEKs and Erks are activated via PI3K, through a Raf-independent signalling pathway which requires PKC activity.

## **1. Zusammenfassung**

Die Stimulation primärer erythroider Vorläuferzellen (PEPs) mit Erythropoetin (Epo) führt zur Aktivierung der mitogenen Kinasen („extracellular signal-regulated kinases“ (Erks) und „mitogen-activated protein kinase/Erk-activating kinases“ (MEKs)). Der Mechanismus der Aktivierung war bisher unklar. Mehrere wissenschaftliche Gruppen haben zudem unerwartet herausgefunden, dass eine Verkürzung und Mutation des zytoplasmatischen Endes des Epo-Rezeptors (EpoR), welche zum Verlust der Bindungsmöglichkeiten für verschiedene Signalproteine führt, anscheinend nur einen geringen Effekt auf das EpoR-Signalsystem hat. Diese Ergebnisse werden durch Viabilität und normaler Erythrozytenzahl von mutierten Mäusen unterstützt. Ein neuer Signalweg, der in biochemischen Studien mit aus menschlichem Nabelschnurblut gewonnenen PEPs gefunden wurde, könnte diese überraschenden Ergebnisse erklären.

Wir zeigen zum ersten mal, dass Ras und das Klasse 1b Enzym der Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K), PI3K $\gamma$ , nach Stimulation mit einer physiologischen Konzentration von Epo aktiviert werden. Überraschenderweise kann in PEPs die Epo-induzierte Ras-, MEK- und Erk-Aktivierung durch drei strukturell unterschiedliche PI3K-Inhibitoren blockiert werden. Überdies ist die Erk-Aktivierung in PEPs unempfindlich gegenüber Inhibierung der Raf-Kinasen, wird aber durch Proteinkinase C (PKC)-Inhibitoren unterdrückt. Im Gegensatz dazu ist die durch Stammzellularfaktor („stem cell factor“ (SCF)) induzierte Erk-Aktivierung empfindlich gegenüber Raf-Inhibierung, jedoch unempfindlich gegenüber PI3K- und PKC-Inhibitoren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von MEKs und Erks in PEPs durch geringe Konzentrationen an Epo nicht durch die klassische Signalkaskade „Src homology 2 domain-containing transforming protein C“ (Shc), „growth factor receptor bound protein 2“ (Grb2), „son of sevenless“ (Sos), Ras, Raf, MEK und Erk erfolgt, sondern durch einen PI3K-abhängigen und Raf-unabhängigen Signalweg, welcher PKC-Aktivität benötigt, reguliert wird.



## **2. Einleitung**

### **2.1. Protoonkogene und Signaltransduktion**

Vielzellige Organismen müssen auf inter- und intrazellulären Ebenen kommunizieren, um Prozesse, wie Wachstum, Reizweiterleitung, Entwicklung und Bewegung gezielt zu koordinieren. Dazu steuern Nerven, Hormone und Wachstumsfaktoren als Informationsträger in einzelnen Zellen und Geweben motorische, sekretorische, proliferative und migratorische Prozesse. Darüber hinaus bestimmen auch direkte Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte über Funktion und Schicksal von Zellen. Um das Muster der Genexpression einer Zelle zu verändern, müssen extrazelluläre Informationen von Rezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt, in die Zelle weitergeleitet und in eine intrazelluläre Antwort übersetzt werden. Dieser Prozess wird Signaltransduktion genannt und umfasst ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden. Die im Netzwerk integrierten Signale regulieren zelluläre Antworten, wie Proliferation, Differenzierung, Sekretion und Apoptose.

Einen wesentlichen Fortschritt in der Erforschung der Signaltransduktion brachte die Entdeckung der retroviralen Onkogene. Bereits 1911 isolierte Peyton Rous ein Retrovirus, welches in Hühnern Tumore auslöst. In den 70er und 80er Jahren wurden dann die retroviralen Gene identifiziert, die für die Tumorbildung durch verschiedene Onkoviren verschiedener Tierarten verantwortlich sind (z.B. *v-src*, *v-ras*, *v-raf* und *v-fos*). Die retroviralen Onkogene besitzen zelluläre Gegenstücke, welche wichtige Funktionen in der Weiterleitung normaler zellulärer Signale haben. Onkogene entstehen durch Veränderungen von normalen Gensequenzen, die für Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung eine Rolle spielen. Die sogenannten Protoonkogene sind potentielle Vorstufen von Onkogenen und werden durch schädliche Einflüsse, wie radioaktive Strahlung, chemische Substanzen oder Viren in die krebserzeugenden Formen umgewandelt. Es sind heute mehr als 50 Protoonkogene bekannt. Protoonkogene werden anhand der kodierten Proteine in mehrere Gruppen eingeteilt: Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Guaninnukleotid-Bindeproteine (G-Proteine), Nichtrezeptor-

Proteinkinasen, wie zum Beispiel Tyrosinkinasen oder Serin-/Threoninkinasen und nukleäre Transkriptionsfaktoren. (Cooper, 1995)

Mit Ausnahme der lipophilen Steroidhormone und Retinoide, welche durch die Zytoplasmamembran in die Zelle eindringen, werden Signalkaskaden im allgemeinen durch die Bindung von extrazellulären Liganden wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Neurotransmittern oder Hormonen an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche ausgelöst. Diese Rezeptoren übertragen den Stimulus ins Zellinnere, wo das Signal oft amplifiziert und in den Zellkern geleitet wird, um dort letztendlich eine Veränderung im Muster der Genexpression zu bewirken. Es existieren verschiedene Klassen von Rezeptoren. Membranständige Rezeptoren mit intrinsischer enzymatischer Aktivität werden unterteilt in:

- Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie z.B. Blutplättchenwachstumsfaktor-Rezeptor („platelet-derived growth factor receptor“; PDGFR), Insulin-Rezeptor, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor („epidermal growth factor receptor“; EGFR) und Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor („nerve growth factor receptor“; NGFR),
- Rezeptor-Tyrosinphosphatasen, wie z.B. CD45,
- Guanylatzyklasen, wie z.B. Natriuretischer Peptid-Rezeptor,
- Rezeptor-Serin/Threoninkinasen, wie z.B. Tumorstrompfaktor- $\beta$ -Rezeptor („tumour growth factor  $\beta$  receptor“; TGF- $\beta$ -R).

Solche Rezeptoren sind im Stande sowohl sich selbst als auch andere Substrate zu phosphorylieren. Es existieren auch membranständige Rezeptoren, wie z.B. der Erythropoetin-Rezeptor (EpoR), welche keine intrinsische Enzymaktivität besitzen und von intrazellulären Tyrosinkinasen abhängig sind. Eine andere Klasse von Rezeptoren ist an intrazelluläre GTP-bindende und -hydrolysierende Proteine (G-Proteine) gekoppelt. Diese Rezeptoren besitzen sieben Transmembrandomänen und werden auch Serpentin-Rezeptoren genannt (z.B. Glukagon-, Angiotensin-, Vasopressin- und Bradykinin-Rezeptor). Eine dritte Klasse von Rezeptoren existiert intrazellulär und wandert nach Ligandenbindung direkt in den Zellkern, wo der Rezeptor-Ligand-Komplex direkt die Transkription aktiviert (z.B. Steroidhormon-Rezeptoren). (Alberts, 1994)

An der Ausbreitung und Weiterleitung des primären Signals sind eine Vielzahl von Proteinen mit diversen Funktionen beteiligt, welche das Signal durch posttranslationale Veränderungen anderer intrazellulärer Proteine modifiziert. So ist die Übertragung einer Phosphatgruppe vom Adenosintriphosphat (ATP) auf ein Zielprotein eine der meist genutzten Modifikationen und spielt eine prominente Rolle in nahezu allen Signalereignissen (van der Geer et al., 1994). Diese Phosphorylierung führt oft zur Aktivierung oder Deaktivierung eines Proteins. Enzyme, die für den Status der Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen verantwortlich sind und somit über die Weiterleitung eines Signals in der Zelle entscheiden können, sind Proteinkinasen und -phosphatasen. Eine Veränderung der Konzentration, subzellulären Lokalisation oder Aktivität solcher Enzyme hat folglich Konsequenzen für die normale Zellfunktion und Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase (De Meyts et al., 1995; Denton und Tavare, 1995).

Um ein Signal von Protein zu Protein zu übertragen, benötigt es unter bestimmten Umständen auch eine direkte Interaktion. Dies kann durch Protein-Bindungsmodule, wie z.B. Src-Homologie-2 (SH2)-Domänen und SH3-Domänen vermittelt werden. SH2-Domänen binden an phosphorylierte Tyrosine, wobei die drei auf das Tyrosin folgenden Aminosäurereste die Spezifität bestimmen. SH3-Domänen binden an Proteinepitope, die meist eine Poly-Prolin-Helix des TypII ausbilden (Pawson und Nash, 2003). Eine indirekte Signalübertragung kann z.B. durch Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen erfolgen. PH-Domänen binden an Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP<sub>3</sub>), ein Produkt der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) (Itoh und Takenawa, 2002) in Zellmembranen, was zur Translokation von Signalproteinen ohne direkten Kontakt mit PI3K führt.

Neben Rezeptoren und Enzymen spielen auch sogenannte Adapterproteine eine wichtige Rolle. Sie haben keine intrinsische Enzym- oder Transkriptionsaktivität und bestehen aus Bindungsregionen und/oder Bindungsmodulen, wie z.B. SH2-, SH3- oder PH-Domänen. Durch die Herstellung einer schnellen und präzisen Verbindung zwischen den in der Signalkaskade beteiligten Proteinen beeinflussen sie die Organisation und Dynamik der Signalnetzwerke. Es existieren zytoplasmatische, wie z.B. „growth factor receptor-bound protein 2“ (Grb2), „Src homology 2 domain-containing transforming protein C“ (Shc),

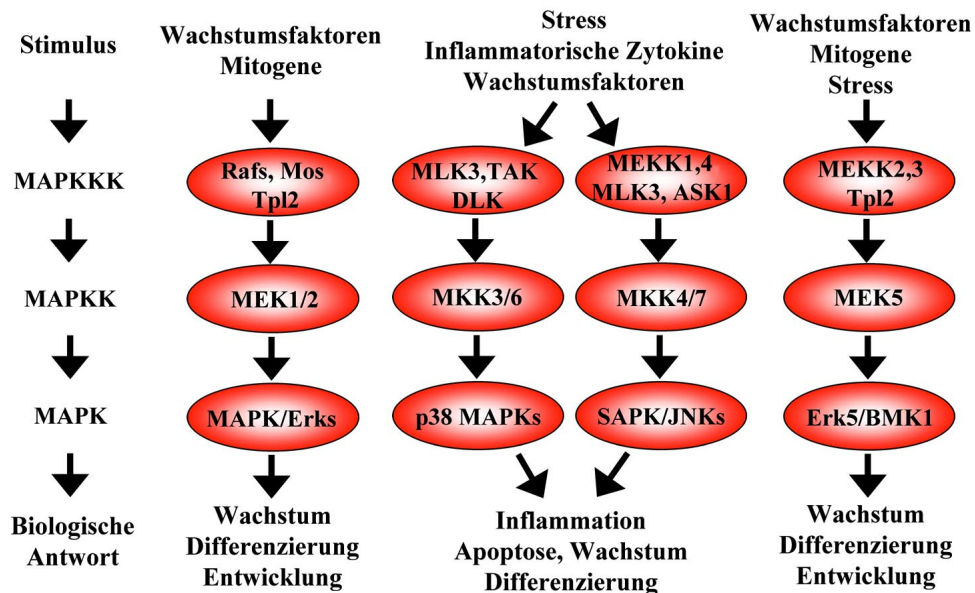
„Grb2-related adapter downstream of Shc“ (Gads) und „non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1“ (Nck-1), aber auch transmembranständige Adapterproteine, wie z.B. „linker for activation of T-cells“ (LAT), „tripartite motif protein“ (TRIM) und „SHP2-interacting transmembrane adaptor“ (SIT) (Lindquist et al., 2003).

Wie schon erwähnt, wird das Verhalten einer Zelle durch das Muster der Genexpression geprägt. Das erklärt die relativ hohe Anzahl von Proteinen, die im Zellkern lokalisiert sind und durch Interaktion mit spezifischen regulatorischen DNS-Sequenzen die Transkription regulieren. Sobald ein Transkriptionsfaktor an DNS bindet, wird die Expression des Zielgens durch Interaktionen mit anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie erhöht. Das bedeutet, dass ein Transkriptionsfaktor mindestens zwei funktionelle Domänen besitzt: eine zur spezifischen Bindung an die DNS und eine Aktivierungsdomäne, die für die Stimulation der Transkription über Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist (Cooper, 1995). Die Regulierung der Expression und Funktion von Transkriptionsfaktoren gibt der Zelle ein leistungsstarkes Kontrollsystem für die induzierbare und gewebespezifische Genexpression.

## 2.2. Mitogen-aktivierte Signalwege

Signale, die Wachstum auslösen, werden in der Regel über die, wahrscheinlich am besten untersuchte, mitogen-aktivierte Proteinkaskade Ras-Raf- „mitogen-activated protein kinase/Erk-activating kinase“ (MEK)- „extracellular signal-regulated kinase“ (Erk) weitergeleitet. Die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) sind eine Familie von Protein-Serin-/Threoninkinasen, welche evolutionär hoch konserviert sind und eine Rolle in der Signaltransduktion von Hefen über Insekten und Amphibien bis hinzu Säugern spielen. Die beiden am besten charakterisierten MAPKs sind Erk1 und Erk2, zwei verwandte Proteine mit einem Molekulargewicht von 44 und 42 kDa (Boulton und Cobb, 1991). Erks werden durch Doppelphosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten aktiviert (Rossomando et al., 1992). Diese aktivierungsspezifischen Phosphorylierungen werden durch die Proteinkinasen der MAPK-Kinasefamilie (MKKs) oder die MEK-Kinasen katalysiert. MEK1 und MEK2 (Abbildung 1), zwei eng verwandte Proteine, welche in

Säugetern vorkommen (Otsu et al., 1993; Zheng und Guan, 1993), werden durch Phosphorylierung von Serinresten aktiviert (Abbildung 1).



**Abb. 1: Die MAPK-Signalkaskaden (übernommen vom Firmenkatalog der Firma Cell Signaling Technology und modifiziert).**

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) sind eine hoch konservierte Familie von Serin-/Threoninkinasen, welche in zahlreichen intrazellulären Programmen, wie Proliferation, Differenzierung, Zellbewegung und Zelltod eine Rolle spielen. MAPK-Signalkaskaden sind im allgemeinen in drei Ebenen untergliedert. MAPKs werden durch MAPK-Kinasen (MAPKKs) phosphoryliert und aktiviert, welche wiederum durch MAPKK-Kinasen phosphoryliert und aktiviert werden. Die MAPKKKs werden durch die Interaktion mit kleinen GTPasen und/oder anderen Proteinkinasen, die eine Verbindung der MAPK-Signalkaskade zu Zellmembranrezeptoren oder externen Stimuli ermöglichen, aktiviert.

Kleine G-Proteine der Ras-Familie (Guanosin-Triphosphatasen (GTPasen)) sind in ca. 25% aller Tumoren mutiert und spielen in der Weiterleitung von mitogenen Signalen eine zentrale Rolle. Sie existieren als Guanosin-Diphosphat (GDP)-gebundene inaktive oder als GTP-gebundene aktive Formen. Die Freisetzung von GDP wird durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren („guanine nucleotide exchange factors“; GEFs) katalysiert und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) stimulieren die GTP-Hydrolyse (Cales et al., 1988; Shih et al., 1980; Wolfman und Macara, 1990). Der aktivierte Ras•GTP-Komplex kann mit Effektorproteinen interagieren, um das mitogene Signal weiterzuleiten. In Säugern, wie auch in *Drosophila* und *C. elegans* ist die Serin-/Threoninkinase Raf ein

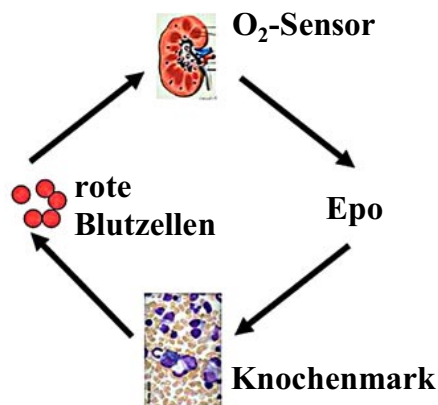
wichtiges Ras-Target (Chong et al., 2003). Die Bindung von Ras•GTP an Raf dient nicht der direkten Aktivierung der Raf-Kinase, sondern der Rekrutierung von Raf an die Zytoplasmamembran, wo es aktiviert wird (Morrison et al., 1988). Aktiviertes Raf phosphoryliert und aktiviert MEKs und ist somit eine direkte Verbindung zwischen Ras und MAPKs.

Neben der als Prototyp geltenden Ras-Raf-MEK-Erk-Kaskade existieren noch weitere ähnlich aufgebaute MAPK-Kaskaden, wie die Stress-aktivierten „stress activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase“ (SAPK/JNK)- und p38-Kaskaden oder auch die zur Aktivierung der „big MAPK 1“ (BMK1, auch Erk5 genannt) führenden Kaskade (Abbildung 1). Intrazelluläre Signalwege sind jedoch keinesfalls immer linear, sondern existieren oft als komplexe Netzwerke inhibierender und aktivierender Querverbindungen.

### **2.3. Erythropoese in Säugetieren**

Der Prozess der Erythropoese umfasst alle Schritte der Hämatopoese, also nicht nur die Spezialisierung hämatopoetischer Stammzellen („haematopoietic stem cells“; HSCs) des Mesoderms während der Embryogenese und die Entscheidung dieser Zellen eine Selbsterneuerung oder initiale Differenzierung zu untergehen, sondern auch die terminale Richtungsspezifikation und Proliferation, was zur Entwicklung erythroider Vorläuferzellen und letztendlich zur postmitotischen Reifung der Erythroblasten zu roten Blutzellen (Erythrozyten) führt. Im gesunden Erwachsenen ist die Zahl der zirkulierenden Erythrozyten und deren Vorläufer in etwa konstant, wobei ein Gleichgewicht zwischen dem kontinuierlichen Verlust alternder Zellen und der Neuproduktion von Erythrozyten im Knochenmark besteht. Diese Balance ist durch ein System von Sauerstoffsensoren reguliert, welches die Zahl roter Blutzellen detektiert und bei Bedarf die Produktion von Erythropoetin induziert, welches seinerseits die rote Zellproduktion erhöht (Abbildung 2) (Lappin et al., 2002). Auch Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Hormone können die Proliferation, Differenzierung und Reifung von Erythrozyten beeinflussen.

Das Verständnis der Biologie der Erythropoese bildet die Basis für eine bessere Diagnose und Behandlung der in der klinischen Praxis sehr häufig vorkommenden vererbaren oder erworbenen Anämien.



**Abb. 2: Die endokrine Rückkopplung durch Erythropoetin (Epo).**  
Von Lappin et al. (Lappin et al., 2002) übernommen und modifiziert.

### 2.3.1. Der Ursprung des Bluts

Die Hämatopoese beginnt etwa am 21. Tag der humanen Embryonalentwicklung in den Blutinseln des extraembryonalen Dottersacks. Ungefähr eine Woche später entstehen hämatopoetische Stammzellen aus der Vitellinearterie und der ventralen Wand der embryonalen Aorta innerhalb der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM)-Region. Embryonale und fötale/adulte hämatopoetische Stammzellen erscheinen zusammen mit endothelialen Zellen und besitzen einen gemeinsamen Vorläufer, den Hämangioblasten, welcher Blutzellen und Blutgefäße bilden kann (Suda et al., 2000). Am 30.-40. Tag beginnt die Hämatopoese in der fötalen Leber und am 60. Tag werden erste erythroide Zellen in den Blutkreislauf freigesetzt. Nach 10-12 Wochen verlagert sich die Hämatopoese ins Knochenmark, wo schließlich spezielle Regionen (Inseln) für die Erythropoese etabliert werden. (Hanspal, 1997; Lee und Wintrobe, 1993)

Embryonale, fötale und adulte erythropoetische Stammzellen unterscheiden sich durch ihre Morphologie, Oberflächenmarker, Reaktion auf Zytokine, Wachstumskinetik, Transkriptionsfaktor-Programme und ihr allgemeines Muster der Genexpression. Es ist nicht klar, ob in Säugern die embryonale und fötale/adulte Hämatopoese unterschiedliche Ursprünge haben oder von gemeinsamen Stammzellen abstammen.

### **2.3.2. Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) zu erythroiden Vorläuferzellen**

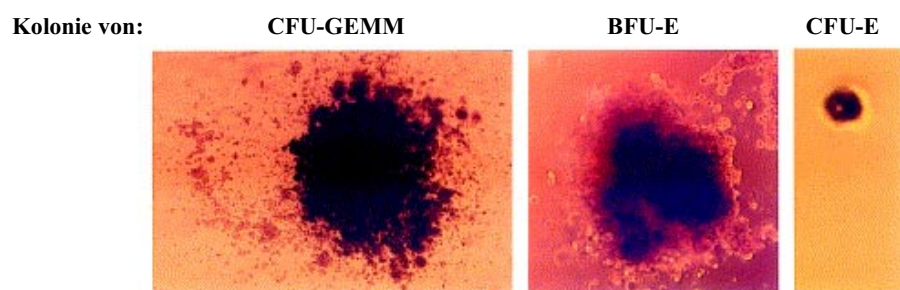
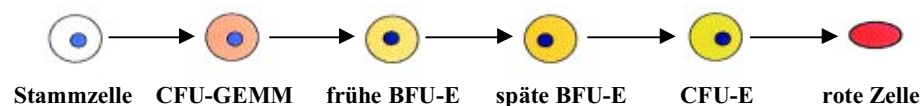
Während des gesamten Lebens ist eine Erneuerung alternder Blutzellen notwendig. Im adulten Organismus zum Beispiel müssen täglich  $10^{11}$  alternde Erythrozyten ersetzt werden, was für andere reife Blutzellen, wie z.B. Granulozyten oder Lymphozyten ähnlich ist. Um einen Schwund hämatopoetischer Zellen zu vermeiden, wird ein System benötigt, das sowohl den Pool selbsterneuernder Stammzellen kontrolliert als auch das Potenzial hat, alle Typen von hochspezialisierten reifen Blutzellen zu produzieren. (Lee und Wintrobe, 1993)

Die Mechanismen, denen die Selbsterneuerung und Differenzierung multipotenter HSCs in verschiedene Richtungen unterliegen, sind nicht völlig klar. Jedoch wird die Möglichkeit, sich in bestimmte Richtungen zu entwickeln, durch interne Transkriptionsprogramme, epigenetische Muster (z.B. Veränderung der nukleären Position, Replikationszeit, Chromatinmodifikation, DNS-Methylierung) und externe Signale (z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Zell-Zell-Interaktionen) beeinflusst. Interessanterweise zeigen sowohl hämatopoetische Stammzellen als auch ihre frühesten Vorläufer eine umfangreiche Genexpression und viele linienspezifische Gene sind schon in den HSCs transkribiert, wenn auch auf niedrigem Niveau. Während der Differenzierung in eine bestimmte Richtung müssen somit nicht nur linienspezifische Genexpressionsprogramme reaktiviert werden, sondern auch solche anderer Richtungen unterdrückt werden (Orkin, 2000).

Im humanen adulten Knochenmark ist eine von ungefähr  $10^4$  kernhaltigen Zellen eine langlebige multipotente hämatopoetische Stammzelle, die mit Hilfe ihrer Oberflächenmarker identifiziert und angereichert werden kann (z.B.  $CD33^+$ ,  $CD34^+$  und negativ für richtungsspezifische Marker). Der entscheidende Test für HSCs besteht im Nachweis der Fähigkeit sich *in vivo* in alle hämatopoetische Richtungen differenzieren zu können. Das wurde in Mäusen demonstriert und auch die vielfachen Erfolge humaner Knochenmarkstransplantationen belegen die Existenz solcher Zellen im Menschen. (Beutler und Williams, 1995; Till und Mc Culloch, 1961)



Die linienspezifische Entwicklung führt zur Bildung multipotenter Vorläuferzellen, jedoch unterdrücken weitere Differenzierungsschritte das multipotente Potential und die Kapazität zur Proliferation, was zur Entwicklung von tri-, bi- und schließlich unipotenten Vorläufern führt. *In vitro* bilden diese Vorläuferzellen Kolonien im halbfesten Agarmedium bei Präsenz aller notwendigen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Erythroide Vorläuferzellen sind in Mischkolonien zusammen mit Granulozyten, Makrophagen und Megakaryozyten („colony-forming unit granulocyte-erythroid-monocyte-megakaryocyte“; CFU-GEMM) oder in Kolonien zusammen mit Megakaryozyten („colony-forming unit erythroid/megakaryocyte“; CFU-E/Meg) zu finden (Abbildung 3). Frühe erythroide Vorläuferzellen produzieren *in vitro* nach 12-14 Tagen die ersten großen Kolonien („burst forming unit-erythroid“; BFU-E), welche aus 100-30000 Zellen bestehen. Im Knochenmark sind das 1000-2500 pro  $10^4$  kernhaltigen Zellen. Späte erythroide Vorläufer formen *in vitro* nach ca. sieben Tagen Kolonien (CFU-E) von 8-64 Zellen und im Knochenmark sind das 160-500 pro  $10^4$  Zellen. Diese Zellen unterlaufen eine weitere Entwicklung zu reifen roten Blutzellen. (Beutler und Williams, 1995; Constantinescu et al., 1999)



**Abb. 3: Die erythroide Linie.**

Von Constantinescu et al. (Constantinescu et al., 1999) übernommen und modifiziert.

Es sind drei verschiedene erythroide Kolonien gezeigt (CFU-GEMM, BFU-E, CFU-E), die im semisoliden Kulturmedium *in vitro* gewachsen sind. Die Vorläuferzellen dafür wurden aus fötalen Mäuselebern gewonnen und in Gegenwart geeigneter Wachstumsfaktoren kultiviert.

Obwohl erythroide Vorläuferzellen auch *in vitro* wachsen können, ist die erythroide Entwicklung im adulten Knochenmark sehr komplex. Stromazellen (Fibroblasten, Fettzellen, Epithelzellen, glatte Muskelzellen) erzeugen eine *in vitro* nicht simulierbare Mikroumgebung, in der darüber hinaus auch immunregulatorische Zellen (Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten) zu finden sind. Zusätzlich liegen Erythroblasten im Knochenmark keinesfalls zerstreut vor, sondern sind in erythroblastischen Inseln organisiert. Diese Inseln enthalten ein bis zwei zentrale Makrophagen, welche von Erythroblasten mit unterschiedlichem Differenzierungsstatus umgeben sind (Hanspal, 1997).

### 2.3.3. Transkriptionsfaktoren in der Erythropoese

In den letzten Jahren wurde klar, welche Transkriptionsfaktoren essentiell für Entstehung, Überleben, Proliferation und Differenzierung multipotenter Stammzellen sind. Diese Transkriptionsfaktoren arbeiten oft im Verbund mit anderen Regulatorproteinen. Viele dieser Transkriptionsfaktoren wurden durch die Analyse chromosomaler Translokationen in Leukämien identifiziert, was zeigt, dass Fehler im normalen Transkriptionsprogramm eine entscheidende Rolle bei malignen hämatologischen Veränderungen spielen.

Die bekanntesten und für die Spezialisierung hämatopoetischer Stammzellen, besonders in frühen Stadien der Entwicklung, wichtigsten Transkriptionsfaktoren sind „T-cell acute lymphocytic leukemia 1“ (TAL-1), „runt-related transcription factor 1“ (Runx-1), Tel, „LIM domain-only genes 2“ (LMO2), „myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3“ (MLL3) und GATA-2 (bindet an DNA-Motife mit „GATA“-Nukleotidsequenz). GATA-1, „friend of GATA“ (FOG-1) und „growth factor independent-1b“ (Gfi-1b) spielen während der Erythropoese und „nuclear factor-erythroid derived 2“ (NF-E2) und „erythroid krueppel-like transcription factor“ (EKLF) in der terminalen erythroiden Differenzierung eine Rolle (Cantor und Orkin, 2002; Orkin, 2000; Osawa et al., 2002). Wie genau diese Transkriptionsfaktoren während der Differenzierung erythroider Vorläuferzellen zusammenarbeiten, ist nicht klar. Denkbar sind eine Regulierung der Transkriptionsfaktoren auf Transkriptionsebene, aber auch deren

posttranskriptionelle Modifikation. Zudem können Transkriptionsfaktoren verschiedener Differenzierungsrichtungen miteinander interagieren. Z.B. können sich GATA1 und PU.1 in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren gegenseitig sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. So kommt es, abhängig vom molekularen Mechanismus dieser Interaktion, zur Unterdrückung der einen und Aktivierung der anderen Differenzierungsrichtung (Orkin, 2000).

#### **2.3.4. Terminale Reifung erythroider Vorläuferzellen**

Nachdem das erythroide Programm festgelegt wurde, erfolgt die letzte Phase der Erythropoese mit der Ausreifung erythroider Vorläuferzellen zu funktionellen Erythrozyten. Die am frühesten erkennbaren erythroiden Vorläufer im Knochenmark sind die relativ großen Pronormoblasten (14-19 Mikrometer), welche *in vitro* den CFU-Es entsprechen. Die Teilung dieser Zellen führt zu den etwas kleineren basophilen Normoblasten (12-17 Mikrometer), in denen der Zellkern einen Großteil der Zelle einnimmt. Weitere Teilungen führen zur Entstehung polychromatischer Normoblasten (12-15 Mikrometer), die einen kondensierten Zellkern (ca. 7-9 Mikrometer) aufweisen und sich weiter zu sich nicht mehr teilenden orthochromatischen Normoblasten (8-12 Mikrometer) entwickeln. Während der terminalen Differenzierung kondensiert der Zellkern und wird schließlich ausgestoßen. Nach der Freisetzung aus dem Knochenmark synthetisieren die zellkernlosen Retikulozyten für weitere 24-48 h Hämoglobin, bevor es zum Abbau weiterer Organellen (z.B. Mitochondrien, Ribosomen) und somit zur Entstehung von Erythrozyten kommt. Diese sind runde flache und bikonkave Scheiben mit einem Durchmesser von 8,5 Mikrometer. (Lee und Wintrobe, 1993)

Erythroide Vorläuferzellen teilen sich insgesamt viermal, so dass aus jedem Pronormoblasten maximal 16 rote Blutzellen entstehen können (Schumacher und Erslev, 1956). Normalerweise wird diese Zahl aber nicht erreicht, da einige Zellen während der Entwicklung durch Apoptose sterben.

### 2.3.5. Änderungen der Zelloberfläche

Der Phänotyp der Zelloberfläche erythroider Vorläuferzellen variiert sehr stark während der Differenzierung, was die Aktivierung verschiedener Signalprogramme widerspiegelt. Die Oberflächenmarker sind für die Aufreinigung, Identifizierung und Analyse von Subpopulationen erythroider Vorläuferzellen von großer Bedeutung. CD34 befindet sich auf nahezu allen multipotenten Vorläuferzellen, sowie auf BFU-Es und CFU-Es. Ein ähnliches Expressionsmuster hat der SCF-Rezeptor (c-Kit). Die früheste Expression des Epo-Rezeptors (EpoR) findet sich in BFU-Es wo 20-50 Moleküle pro Zelle detektiert werden. Während der Entwicklung zu CFU-Es und Pronormoblasten steigt diese Zahl auf ca. 1000 Moleküle, um bei weiterentwickelten erythroiden Zellen schließlich wieder zu sinken und komplett zu verschwinden (Sawyer, 1990). Der Transferrin-Rezeptor (CD71) erlaubt der Zelle das mit Eisen beladene Transferrin aufzunehmen und wird stark auf Zellen exprimiert, welche aktiv Hämoglobin synthetisieren. So befinden sich auf polychromatophilen Normoblasten ca. 800000 Moleküle pro Zelle. Auf reifen Erythrozyten ist CD71 nicht mehr detektierbar (Chitambar und Zivkovic, 1989). Glykophorin A (GpA) ist ein Membranprotein, dessen Expression hochreguliert wird, wenn erythroide Vorläufer zu Proerythroblasten reifen (Freyssinier et al., 1999). Darüber hinaus exprimieren sich entwickelnde erythroide Zellen auch Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche, die mit der extrazellulären Matrix interagieren, so z.B. interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 („intercellular adhesion molecule-1“; ICAM-1), ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie,  $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin VLA4 (CD29), was an Fibronectin bindet (Oostendorp und Dormer, 1997) und der multifunktionelle Glykoprotein-Rezeptor CD36, welcher an Thrombospondin, Kollagen, Lipoproteine oder Phosphatidylserine bindet (Freyssinier et al., 1999). Diese Adhäsionsmoleküle sind in Vorläuferzellen exprimiert und gehen im Laufe der Reifung verloren, um die optimale Freilassung der Zellen aus dem Knochenmark zu gewährleisten.

### **2.3.6. Änderung der Genexpression während der erythroiden Differenzierung**

Die letzten Schritte der Erythropoese und postmitotischen Reifung sind durch eine progressive Chromatinkondensation geprägt, was mit einer komplexen Änderung der Genexpression verbunden ist. Sobald multipotente Vorläuferzellen in die Phase der terminalen Differenzierung eintreten, wird die Expression zahlreicher Gene herunterreguliert, was die Reifung dieser Zellen in spezialisierte Linien widerspiegelt. Dagegen werden mRNAs für Proteine, die den roten Blutzelltyp charakterisieren, hochreguliert. Das sind z.B. Blutgruppenantigene, Membranmoleküle (z.B. Spektrin, Ankyrin, Aktin, Protein 4.1), glykolytische Enzyme, kohlenstoffhaltige Anhydrasen und Enzyme der Hämsynthese (z.B. ALA-Synthase) (Referenz: <http://hembase.niddk.nih.gov>).

Das Hauptziel der Erythropoese ist die Synthese großer Mengen an hämoglobinhaltigen Zellen. Globin-mRNA wird erstmals in Proerythroblasten und frühen basophilen Erythroblasten exprimiert und erreicht die höchste Konzentration in orthochromatischen Erythroblasten. Während später Phasen der erythroiden Zellreifung nimmt die Menge an mRNA, sowie die totale Proteinsynthese deutlich ab. Jedoch stellt die Stabilität der Globin-mRNA sicher, dass Globin das dominante Polypeptid in späten Erythroblasten und Retikulozyten ist. (Lee und Wintrobe, 1993)

Die einzelnen Komponenten der Hämoglobinsynthese (Eisen, freie Porphyrine, Häm, monomere Globinketten) sind alle extrem toxisch für die Zelle, weshalb positive und negative Rückkopplungsprozesse existieren, um die Synthese von Globin mit der Synthese von Häm genau abzustimmen. So werden mRNAs der Hämbiosynthese (z.B. ALA-Synthase und porphobilinogene Deaminase) gemeinsam hochreguliert, da deren Gene ähnliche cis-regulatorische Elemente enthalten (Lee und Wintrobe, 1993). Die weitere Translation von Globinketten erfolgt nur in der Gegenwart einer äquivalenten Konzentration an Häm. Reduzierte Mengen an Häm induzieren sofort die Bildung des „Häm-regulierenden Inhibitors“, einer Kinase, die mit dem Elongationsfaktor eIF-2 $\alpha$  interagiert und die Translation der Globin-mRNA unterdrückt (Lu et al., 2001). Auch die Synthese von Häm ist mehrfach reguliert und an die Menge verfügbaren Eisens angepasst.

Die intrazelluläre Eisenkonzentration reguliert über das „Iron regulatory protein“ (IRP) und „Iron-responsive element“ (IRE) die Hämsynthese, Eisentransport und -speicherung (Tapiero et al., 2001). Somit ist klar, warum Krankheiten, welche Eisenzufuhr (Eisenmangel und Anämie bei chronischen Infektionen), Hämsynthese (sideroblastische Anämie, Bleivergiftung, Alkoholeinnahme) oder Globinsynthese (Thalassämie) beeinträchtigen, Nebeneffekte auf Globinsynthese, Hämsynthese und Eisenmetabolismus haben.

Derzeit wird angenommen, dass Gehalt und Konzentration an Hämoglobin regulatorische Rollen in der Zellteilung spielen können. Wenn z.B. durch Eisenmangel die Hämoglobinsynthese gestört ist, dann durchlaufen die Zellen eine zusätzlichen Teilung, wodurch kleinere hypochromische Zellen entstehen. Auf der anderen Seite lassen diese Zellen eine Teilung aus, wenn die Hämoglobinsynthese, wie bei der megaloblastischen Anämie, erhöht ist. Damit erfolgt auch der Ausstoß des Zellkernes früher, was zur Makrozytose führt. (Lee und Wintrobe, 1993)

### **2.3.7. Kontrolle der Erythropoese**

Die Lebenserwartung normaler Erythrozyten beträgt ca. 120 Tage. Um ein gesundes Gleichgewicht zu erhalten, müssen täglich etwa 0,8% dieser Zellen ersetzt werden. Das bedeutet, dass bei insgesamt  $3 \times 10^{13}$  roter Blutzellen im Erwachsenen ungefähr  $10^{10}$  neue Erythrozyten pro Stunde produziert werden müssen. Wenn determinierte erythroide Zellen sich zu späten BFU-Es und CFU-Es entwickeln, dann wird die Expression des Erythropoetin-Rezeptors (EpoR) hochreguliert. Die Signale, die nach der Bindung von Epo durch diesen Rezeptor induziert werden, verhindern die Apoptose (kontrollierter Zelltod) und stimulieren Proliferation und Differenzierung. Deshalb hat das Stadium der späten BFU-Es und CFU-Es ein beachtliches Potential für die Kontrolle der nachfolgenden Erythropoese. Kurz nachdem Zellen das Stadium der späten CFU-Es erreichen, beginnt die terminale Differenzierung, wo nur noch ein sehr eingeschränktes Potenzial für eine weitere Expansion vorhanden ist. Hypoxie reguliert den Nachschub an erythroiden Vorläuferzellen, hauptsächlich über die Epo/EpoR-Signalkaskade.

### 2.3.8. Hypoxie

Neben der Aktivierung der Epo/EpoR-Signalkaskade induziert Hypoxie (herabgesetzter Sauerstoffpartialdruck im venösen Blut und in Geweben) eine Reihe physiologischer Antworten, z.B. die Stimulation der Bildung neuer Blutgefäße durch den Gefäßendothel-Wachstumsfaktor („vascular endothelial growth factor“; VEGF) oder metabolische Veränderungen z.B. durch Glykolyseenzyme, was die kontinuierliche Energieversorgung trotz Sauerstoffmangels ermöglicht. Auch die Expression des Transferrin-Rezeptors wird unter Hypoxie hochreguliert. Im Zentrum der Hypoxie-vermittelten Genregulierung steht der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor-1), welcher Gene aktiviert, die z.B. für Epo, Glykolyseenzym, Transferrin-Rezeptor und VEGF kodieren. (Harris, 2002)

HIF ist ein Heterodimer, welches aus einer der drei Alpha-Untereinheiten (HIF1- $\alpha$ , HIF2- $\alpha$  und HIF3- $\alpha$ ) und HIF1- $\beta$ , auch „aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ (ARNT) genannt, besteht. Während eine Änderung des Sauerstoffgehalts keinen Effekt auf das konstitutiv exprimierte HIF1- $\beta$  hat, steigert Hypoxie die Konzentration von HIF1- $\alpha$ -Untereinheiten, durch die Erhöhung von deren Proteinstabilität. HIF1- $\alpha$  ist ein Transkriptionsfaktor der „basic Helix-Loop-Helix“ (bHLH) Familie, wobei die HLH-Domäne die Dimerisation der Untereinheiten vermittelt und positiv geladene Aminosäuren an die DNS binden (Wang et al., 1995). Die transkriptionelle Regulierung Hypoxie-induzierter Gene wird durch die Bindung von HIF an „hypoxia response element“ (HRE) vermittelt.

Ein Sauerstoffsensoren (wahrscheinlich eine Prolylhydroxylase), welcher Eisenionen und Sauerstoff als Kosubstrate benötigt, hydroxyliert spezifische Prolinreste in der  $\alpha$ -Untereinheit von HIF1- $\alpha$  (Ivan et al., 2002). Durch diese Hydroxylierung können HIF1- $\alpha$ -Untereinheiten ubiquitiniert und durch die ubiquitär exprimierten von Hippel Lindau (VHL)-Proteine degradiert werden (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Bei normalen Sauerstoffgehalt im Gewebe ist die  $\alpha$ -Untereinheit nicht geschützt, aber wenn Zellen einem hypoxischen Stimulus ausgesetzt werden, dann kann der Sauerstoffsensoren die  $\alpha$ -Untereinheit von HIF nicht länger hydroxylieren. Damit können die  $\alpha$ -Untereinheiten nicht polyubiquitiniert und degradiert werden und akkumulieren in der Zelle. Das erlaubt

den  $\alpha$ -Untereinheiten mit HIF1- $\beta$  zu dimerisieren und relevante Gene zu aktivieren. Im von Hippel Lindau Syndrom ist das VHL-Protein mutiert, was eine Dauerstimulation des HIF1- $\alpha$ -Signalwegs zur Folge hat und zur Erythrozytose (durch EpoR-Stimulation) und Gefäßtumoren (durch VEGFR-Stimulation) führt.

## **2.4. Erythropoetin (Epo)**

### **2.4.1. Struktur**

Epo ist ein Glykoprotein-Hormon mit einem Molekulargewicht von 34 kDa und ist der hormonelle Hauptregulator der Erythrozytenproduktion. Die erste Beschreibung eines erythropoetischen Hormons resultierte aus der Beobachtung eines erhöhten Retikulozytenspiegels in Tieren, die sauerstoffunterversorgt oder anämisch waren (Reissman, 1950), bzw. denen Serum eines anämischen Tieres gespritzt wurde (Erslev, 1953).

Epo wurde ursprünglich aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie aufgereinigt (Miyake et al., 1977). Nach der Sequenzierung des Proteins wurde die humane cDNA isoliert (Jacobs et al., 1985), das Epo-kodierende Gen in Säugetierzelllinien exprimiert und somit rekombinantes humanes Epo (rhuEpo) produziert. Die Therapie mit rhuEpo führt z.B. zur Verbesserung der Lebensqualität urämischer Patienten durch die Normalisierung des Hämatokrits oder durch die Wiederherstellung und Regulierung des menstrualen Zyklus (Moreno et al., 2000). Die Potenz von Epo ist in Einheiten (E) angegeben, wobei 1 E einem Zehntel der „Internationalen Referenzpräparation“ entspricht (Cotes und Bangham, 1966). Im Nabelschnurblut findet man zum Zeitpunkt der Geburt 25-50 mE/ml Epo und im Erwachsenen eine Konzentration von ungefähr 10-30 mE/ml. Diese kann aber in Folge pathologischer Veränderungen, wie z.B. starkem Blutverlust auf 3-10 E/ml ansteigen (Beutler und Williams, 1995). Epo hat im Blut eine Halbwertszeit von ungefähr 5 h.

Die Analyse der Aminosäuresequenzen von menschlichem und murinem Epo zeigt eine hohe Konservierung zwischen diesen beiden Spezies (McDonald et al., 1986).



### 2.4.2. Ort und Regulierung der Epo-Produktion

Vor ca. 45 Jahren wurde die Niere als das wichtigste Organ der Epo-Produktion entdeckt (Jacobson, 1957). Patienten mit schwerem Nierenschaden haben eine niedrige Epo-Konzentration im Blutserum, welche nach erfolgreicher Nierentransplantation wieder normale Werte annimmt (Denny et al., 1966). Die Klonierung des murinen Epo-Gens ermöglichte das Studium der Epo-mRNA in anämischen Mäusen, wo durch Induktion einer Anämie (Kobalt-Injektion, Blutung) nach 1,5 Stunden Epo-mRNA in Niere und Leber detektierbar war (Beru et al., 1986; Bondurant und Koury, 1986). Im weiteren Verlauf stieg die Konzentration der Epo-mRNA in der Niere 500- bis 1000-fach, wobei die Leber nur ca. 7% der gesamten Epo-mRNA produzierte (Bondurant und Koury, 1986). Die Epo-Produktion in der Leber spielt nur im Fötus oder bei Patienten mit Niereninsuffizienz im Spätstadium eine wesentliche Rolle. Epo wird nicht nur durch die verminderte Zahl an roten Blutkörperchen (Anämie) sondern auch durch eine erniedrigte Sauerstoffsättigung der Erythrozyten (Hypoxämie) angeregt. Beide pathologischen Zustände haben die Herabsetzung des Sauerstoffpartialdruckes im venösen Blut und in Geweben (Hypoxie) zur Folge. Hypoxie erhöht, wie schon in 2.3.8. erwähnt, unter anderem die Produktion von HIF-1 (Wang und Semenza, 1993) und letztendlich die Epo-Konzentration. Die Epo-produzierenden Zellen befinden sich im Interstitium des Nierenparenchyms der tubulären Basismembran, meist in der inneren Rinde und äußeren Medulla. Bei Anämie erhöht sich die Zahl dieser Zellen, was bedeutet, dass der erhöhte Bedarf nicht nur durch eine erhöhte Epo-Produktion einzelner Zellen gedeckt wird, sondern auch durch Erhöhung der Zahl Epo-exprimierender Zellen (Koury et al., 1989).

Neben der Steuerung über den Sauerstoffdruck in den Nieren wird Epo auch über Androgene und das Wachstumshormon Somatotropin reguliert (Alexanian, 1969; Jepson und McGarry, 1972). Somatotropin passt die Erythrozytenproduktion den Veränderungen der Körpermasse an. Dieser Effekt wird auch durch Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 („insulin-like growth factor-1“; IGF-1) induziert, was die Produktion von Epo erhöht und die Wirkung auf zellulärer Ebene verstärkt (Claustres et al., 1987). Unter gewissen Umständen kann IGF-1 sogar als Epo-Ersatz fungieren (Congote et al., 1991).

### **2.4.2.1. Epo und tumorbedingte Anämie**

Die Pathogenese tumorbedingter Anämien hat viele Ursachen, wie Hämolyse, Blutverlust und verringerte Produktion von Erythrozyten im Knochenmark. Auch eine „Anämie chronischer Erkrankung“ kann durch Tumore induziert werden und ist durch inadäquate Epo-Produktion, Hemmung der Proliferation erythroider Vorläufer und Eisenverteilungsstörungen charakterisiert (Fitzsimons und Brock, 2001). Zusätzlich können bei Tumorpatienten durch verwendete Zytostatika oder Strahlentherapie Anämien hervorgerufen oder verstärkt werden. Behandlungsmöglichkeiten sind Bluttransfusionen, die aber nur vorübergehend wirksam sind und mit Risiken, wie z.B. Infektionen verbunden sind. In zahlreichen Fällen wurde gezeigt, dass die Behandlung mit rhuEpo Anämien lindert, den Bedarf an Bluttransfusionen senkt und die Lebensqualität der Patienten durch Verbesserung des Kräftezustandes und damit erhöhter körperlicher Aktivität erheblich steigert. (Clark et al., 2002).

Zusätzlich fördert Epo die Sauerstoffversorgung von Tumoren, was möglicherweise zur gesteigerten Proliferation der Krebszellen führt. Durch die erhöhte Aktivität sind diese eventuell anfälliger für Chemotherapeutika. Auf der anderen Seite könnte Epo auch die durch Hypoxie erzeugte Vaskularisierung des Krebses unterdrücken und damit eine Proliferation der Krebszellen unterbinden (Harris, 2002). Da erste Studien zu kontroversen Aussagen führten, wird rhuEpo zur Zeit nicht für eine direkte Behandlung von Tumoren eingesetzt (Erbayraktar et al., 2003).

### **2.4.2.2. Epo im Gehirn und anderen nichterythropoetischen Geweben**

Es sind mittlerweile verschiedene Beweise vorhanden, dass Epo nicht nur im erythroiden System eine Funktion ausübt (Lappin et al., 2002). So ist z.B. der EpoR auf zahlreichen nichterythroiden Zellen exprimiert und es wurde gezeigt, dass Epo/EpoR-Interaktionen Mitogenese, Chemotaxis, Angiogenese, Mobilisation von intrazellulärem Kalzium und Inhibierung der Apoptose einzelner anderer Zelltypen induzieren können.

Vor ungefähr 10 Jahren wurde bekannt, dass neuronale Zellen Epo produzieren können. Seitdem häufen sich die Hinweise auf eine physiologische und auch

pathophysiologische Bedeutung von Epo im Gehirn. Epo wird von Astrozyten produziert und bindet an EpoR von Neuronen, womit es die Neuronen parakrin beeinflussen kann. Dieses Rezeptor-Liganden-System ist unabhängig vom endokrinen erythropoetischen System, da die intakte Blut-Hirn-Schranke die Passage von zirkulierendem Epo ausschließt (Marti et al., 1997; Masuda et al., 1994). Auch im Gehirn wird, wie in der Niere und der fötalen Leber, die Epo-Produktion durch HIF-1 reguliert. Neben Hypoxie induzieren auch metabolische Störungen, wie Hypoglykämie oder starke neuronale Depolarisation eine zerebrale Epo-Expression durch HIF-1 (Chandel et al., 1998). Interessant ist, dass Epo- und EpoR-mRNA-Expressionen im erwachsenen Gehirn nicht konstitutiv sind, sondern erst durch Hypoxie induziert werden (Lewczuk et al., 2000).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Epo im zentralen Nervensystem als ein neurotrophischer und neuroprotektiver Faktor wirkt, speziell unter Bedingungen neuraler Störungen, wie Hypoxie, Ischämie oder Gehirnblutungen. Es wurde auch gezeigt, dass Epo die Ausschüttung von Neurotransmittern beeinflussen kann, was in der synaptischen Plastizität des adulten Gehirns eine wichtige Rolle spielt (Koshimura et al., 1999).

In isolierten Leydigzellen von Ratten kann Epo die Testosteronproduktion stimulieren, was mit anti-Epo-Antikörpern blockiert werden konnte (Mioni et al., 1992). rhuEpo verbessert auch die sexuelle Funktion in Patienten mit schweren Nierenerkrankungen. Durch Injektion von rhuEpo in die Kubitalvene junger erwachsener Männer konnte die Testosteronkonzentration um 400% gesteigert werden (Foresta et al., 1994).

Sehr häufig werden gastrische Schleimhautläsionen in Patienten mit schweren Nierenerkrankungen beobachtet, die sich durch Gabe von rhuEpo oft verbessern (Okada et al., 1996). Da der EpoR auf Enterozyten des Dünndarms humaner Föten exprimiert ist, könnte das in der Muttermilch vorhandene Epo auch die neonatale Darmfunktion modulieren (Juul et al., 1999; Kling, 2002).

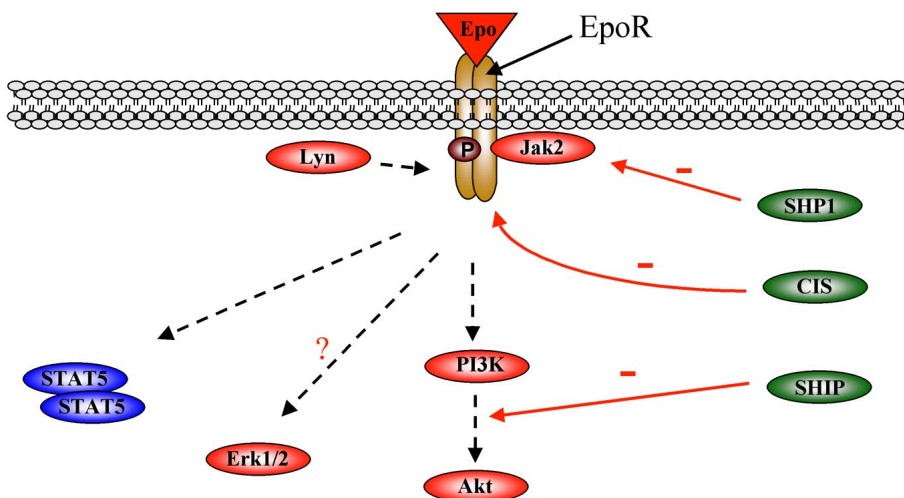
## 2.5. Epo-induzierte Signalwege

Das durch die Bindung von Epo an den Erythropoetin-Rezeptor (EpoR) induzierte Signal ist einer der bedeutendsten Schritte in der Kontrolle der Erythropoese. Klinische und hämatologische Studien, zusammen mit Analysen experimenteller Tiermodelle, haben dazu beigetragen, molekulare Aspekte der Erythropoese, die vom Epo/EpoR-System reguliert werden, genau aufzuklären. Die fötale Leber von genetisch modifizierten Epo- oder EpoR-defizienten Mäusen hat zwar eine normale Anzahl an BFU-Es, jedoch keine reiferen erythroiden Zellen. Das bedeutet, dass das Epo-Signalsystem für die frühe Zelllinienspezialisierung unbedeutend, aber für die Proliferation und Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen zu reifen Zellen essentiell ist (Wu et al., 1995b; Zang et al., 2001).

Der EpoR gehört zur Familie der Zytokinrezeptoren. Er besteht aus einer extrazellulären Domäne mit zysteinreichen Regionen und WSxWS-Motiven, welche für die korrekte Faltung und Stabilisierung des EpoR bedeutend sind. Einer Transmembranregion folgt der zytoplasmatische Teil mit zunächst zwei Regionen (Box1 und Box2), welche für die Bindung der Janus-Protein-Tyrosinkinase Jak2 und der Interaktion mit anderen Zytokinrezeptoren eine Rolle spielen. Der EpoR besitzt keine intrinsische Enzymaktivität, sondern ist mit Tyrosinkinasen komplexiert. Den beiden EpoR-Boxen folgt ein langer Proteinabschnitt mit acht Tyrosinresten. Es gibt zwei Modelle für die Aktivierung des EpoR. Im ersten bindet der EpoR das Hormon Epo, was zur Dimerisierung des Rezeptors führt. Dadurch werden die, konstitutiv an den EpoR gebundenen, Jak2-Kinaseproteine nah zusammen gebracht und durch Autotransphosphorylierung aktiviert (Witthuhn et al., 1993). Andere Publikationen vertreten ein Modell, bei dem der EpoR bereits im inaktiven Zustand als Dimer vorliegt und Epo-Bindung lediglich eine Konfirmationsänderung verursacht, die letztendlich zur Aktivierung der Jak2-Proteine führt (Constantinescu et al., 2001; Livnah et al., 1999). Die aktiven Jak2-Proteine phosphorylieren nachfolgend Tyrosine im zytoplasmatischen Teil des EpoR, was Proteinen mit sogenannten Src-Homologie-2-Domänen („src homology domain 2“; SH2) die Bindung ermöglicht. Die Unterdrückung der Jak2-Genexpression in Mäusen führt zum Tod während der Embryonalentwicklung

(Parganas et al., 1998). Dabei ist die Zellzahl in der fötalen Leber als auch die der erythroiden Vorläuferzellen stark reduziert, was zeigt, dass im Gegensatz zum EpoR die Jak2-Kinase bereits in früheren Stadien der erythropoetischen Entwicklung absolut notwendig ist. Jak2 ist vermutlich nicht die einzige Tyrosinkinase, die durch Epo aktiviert werden kann. So zeigten Studien in Zelllinien, dass die Src-Tyrosinkinase Lyn eine Rolle in der Epo-induzierten Differenzierung spielen könnte (Tilbrook et al., 1997). Lyn-defiziente Mäuse haben jedoch keinen offensichtlichen Defekt in der Erythropoese, so dass weiterhin unklar ist, ob Lyn oder vielleicht auch andere Src-Kinasen im Epo-induzierten Signalsystem von Bedeutung sind.

Eine Hauptaufgabe von Epo ist der Schutz von erythroiden Vorläuferzellen vor Apoptose (programmierter Zelltod). Abbildung 4 zeigt eine stark vereinfachte Übersicht der wichtigsten Epo-induzierten Signalwege.



**Abb. 4: Vereinfachte Darstellung Epo-induzierter Signalereignisse.**

Epo bindet an den EpoR und Jak2 wird aktiviert, was wiederum zur Phosphorylierung des EpoR führt. Dies führt zur Rekrutierung von Proteinen und der Aktivierung von Signalkaskaden die anti-apoptische und/oder proliferative Effekte haben. Auch werden negative Rückkopplungsprozesse aktiviert. (nähere Erläuterungen im Text)

Der Transkriptionsfaktor „signal transducer and activator of transcription 5“ (STAT5) bindet über seine SH2-Domäne an den aktivierten EpoR, wo er phosphoryliert wird. Anschließend löst sich STAT5 vom EpoR und formt mit einem anderen phosphorylierten

STAT5-Molekül ein Dimer. Dieser aktive Komplex transloziert direkt in den Zellkern, um die Transkription spezifischer Gene (z.B. *cis1*, *pim1*, *bcl-x*) zu regulieren (Damen et al., 1995; Gobert et al., 1996; Klingmuller et al., 1996; Teglund et al., 1998). In Mäusen mit einem Defekt in der STAT5-Expression kann das Überleben früher Erythroblasten nicht ausreichend gewährleistet werden, was zur Anämie führt. Auch bleibt die verstärkte Bildung von Erythrozyten als Antwort der Erythropoese auf starken Blutverlust oder anderen Stress-induzierten Situationen aus. Das Fehlen von STAT5 ist nicht letal, da vermutlich Mechanismen, wie die Hochregulierung von STAT1 und STAT3, diesen Defekt kompensieren können oder andere Signalwege unter Normalbedingungen für die Entwicklung der Erythroblasten ausreichend sind (Socolovsky et al., 1999).

In der erythroiden Entwicklung spielt die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) eine zentrale anti-apoptotische Rolle (Haseyama et al., 1999) und ist zusätzlich an der Epo-induzierten mitogenen Antwort beteiligt (Wickrema et al., 1999). PI3Ks werden in 3 Klassen unterteilt, wobei soweit bisher bekannt nur die Klasse 1 (PI3K $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) in der Signalweiterleitung von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen von Bedeutung ist. Die Funktion der Klasse 2 PI3Ks ist zur Zeit unklar. Die PI3Ks der Klasse 3 werden dagegen nicht durch Rezeptoren reguliert und sind am intrazellulären Membrantransport und der Vesikelsortierung beteiligt. Die Klasse 1 PI3Ks sind heterodimere Proteine und bestehen aus einer 110 kDa großen katalytischen Untereinheit (p110) und einer konstitutiv assoziierten kleinen regulatorischen Untereinheit. Diese Klasse kann weiter unterteilt werden; während die Klasse 1a PI3Ks ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ) p85-Untereinheiten besitzen, hat die Klasse 1b PI3K $\gamma$  keine N-terminale p85-Bindungsstelle, sondern assoziiert mit einer der p85 nicht verwandten p101-Untereinheit, welche keine erkennbaren Protein-Protein-Interaktionsmotive besitzt. SH2-Domänen in der p85-Untereinheit binden an spezifische Phosphotyrosinreste innerhalb des EpoR oder an andere Signalproteine, was zur Aktivierung der PI3K führt und den zytosolischen Komplex an die Zellmembran rekrutiert, wo er das membranständige Substrat Phosphatidylinositol-3,4-phosphat (PIP<sub>2</sub>) phosphorylieren kann. Klasse 1a PI3Ks können auch direkt durch GTP-beladene Formen von Ras stimuliert werden (Stephens et al., 2000; Vanhaesebroeck et al., 2001). Klasse 1b

PI3K $\gamma$  wird z.B. direkt durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine aktiviert, wobei die regulatorische Untereinheit p101 an G $\beta\gamma$  bindet. p110 $\gamma$  oder p101/p110 $\gamma$  können ebenfalls direkt durch Ras•GTP aktiviert werden (Stephens et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass PI3K $\gamma$  in Inflammationen und Allergien von Bedeutung ist (Wymann et al., 2003). Das Produkt der Phosphorylierung von membranständigem PIP<sub>2</sub> durch PI3K ist Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> kann als sekundärer Botenstoff die Rekrutierung zytosolischer Proteine mit PH-Domänen an die Zytoplasmamembran vermitteln. Es ist ebenfalls beschrieben, dass PIP<sub>3</sub> direkt Enzyme, wie Proteinkinase B (Akt) (Bos, 1995; Franke et al., 1997) oder Proteinkinase C (PKC) (Moriya et al., 1996; Toker et al., 1994) aktivieren kann. Ein anderer PIP<sub>3</sub>-regulierter Signalweg führt zur Ras-abhängigen Erk-Aktivierung (Klingmuller et al., 1997).

Verschiedene negative Regulatorproteine werden durch den aktivierten EpoR rekrutiert. So dephosphoryliert und inaktiviert die Phosphatase SH2-Domäne-enthaltendes Protein 1 (SHP1) die Tyrosinkinase Jak2 (Klingmuller et al., 1995). CIS, ein kleines Protein mit einer SH2-Domäne blockiert durch Bindung an phosphorylierte Tyrosine des EpoRs Bindungsstellen für andere Proteine (Sokol et al., 1994). Die SH2-enthaltende Inositol-5-Phosphatase (SHIP) ist nach EpoR-Aktivierung ebenfalls tyrosinphosphoryliert und kann PIP<sub>3</sub> dephosphorylieren (Constantinescu et al., 1999). SHIP reguliert somit die PI3K-induzierten Signalwege. SHIP-defiziente Mäuse haben eine verkürzte Lebenserwartung und eine auf die Hälfte reduzierte Menge an reifen roten Blutzellen. Die Zahl der erythroiden Vorläuferzellen ist jedoch nicht reduziert, was bedeutet, dass SHIP an der späten erythroiden Entwicklung beteiligt ist (Helgason et al., 1998).

## 2.6. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, Epo-induzierte zytoplasmatische Signalereignisse für die Aktivierung der MAPK Erk1/2 bei minimaler Konzentration von Epo in humanen Primärzellen zu analysieren.

Die Aufklärung Epo-induzierter intrazellulärer Signalwege trägt dazu bei, die Mechanismen für die Bildung roter Blutzellen zu verstehen und Ursachen für pathophysiologische Veränderungen in der Erythropoese zu erkennen und langfristig gezielt bekämpfen zu können.

Ergebnisse aus Untersuchungen von Zelllinien mit verschiedenen genetischen Hintergründen führten bisher zu kontroversen Modellen und es ist fraglich, ob die erzielten Ergebnisse physiologisch von Bedeutung sind. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mit primären erythroiden Vorläuferzellen („primary erythroid progenitor cells“; PEPs) gearbeitet. Diese Zellen wurden aus hämatopoetischen Stammzellen humanen Nabelschnurbluts gewonnen.

Da die basale physiologische Epo-Konzentration im Menschen ungefähr 30 mE/ml Blut beträgt, wurde die Menge an Epo, die zur Stimulation der PEPs diente, so weit wie möglich reduziert. Sie liegt mit 300 mE/ml nur 10-fach über der basalen Konzentration im Körper, aber weit unter pathophysiologischen Epo-Spiegeln (30-100 E/ml) und der in anderen Studien üblicherweise verwendeten Epo-Konzentrationen (1-10 E/ml).

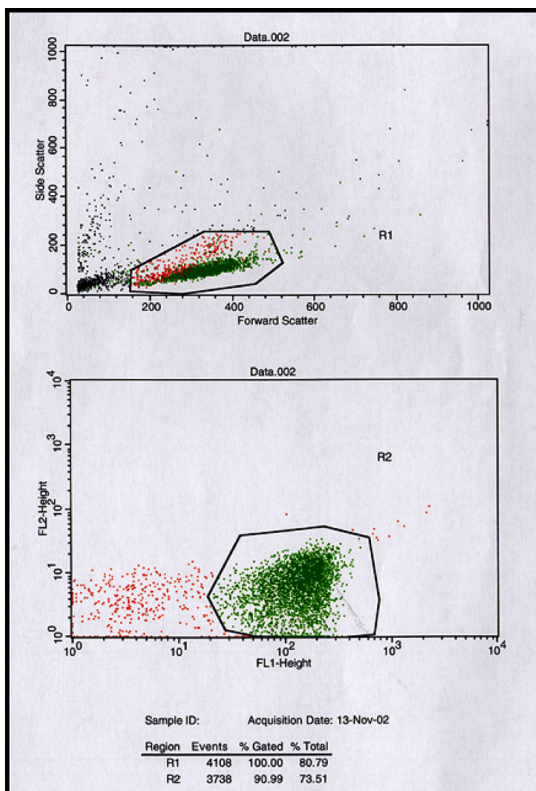
Eine Inhibierung der MAPK Erk in PEPs reduziert die Proliferationsrate um 60%, was zeigt, dass Erk eine bedeutende Rolle in der Entwicklung roter Blutzellen spielt (Kadri et al., 2000). Um die Epo-induzierte Erk-Aktivierung aufzuklären, wurden, hauptsächlich mit Hilfe von Inhibitormolekülen, intrazelluläre Signalwege unterbrochen und die Effekte auf Erk untersucht.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Generierung von CD36<sup>+</sup> erythroiden Vorläuferzellen

Da es bisher schwierig war primäre erythroide Vorläuferzellen (PEPs) *in vitro* in großen Mengen zu amplifizieren, konnten in diesen Zellen nur in limitiertem Maße detaillierte biochemische Analysen durchgeführt werden. Seit kurzem ist es jedoch möglich hämatopoetische Vorläuferzellen, unter serumfreien Bedingungen durch einen genau definierten Zytokincocktail, gerichtet und in großer Zahl in die erythroide Linie zu differenzieren (Freyssinier et al., 1999). Dafür wurden zunächst CD34<sup>+</sup>-Zellen aus humanem Nabelschnurblut mit einer Reinheit von ca. 60-95% isoliert (Abbildung 5).



**Abb. 5: Beispiel einer FACS-Analyse der Reinheit von aus Nabelschnurblut aufgereinigten CD34<sup>+</sup>-Zellen.**

Durch einen Dichtegradienten vorgereinigte Zellen wurden über eine MACS-Säule mit an magnetischen Beads gekoppelten  $\alpha$ -CD34 laufen gelassen. Die gebundenen Zellen wurden eluiert und dann FACS-analysiert.

Im oberen Diagramm wird die Seitwärtsstreuung gegenüber der Vorwärtsstreuung der Zellen dargestellt. Die Hauptpopulation der lebenden Zellen ist markiert (Gate R1).

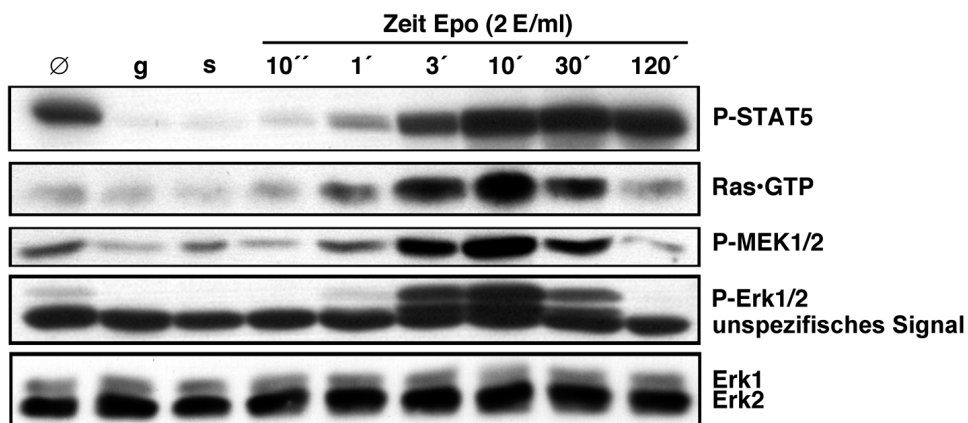
Für die Zellen im Gate R1 wird im unteren Diagramm die Vorwärtsstreuung (FL2-Hight) gegenüber der FITC-markierten Zellen (FL1-Hight) dargestellt. Die CD34<sup>+</sup>-Zellen sind markiert (Gate R2). Somit befinden sich im Gate R1 ca. 91% CD34<sup>+</sup> Zellen.

Eine Reinheit von nur 60% ist ausreichend, da unter den speziellen Kulturbedingungen CD34<sup>-</sup>-Zellen nicht überleben können. Nach 7 Tagen Kultivierung wurden die Zellen über den Oberflächenmarker CD36 (Thrombospondin-Rezeptor)

aufgereinigt. Die durch diese Methode generierten Zellen waren zu 93% CD36<sup>+</sup>, 96% CD71<sup>high</sup> (Transferrin-Rezeptor), negativ für GpA (exprimiert auf reiferen erythroiden Zellen) und negativ für die linienspezifischen Differenzierungsmarker CD14 (Monozyten) und CD41 (Megakaryozyten und Blutplättchen) (Freyssinier et al., 1999). Das zeigt, dass es sich bei den von der CD36-Säule eluierten Zellen um Vorläuferzellen der erythroiden Linie handelt und diese Methode zur Isolation einer Population von Vorläuferzellen ausschließlich der erythroiden Linie führt. Durch die weitere Kultivierung in Gegenwart von Epo kommt es zur starken und spezifischen Vermehrung dieser Zellen, was eine Analyse mit Hilfe biochemischer Experimente ermöglicht.

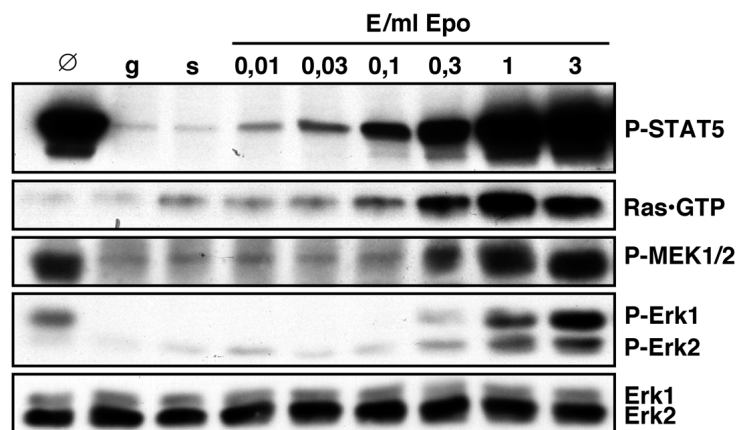
### **3.2. PI3-Kinase-abhängige Aktivierung von Ras, MEK und Erk durch minimale Konzentrationen an Epo**

In ersten Experimenten wurde festgestellt, welche Stimulationsdauer und Epo-Konzentrationen notwendig sind, um STAT5 und mitogene Enzyme in PEPs zu aktivieren. Dafür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Epo-Konzentrationen für verschiedene Zeiten stimuliert und anschließend mit aktivierungsspezifischen anti-Phosphoepitop-Antikörpern gegen STAT5, MEKs und Erks analysiert. Die Aktivierung (GTP-Beladung) der kleinen GTPase Ras wurde durch Affinitätspräzipitation mit einem GST-Fusionsprotein, welches die Ras-Bindungsdomäne (RBD) der Kinase c-Raf1 enthält, analysiert. Der Status der Aktivierung wurde auch in normal wachsenden ( $\emptyset$ ) und schein-stimulierten (s) PEPs gemessen. Die Epo-induzierten Signale erreichen fast gemeinsam nach 10 min ihr Maximum (Abbildung 6). Während Ras, MEKs und Erks mit 0,3 E/ml Epo aktiviert wurden (Abbildung 7), konnte STAT5 schon mit 10 mE/ml Epo aktiviert werden. Somit wurden alle Zellen in den nachfolgenden Experimenten, falls nicht anders beschrieben, mit 0,3 E/ml Epo stimuliert und nach 10 min geerntet. Im Gegensatz zur Aktivierung von Ras konnte keine Aktivierung der kleinen GTPasen Rac und Rap1 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 6: Zeitabhängige Aktivierung von STAT5, Ras, MEKs und Erks durch Epo in primären erythroiden Vorläuferzellen (PEPs).**

Gehungerte (g) PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit 2 E/ml Epo für unterschiedliche Zeiten stimuliert. 100 µg Zellextrakt wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-P-STAT5, anti-P-MEK1/2, anti-P-Erk1/2 und anti-Erk1/2 geblottet. GTP-beladenes Ras wurde von 500 µg Zellextrakt mit GST-c-Raf1-RBD präzipitiert und nach SDS-PAGE-Auftrennung mit anti-pan Ras geblottet. Ø zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs (kultiviert mit IL-3, IL-6, SCF und Epo). In diesem ersten Versuch wurden die Zellen mit RIPA-Lysepuffer anstelle von NP-40-Lysepuffer lysiert, was ein unspezifisches Signal auf dem P-Erk1/2-Blot zur Folge hatte.

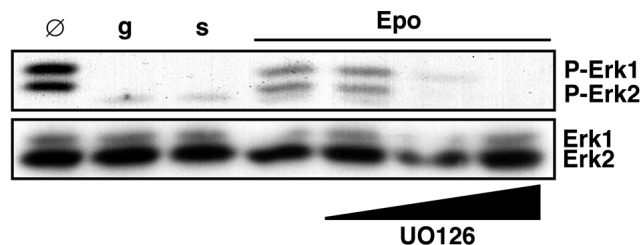


**Abb. 7: Dosisabhängige Aktivierung von STAT5, Ras, MEKs und Erks durch Epo in primären erythroiden Vorläuferzellen (PEPs).**

Gehungerte (g) PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit unterschiedlichen Konzentrationen an Epo für 10 min stimuliert. 100 µg Zellextrakt wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-P-STAT5, anti-P-MEK1/2, anti-P-Erk1/2 oder anti-Erk1/2 geblottet. GTP-beladenes Ras wurde mit GST-c-Raf1-RBD aus 500 µg Zellextrakt präzipitiert und nach SDS-PAGE-Auftrennung mit anti-Ras geblottet. Ø zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

Um zu beantworten, wie Epo Erks aktiviert, reicht es nicht aus nur Epo-induzierte Phosphorylierungsereignisse einzelner Proteine zu demonstrieren. Es ist wichtig, dass gezeigt wird, wie diese Proteine Signalwege modulieren und eventuell sogar direkt oder über Adapterproteine miteinander interagieren. Inhibitormoleküle, die spezifisch die Funktion von Proteinen blockieren können, finden im primären Zellsystem Anwendung und spielen in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle. Vor- und Nachteile der Arbeit mit Inhibitoren wird im anschließenden Diskussionsteil näher erörtert.

In den meisten Zellsystemen sind MEKs direkt den Erks vorgeschaltet. Das dies auch in den PEPs der Fall ist, wurde mit Hilfe des Inhibitors UO126, welcher die Epo-induzierte Erk-Aktivierung blockierte, gezeigt (Abbildung 8). UO126 ist bekannt dafür, MEK1 und MEK2 durch selektive Bindung zu inhibieren und z.B. keinen Effekt auf die Kinaseaktivitäten von Proteinkinase C (PKC), Abl, Raf, MEKK, JNK, MKK3, MKK6, Cdk2 oder Cdk4 zu haben (Favata et al., 1998).



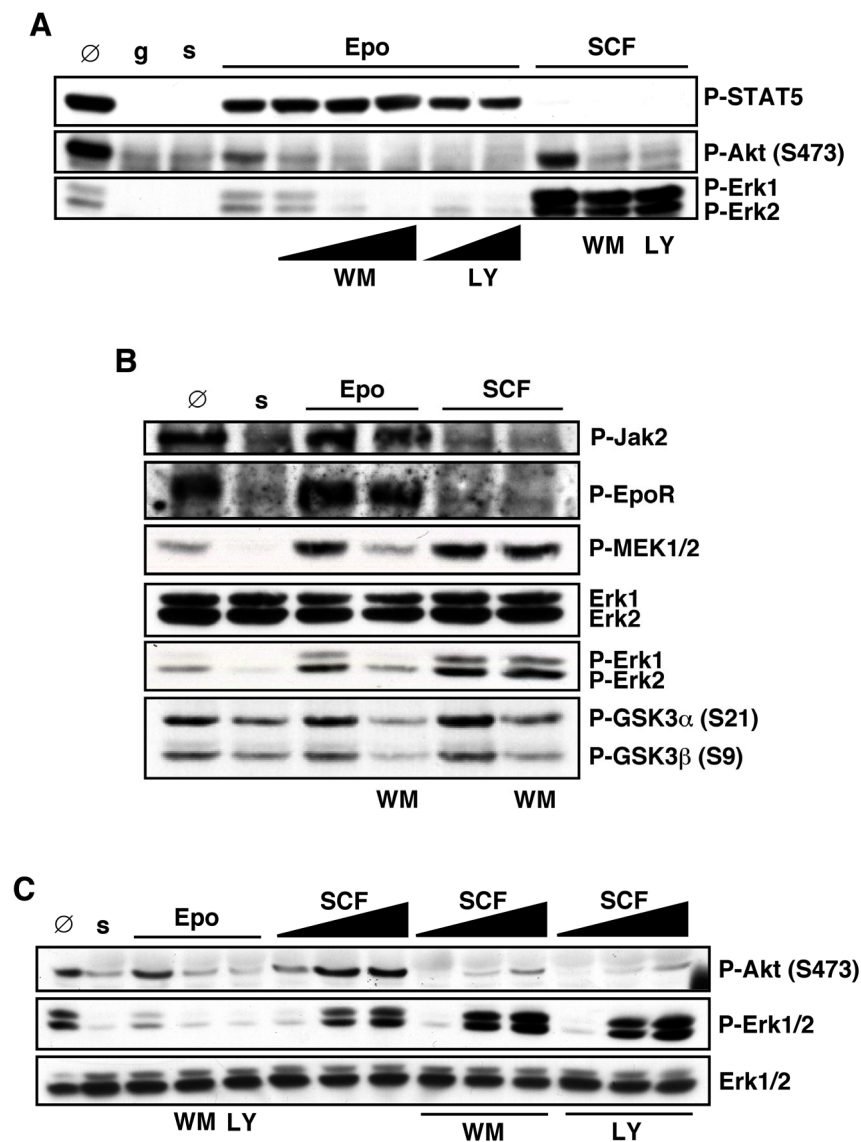
**Abb. 8: MEK1/2 ist in Epo-stimulierten PEPs Erk1/2 übergeordnet.**

Gehungerte (g) PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit 0, 1, 3 oder 10  $\mu\text{M}$  des Inhibitors UO126 für 1 h vorbehandelt und dann mit Epo stimuliert. 100  $\mu\text{g}$  Zellextrakt wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-P-Erk1/2 oder anti-Erk1/2 geblottet. Ø zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

Während dieser Experimente wurde auch der Inhibitor LY294002 (LY) getestet. Dies ist ein zellpermeables, potentes und spezifisches Inhibitormolekül für Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Ks), und wirkt als Kompetitor zu ATP an der ATP-Bindungsstelle. Nach der Behandlung mit LY war die Ser473-Phosphorylierung der Kinase Akt, welche durch PI3K aktiviert werden kann, inhibiert (Abbildung 9A). Akt besitzt eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne und kann somit an das PI3K-Produkt  $\text{PIP}_3$  binden. Die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PDK1) kann ebenfalls durch  $\text{PIP}_3$  an die

Zellmembran rekrutiert werden und ist ein Schlüsselenzym in der Regulierung der Aktivität von Proteinkinasen, unter anderem von Akt. Jedoch konnte in ersten Experimenten mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern keine Beteiligung von PDK1 in den Epo-stimulierten PEPs gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Somit bleibt offen, was dort zur eigentlichen Aktivierung der Akt-Kinase führt. Überraschenderweise war, durch Behandlung der PEPs mit LY, auch die MAPK Erk inhibiert. Daneben wurde die dosisabhängige Erk-Inhibierung mit dem strukturell unterschiedlichen PI3K-Inhibitor Wortmannin (WM) bestätigt (Abbildung 9A). Wortmannin ist, im Gegensatz zum synthetisch hergestellten LY, eine aus dem Pilz *Penicillium fusiculosum* gewonnene metabolische Inhibitorsubstanz, welche ein Lysin innerhalb der ATP-Bindungsstelle alkylieren kann und somit eine permanente Inaktivierung der PI3K verursacht. Die SCF-induzierte Erk-Phosphorylierung konnte weder mit LY noch mit WM blockiert werden, was bedeutet, dass es sich hier um einen Epo-spezifischen, PI3K-abhängigen, Effekt handelte. Der SCF-Rezeptor c-Kit, der funktionell mit dem EpoR zusammenarbeiten kann, wurde während der gesamten Studie als Kontrolle verwendet, da, wie postuliert und hier auch teilweise experimentell direkt bestätigt, die SCF-induzierte Erk-Aktivierung durch die klassische Kaskade Shc/Grb2/Sos/Ras/Raf/MEK/Erk vermittelt wird. Somit konnte klar gezeigt werden, dass es sich bei den inhibierten Signalen um Epo-spezifische Ereignisse handelte. Soweit nicht anders beschrieben, wurden für alle Experimente die PEPs mit 25 ng/ml SCF für 10 min stimuliert. WM und LY konnten jedoch auch die durch geringere SCF-Konzentrationen aktivierte Erk-Aktivierung nicht blockieren (Abbildung 9C).

WM inhibierte neben Erks auch die Phosphorylierung von MEK1/2 und Glykogen-Synthase-Kinasen-3 $\alpha$ , $\beta$  (GSK3 $\alpha$ , $\beta$ ) (Abbildung 9B). GSK3 $\alpha$ , $\beta$  werden durch Akt reguliert und dienen nur als zusätzliche Kontrolle für die PI3K-Inhibierung. Im Gegensatz dazu hatte WM, wie erwartet, keinerlei Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung von STAT5 (Abbildung 9A) und EpoR (Abbildung 9B); beide Proteine können nicht durch c-Kit phosphoryliert werden. Darüber hinaus war die Autophosphorylierung an den Tyrosinen 1007 und 1008 der EpoR-assoziierten Kinase Jak2 nicht inhibiert (Abbildung 9B). Das zeigt, dass beide PI3K-Inhibitoren in den eingesetzten Konzentrationen keine relevanten unspezifischen Nebeneffekte haben.



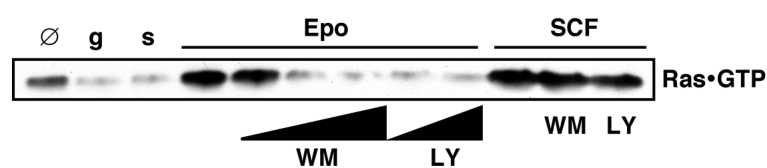
**Abb. 9: Die strukturell und mechanistisch unterschiedlichen PI3-Kinase-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 verhindern eine Epo-induzierte Aktivierung von Akt, GSK3 $\alpha/\beta$ , MEK1/2 und Erk1/2.**

**A** Gehungerte (g) PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit 0, 25, 50 oder 100 nM Wortmannin (WM) für 30 min oder mit 30 oder 100  $\mu$ M LY294002 (LY) für 1 h vorbehandelt und dann mit Epo stimuliert. Zum Vergleich wurden PEPs gehungert und mit 100 nM WM oder 100  $\mu$ M LY vorbehandelt und, um die c-Kit-Signalkaskade zu aktivieren, mit 25 ng/ml Stammzellfaktor (SCF) für 10 min stimuliert. 100  $\mu$ g Zellextrakt wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-P-STAT5, anti-P-Akt oder anti-P-Erk1/2 geblottet. Ø zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

**B** Mit 100 nM WM für 30 min vorbehandelte PEPs wurden schein-stimuliert oder mit Epo oder SCF behandelt. 100  $\mu$ g Zellextrakt wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-P-MEK1/2, anti-Erk1/2, anti-P-Erk1/2 oder anti-P-GSK3 $\alpha/\beta$  geblottet. Phosphorylierte EpoR- oder Jak2-Moleküle wurden von 500  $\mu$ g Zellextrakt mit anti-EpoR oder -Jak2 immunpräzipitiert und mit anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 geblottet. Ø zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

**C** Gehungerte PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit 100 nM Wortmannin (WM) für 30 min bzw. mit 100  $\mu$ M LY294002 (LY) für 1 h vorbehandelt und dann mit Epo oder mit 0,25, 2,5 oder 25 ng/ml SCF stimuliert. 100  $\mu$ g Zellextrakt wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-P-STAT5, anti-P-Erk1/2 oder anti-Erk1/2 geblottet. Ø zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

Da Ras nach Epo-Stimulation in PEPs aktiviert ist (Abbildung 6) und in der klassischen mitogenen Signalkaskade oberhalb von Rafs und MEKs fungiert, wurde der Effekt von LY und WM auf GTP-Beladung von Ras überprüft (Abbildung 10). Beide Inhibitoren sind in der Lage, die durch Epo-, aber nicht die durch SCF-induzierte Ras-Aktivierung völlig zu blockieren, was unerwartet andeutet, dass Ras der PI3K-Aktivität in Epo-stimulierten PEPs irgendwie nachgeschaltet ist. Dieser Modus der Signaltransmission von PI3K zu Ras ist zwar verschieden von für viele andere Zelltypen oder Stimuli beschriebenen Signalwegen, aber durchaus nicht beispiellos. So kann PI3K die intrazelluläre Kalziumausschüttung induzieren und Ras über die Proline-reiche Tyrosinkinase 2 („proline-rich tyrosine kinase 2“ (Pyk2)) und den Nukleotidaustauschfaktor Ras-GRF regulieren (Berridge et al., 2000; Cullen und Lockyer, 2002). In Anlehnung an dieses Model versuchten wir eine Phosphorylierung der Phospholipase PLC $\gamma$ 1, PLC $\gamma$ 2 und Pyk2 nachzuweisen, was jedoch zu keinem positiven Resultat führte. Daneben versuchten wir PLCs mit dem Inhibitormolekül U-73122 zu blockieren, wobei in PEPs schon durch sehr geringe Konzentrationen Apoptose induziert wurde und damit keine Aussage getroffen werden konnte.



**Abb. 10: Die PI3-Kinase-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 blockieren die Epo-induzierte Ras-Aktivierung.**

Gehungerte (g) PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit 0, 25, 50 oder 100 nM WM für 30 min oder mit 30 oder 100  $\mu$ M LY für 1 h vorbehandelt und dann mit Epo stimuliert. Zum Vergleich wurden mit 100 nM WM oder 100  $\mu$ M LY vorbehandelte PEPs mit SCF stimuliert. GTP-beladenes Ras wurde von 500  $\mu$ g Zellextrakt mit GST-c-Raf1-RBD präzipitiert und mit anti-Ras geblottet. Ø zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

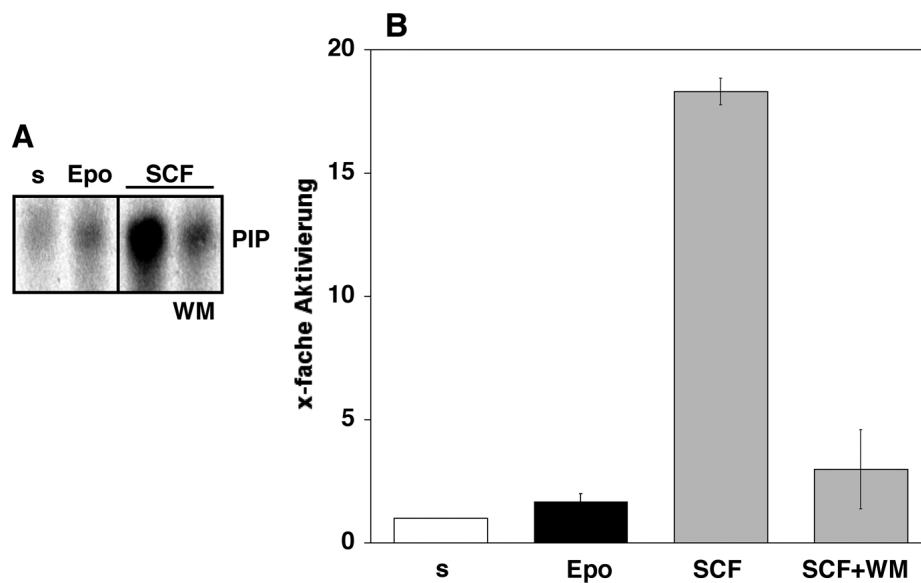
Ras muss farnesyliert werden, um an die Zellmembran zu koppeln, wo es aktiviert werden kann. Da zur Zeit keine Ras-spezifischen kommerziellen Inhibitoren zur Verfügung stehen, wurde versucht, Ras mit Hilfe von proteinunspezifischen anti-Farnesyliations-

inhibitoren (AFC, ManumycinA, FTI-276) zu blockieren. Dies führte zu keinen verwertbaren Ergebnissen, so dass derzeit offen bleibt, ob Ras in der Epo-induzierten Erk-Aktivierung essentiell ist.

### **3.3. PI3-Kinase gamma (PI3K $\gamma$ ) wird durch Epo aktiviert**

PI3Ks gehören zu einer diversen Familie von unterschiedlich regulierten Enzymen, welche in 3 Klassen unterteilt werden (Stein und Waterfield, 2000). Klasse 1 PI3Ks sind, wie bereits in 2.5. näher erläutert, häufig an der Signalweiterleitung von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen beteiligt. Deshalb wurde untersucht, welcher Typ von Klasse 1 PI3Ks für die Weiterleitung des Epo-Signals verantwortlich sein könnte. Es ist bekannt, dass die regulatorischen p85-Untereinheiten der Klassen 1a PI3Ks ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ) als Antwort auf verschiedene Stimuli an die Zellmembran translozieren. Es konnte jedoch keine Translokation in Epo-stimulierten PEPs beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In aktivierten p85/p110-PI3Ks sind die p85-Untereinheiten normalerweise tyrosinphosphoryliert und/oder mit verschiedenen anderen tyrosinphosphorylierten Proteinen assoziiert. Dadurch kann die aktivierte p85/p110-PI3K mit Antikörpern gegen Phosphotyrosine immunpräzipitiert und die Aktivität im Phosphatidylinositol (PI)-Kinaseassay detektiert werden. Die Analyse von Epo- oder SCF-stimulierten PEPs zeigte, dass SCF zu einer starken p85/p110-PI3K-Aktivierung führte, welche durch eine Vorbehandlung der Zellen mit WM blockiert werden konnte. Dagegen war eine nur sehr geringe Aktivierung der PI3K nach Epo-Stimulation detektierbar (Abbildung 11). Des Weiteren konnte keine signifikante Aktivierung von PI3K $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\delta$  in mit 0,3 E/ml Epo-stimulierten PEPs nach direkter Immunpräzipitation (IP) der katalytischen Untereinheiten detektiert werden (Daten nicht gezeigt). LY-vorbehandelte PEPs konnten für dieses Experiment nicht eingesetzt werden, da durch Waschungen, die das Protokoll verlangt, der Inhibitor LY, welcher nur als Kompetitor wirkt, wahrscheinlich wieder ausgespült wurde und somit die ATP-Bindungsstellen der PI3K wieder frei wurden, was zu einer Reaktivierung der PI3Ks führte.





**Abb. 11: Starke Aktivierung von Klasse 1a PI3-Kinasen durch SCF aber nicht durch Epo.**

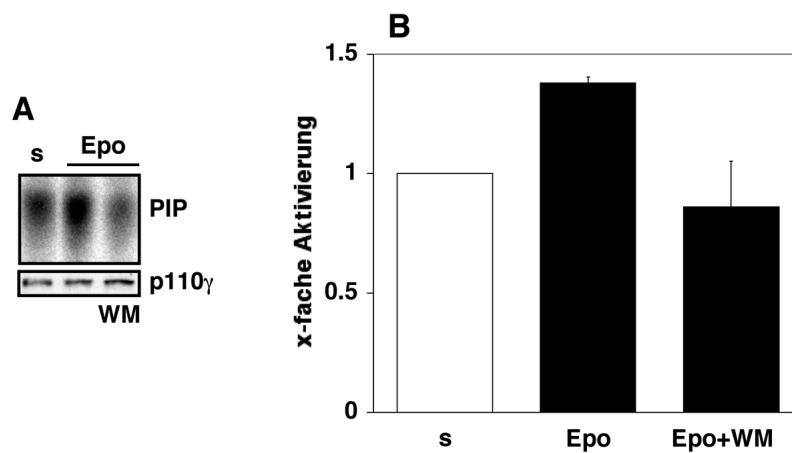
Gehungerte PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder stimuliert mit Epo oder SCF, mit oder ohne Vorbehandlung mit 100 nM WM. Die tyrosinphosphorylierte regulatorische p85-Untereinheit von aktivierten Klasse 1a PI3K-Enzymen (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$ ) wurden von 500  $\mu$ g Zellextrakt mit anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 immunpräzipitiert. Um die PI3K-Inositolkinaseaktivität zu detektieren, wurden die Immunpräzipitate mit Phosphatidylinositol (PI) und  $^{32}$ P- $\gamma$ -ATP inkubiert. Das durch aktive PI3K produzierte Phosphatidylinositolphosphat (PIP) wurde durch Dünnschichtchromatographie (TLC) vom ATP getrennt und mit dem Phosphoimager analysiert.

**A** Repräsentatives Beispiel für die Ergebnisse vom Phosphoimager.

**B** Quantitative Analyse der Ergebnisse von drei verschiedenen Nabelschnurblutproben.

Die Klasse 1b PI3K, PI3K $\gamma$ , ist nicht durch die p85 oder verwandte Untereinheiten reguliert, sondern interagiert mit dem regulatorischen Protein p101. Bisher hat noch niemand gezeigt, dass PI3K $\gamma$  durch Tyrosinphosphorylierung reguliert werden kann. Somit kann die Klasse 1b PI3K-Aktivität nicht über eine Phosphotyrosin-IP bestimmt werden. IPs der katalytischen Untereinheit p110 $\gamma$  von Proteinextrakt Epo-stimulierter PEPs zeigten eine geringe aber sehr gut reproduzierbare Aktivierung der PI3K $\gamma$ . Dieser Effekt konnte durch WM blockiert werden (Abbildung 12). Der Versuch, die PI3K $\gamma$  auch über die p101 zu immunpräzipitieren war nicht erfolgreich. Es ist bekannt, dass PI3K $\gamma$  durch G-Proteine aktiviert werden kann und kürzlich wurde gezeigt, dass in „chinese hamster ovary“ (CHO)-Zellen heterotrimere G-Proteine an den transfizierten EpoR koppeln und an einer Erk-Aktivierung beteiligt sind (Guillard et al., 2003). Das durch den virulenten Stamm von

*Bordetella pertussis* produzierte Pertussistoxin katalysiert die ADP-Ribolysierung einer Untereinheit von G-Proteinen, was eine Entkopplung des G-Proteins vom Rezeptor und damit eine Inhibierung des Signals zur Folge hat. Trotz Behandlung von PEPs mit Pertussistoxin in hohen Konzentrationen konnten wir jedoch keinen Effekt auf Epo-induzierte Signale sehen (Daten nicht gezeigt).



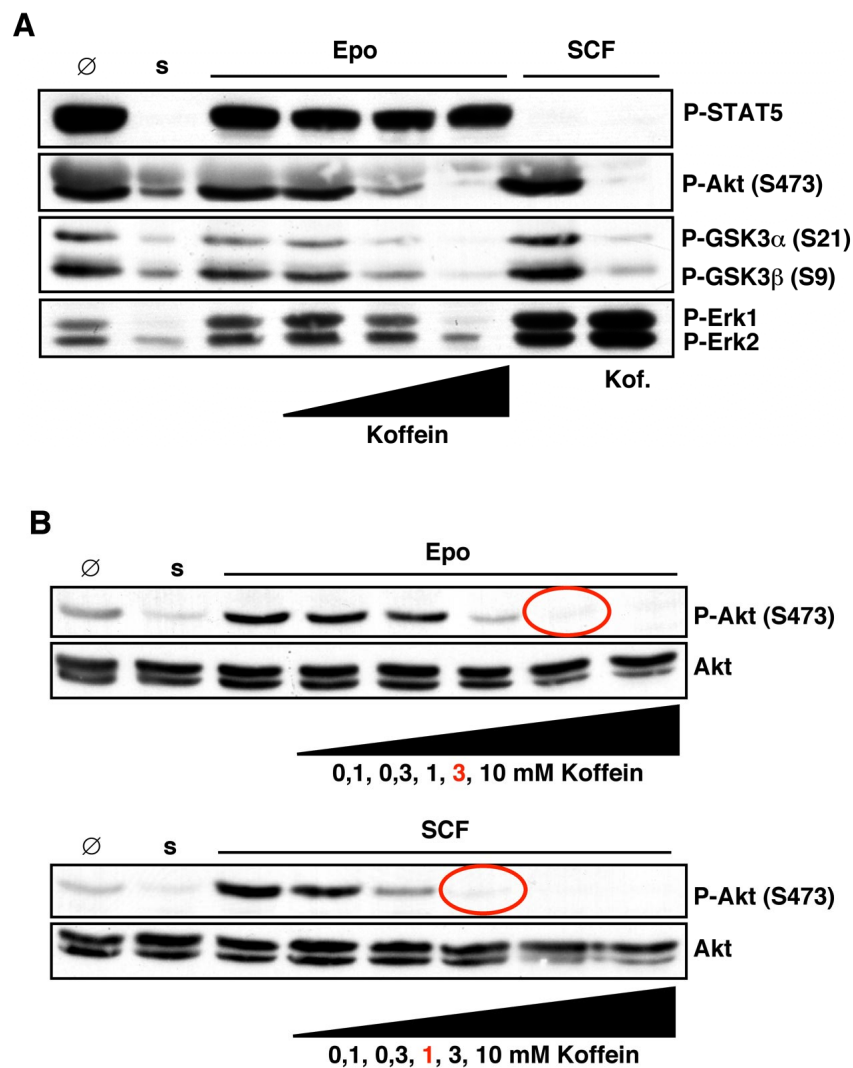
**Abb. 12: Aktivierung von Klasse 1b PI3-Kinase, PI3K $\gamma$ , durch Epo.**

Gehungerte PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit Epo, mit oder ohne Vorbehandlung mit 100 nM WM, stimuliert. Die katalytische Untereinheit p110 $\gamma$  wurde aus 500  $\mu$ g Zellextrakt mit anti-p110 $\gamma$  immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden mit anti-p110 $\gamma$  geblottet oder mit PI und  $^{32}$ P- $\gamma$ -ATP inkubiert und die PIPs wurden nach der TLC mit dem Phosphoimager detektiert.

**A** Repräsentatives Beispiel für die Ergebnisse vom Phosphoimager.

**B** Quantitative Analyse der Ergebnisse von drei verschiedenen Nabelschnurblutproben.

Kürzlich wurde publiziert, dass Koffein Klasse 1 PI3Ks *in vitro* unterschiedlich stark inhibiert und dass PI3K $\gamma$  die am wenigsten sensitive Isoform ist (Foukas et al., 2002). Eine Behandlung der PEPs mit Koffein zeigte, dass die Epo-induzierte Erk-Aktivierung nur durch hohe Koffeinkonzentrationen inhibiert wurde (Abbildung 13A). Wie erwartet, wurde die SCF-induzierte Erk-Aktivierung durch Koffein nicht beeinflusst. Die Phosphorylierungen von Akt und GSK3 $\alpha/\beta$  waren bei beiden Stimuli erwartungsgemäß blockiert.



**Abb. 13: Der PI3K-Inhibitor Koffein inhibiert die Epo-induzierte Akt-, GSK3 $\alpha/\beta$ - und Erk1/2-Aktivierung.**

Gehungerte PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit Epo oder SCF behandelt. Einige der Proben wurden mit Koffein (Kof.) (unten beschrieben) vorbehandelt. 100  $\mu$ g Zelleextrakt wurden mit anti-P-STAT5, anti-P-Akt, anti-P-GSK3 $\alpha/\beta$ , anti-P-Erk1/2 oder anti-Akt geblottet. Ø zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

**A** Zellen wurden mit 0,1, 1 oder 10 mM Koffein für 1 h vor Epo-Stimulation und mit 10 mM vor SCF-Stimulation oder

**B** mit 0,1, 0,3, 1, 3 oder 10 mM Koffein für 1 h vorbehandelt.

Da die p85-regulierten Isoformen der PI3K ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ) verglichen mit PI3K $\gamma$  sensitiver gegenüber Koffein sind, folgerten wir, dass die SCF-induzierte Akt-Phosphorylierung im Vergleich zur Epo-induzierten mit niedrigeren Koffeinkonzentrationen zu blockieren sein sollte, falls PI3K $\gamma$  wichtig ist. Das konnte bestätigt werden, indem die mit Epo bzw. SCF zu stimulierenden PEPs mit unterschiedlichen Koffeinkonzentrationen vorbehandelt wurden

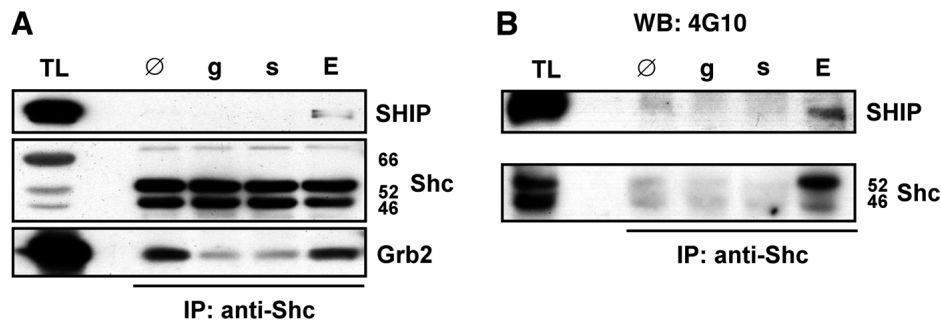
(Abbildung 13B). Während 1 mM Koffein die Akt-Phosphorylierung durch SCF inhibierte, konnte die Epo-induzierte Akt-Phosphorylierung erst mit 3 mM blockiert werden.

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass die effiziente Aktivierung von MEKs und Erks durch geringe Epo-Konzentrationen von einer PI3K-Aktivierung abhängig ist, und dass PI3K $\gamma$  der Hauptkandidat für die Transmission dieses Signals ist. Dieser Epo-Signalweg könnte erklären, warum Zellen mit EpoR-Mutationen ohne Bindungsstellen für p85-Untereinheiten oder für das Ras-aktivierende Modul, wie Shc/Grb2/Sos, noch fähig sind, das Epo-Signal weiterzuleiten, und warum Mäuse mit EpoR ohne SH2-Bindestellen unter normalen Umständen lebensfähig sind (Ketteler et al., 2002; Miller et al., 2002; Pircher et al., 2001; Zang et al., 2001).

Es ist wahrscheinlich, dass höhere Epo-Konzentrationen zur Aktivierung zusätzlicher und biologisch signifikanter Signale führen, welche durch klassische mitogene und anti-apoptotische Signalwege die Proliferation antreiben und die Überlebens- und Proliferationsrate von PEPs steigern können. Dies wurde in der vorgelegten Arbeit jedoch nicht untersucht.

### **3.4. SHIP als möglicher negativer Regulator der PI3K**

Auf der Suche nach Regulatoren von Ras wurde, noch bevor der Identifizierung von PI3K $\gamma$ , in einem der ersten Experimente eine Epo-induzierte Shc-Phosphorylierung detektiert (Ergebnis nicht gezeigt). Aus der Literatur ist bekannt, dass Shc mit Grb2 einen Komplex bilden und Grb2 über Sos die kleine GTPase Ras regulieren kann. Um zu zeigen, ob eventuell die klassische Shc/Grb/Sos/Ras-Kaskade nach Stimulation der PEPs mit 0,3 E/ml aktiviert werden kann, wurden Grb2- und Shc-IPs durchgeführt. Es konnten keine Komplexe mit Sos gezeigt werden, jedoch koimmunpräzipitierten Shc und Grb mit einem ca. 150 kDa großen tyrosinphosphorylierten Protein, welches als SH2-Domäne-enthaltende Inositolphosphatase p150 (SHIP) identifiziert wurde (Abbildung 14). SHIP dephosphoryliert PIP<sub>3</sub> und fungiert somit als Suppressor von PI3K-Signalen. Wie im anschließenden Diskussionsteil genauer erörtert, bleibt noch zu klären, ob diese Phosphorylierung und Komplexbildung in PEPs funktionell signifikant ist.

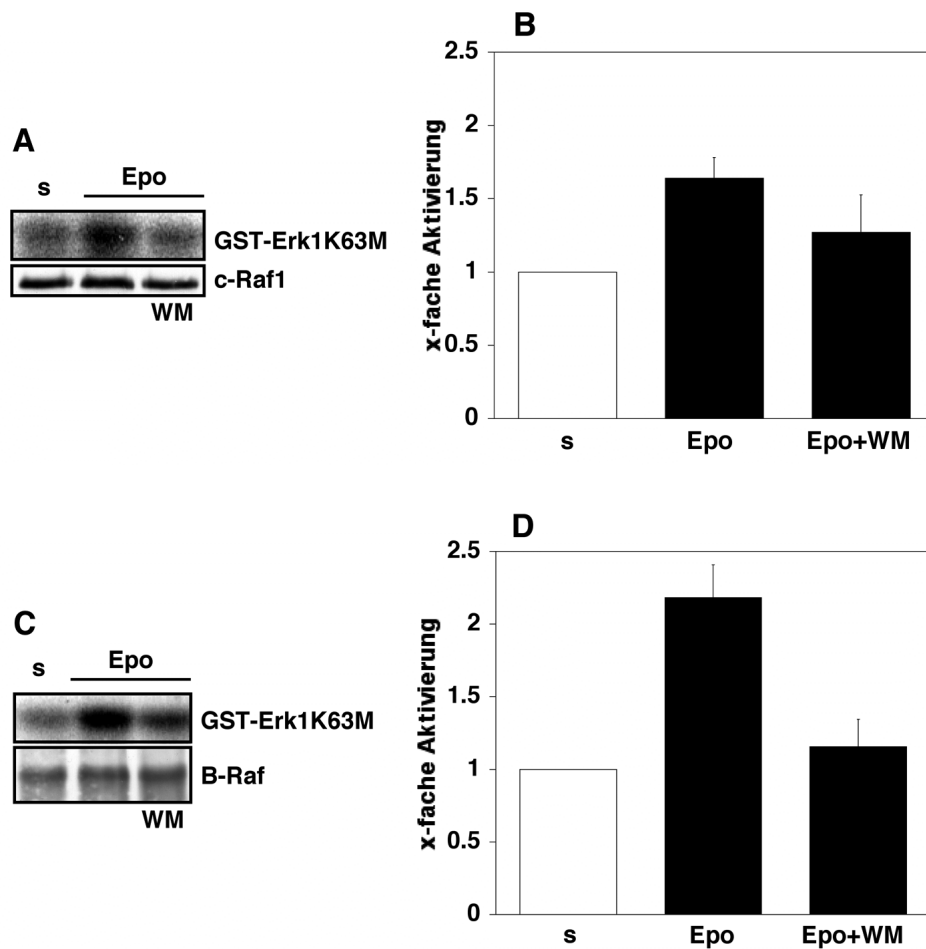


**Abb. 14: Shc-Grb2-SHIP-Komplexbildung durch Epo.**

Gehungerte (g) PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit Epo (E) inkubiert. Shc wurde aus 500 µg Zellextrakt mit anti-Shc immunpräzipitiert und mit anti-SHIP, anti-Shc oder anti-Grb2 (A) oder mit anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (B) geblottet. TL repräsentiert 100 µg Totalzelllysat und Ø zeigt die IP von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

### 3.5. Die Aktivierung von B-Raf durch Epo ist nicht essentiell für die Aktivierung von MEKs und Erks

Die Epo-induzierte und PI3K-abhängige Aktivierung von Ras und MEKs wirft die Frage auf, ob Raf-Kinasen für die Weiterleitung des Epo-Signals zu MEKs und Erks von Bedeutung sind. In ersten Experimenten wurden verschiedene phosphospezifische Antikörper gegen phosphorylierbare Epitope in c-Raf1 (pSer259, pSer338, pYpY340, 341) verwendet, die allerdings keine offensichtliche Änderung in der c-Raf1-Phosphorylierung zeigten (Ergebnisse nicht abgebildet). Daraufhin wurden gekoppelte Raf-MEK-Assays mit Kinase-inaktivem GST-Erk1K63M als Substrat durchgeführt. Während c-Raf1 nur schwach aktiviert wurde, war die B-Raf-Aktivität nach Epo-Stimulation der PEPs signifikant gesteigert (Abbildung 15). Die B-Raf-Aktivierung konnte durch WM-Vorbehandlung unterdrückt werden. Im Gegensatz dazu konnte keine Epo-induzierte Aktivierung von immunpräzipitiertem A-Raf beobachtet werden (ohne Abbildung). Wie schon für den PI3K-Assay erläutert, konnten LY-behandelte Proben nicht verwendet werden, da die LY-Inhibitorwirkung reversibel ist.



**Abb. 15: Die Aktivierung von B-Raf durch Epo wird durch Wortmannin blockiert.**

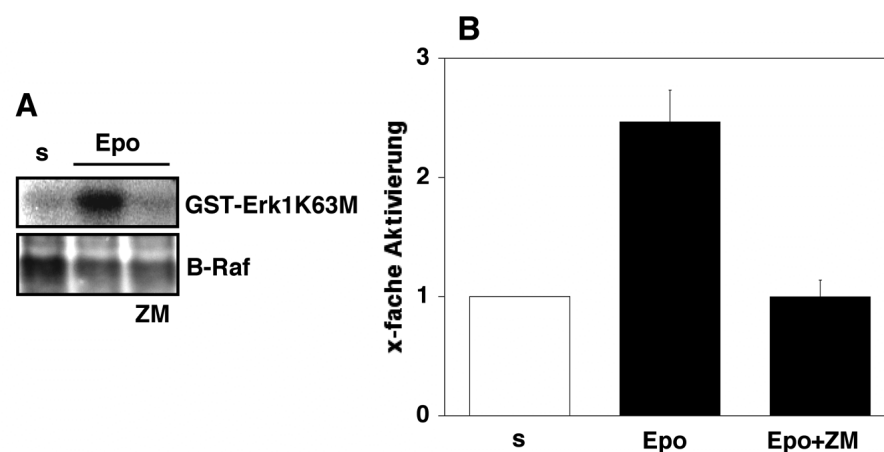
Gehungerte PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit Epo mit oder ohne Vorbehandlung durch 100 nM WM stimuliert.

**A und B** c-Raf1 wurde aus 500 µg Zellextrakt mit anti-c-Raf1 immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden entweder mit anti-c-Raf1 zur IP-Kontrolle geblottet (A, unterer Teil) oder mit GST-MEK und anschließend mit GST-Erk1K63M und  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP für den gekoppelten Kinaseassay inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und das phosphorylierte GST-Erk1K63M wurde mit dem Phosphoimager analysiert. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung A (oberer Teil) gezeigt. Die Quantifikation der c-Raf1-Aktivierung von Experimenten von drei unterschiedlichen Nabelschnurblutproben ist in Abbildung B gezeigt.

**C und D** Die B-Raf-Aktivierung wurde, wie weitgehend in A und B beschrieben, jedoch unter Verwendung von anti-B-Raf, analysiert.

Um herauszufinden, ob Raf-Kinasen wichtig für die Epo-induzierte MEK- und Erk-Aktivierung sind, wurden PEPs mit ZM336372 (ZM), einem potenten und spezifischen Raf-Inhibitor (Hall-Jackson et al., 1999), vorbehandelt. Die B-Raf-Aktivierung wurde im gekoppelten *in vitro* Kinaseassay gemessen und war in Epo-stimulierten und ZM-vorbehandelten PEPs vollkommen blockiert (Abbildung 16). Eine ZM-Vorbehandlung unterdrückte ebenfalls die SCF-induzierte Phosphorylierung von MEKs und Erks

(Abbildung 17A). Im Gegensatz dazu wurde die Epo-induzierte MEK- und Erk-Aktivierung durch die Behandlung mit ZM nicht beeinflusst. Der ZM-Inhibitor allein hatte keinen Einfluss auf die Erk-Aktivierung (Abbildung 17B), wie dies in anderen Zellsystemen beschrieben wurde. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass Raf-Kinasen für die durch minimale Epo-Konzentrationen induzierte MEK- und Erk-Aktivierung nicht entscheidend sind. Es war nicht möglich diese Ergebnisse mit den einzigen anderen kommerziell erwerbbaaren Raf-spezifischen Inhibitoren „Raf1-Kinase-InhibitorI“ und GW5074 zu bestätigen, da die Behandlung der PEPs, auch mit hohen Konzentrationen, die Epo-induzierte Erk-Aktivierung nicht inhibieren konnte.

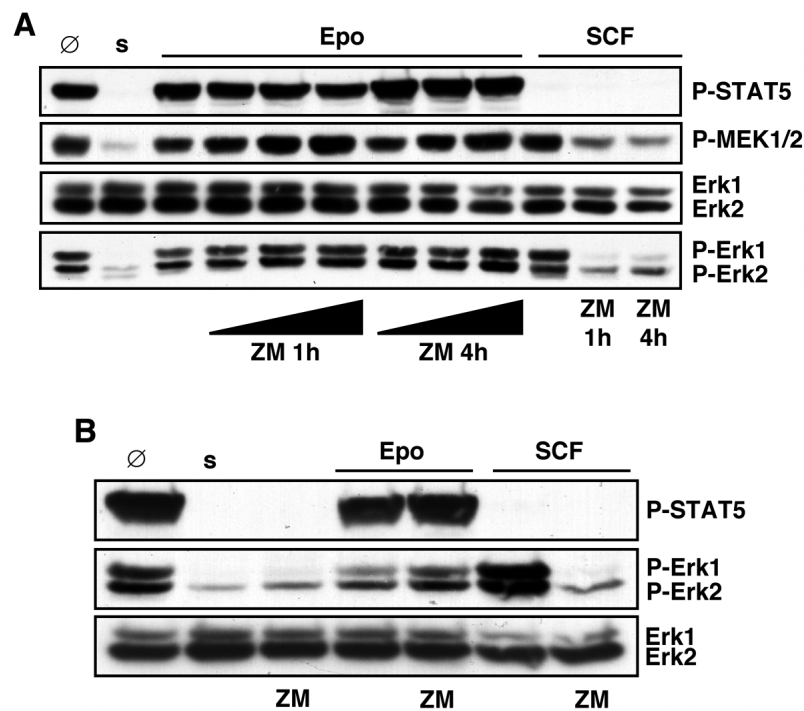


**Abb. 16: Raf-Kinase-Inhibitor ZM336372 unterdrückt die Epo-induzierte B-Raf-Aktivierung.**

Gehungerte PEPs wurden schein-stimuliert (s) bzw. mit Epo, mit oder ohne Vorbehandlung mit 10  $\mu$ M ZM336372 (ZM) für 1 h, stimuliert. 500  $\mu$ g Zellextrakt wurden mit anti-B-Raf immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden mit anti-B-Raf zur IP-Kontrolle geblottet oder mit GST-MEK und anschließend mit GST-Erk1K63M und  $^{32}$ P- $\gamma$ -ATP für den gekoppelten Kinaseassay inkubiert. Phosphoryliertes GST-Erk1K63M wurde nach SDS-PAGE durch einen Phosphoimager analysiert.

**A** Repräsentatives Beispiel für die Ergebnisse vom Phosphoimager.

**B** Quantitative Analyse der Ergebnisse von drei verschiedenen Nabelschnurblutproben.



**Abb. 17: Der Raf-Kinase-Inhibitor ZM336372 blockiert die SCF- aber nicht die Epo-induzierte Erk-Aktivierung.**

Gehungerte PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit ZM336372 (ZM), wie unten beschrieben, vorbehandelt und mit Epo oder SCF stimuliert. 100 µg Zellextrakt wurden mit anti-P-STAT5, anti-P-MEK1/2, anti-Erk1/2 oder anti-P-Erk1/2 geblottet. Ø zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

**A** Mit 0,1, 1 oder 10 µM ZM für 1 h oder 4 h vorbehandelte PEPs wurden mit Epo stimuliert oder mit 10 µM ZM vorbehandelte PEPs wurden mit SCF stimuliert.

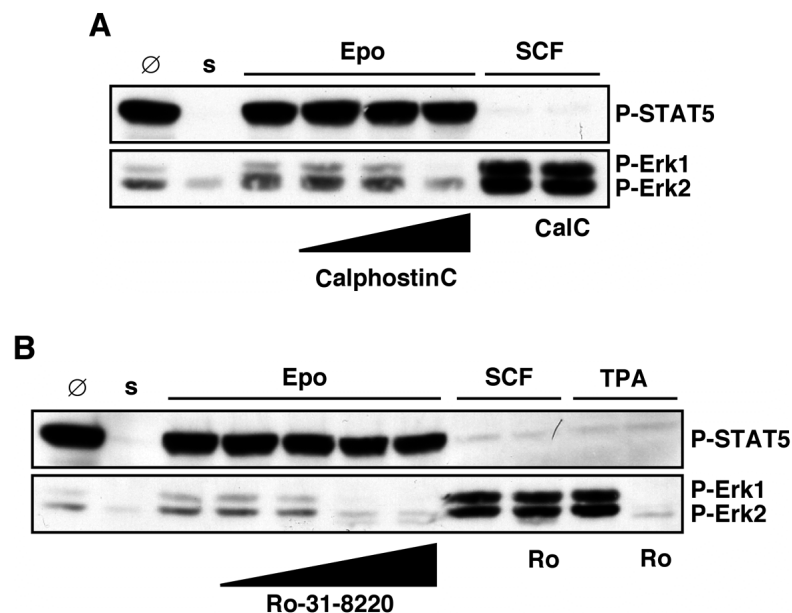
**B** PEPs wurden mit 10 µM ZM für 1 h vorbehandelt und nicht stimuliert (lane 3), mit Epo oder SCF stimuliert.

### 3.6. PKC-Inhibitoren blockieren die Epo-induzierte Aktivierung von MEKs und Erks

Die Raf-unabhängige Aktivierung der MEKs und Erks durch Epo könnte durch Mitglieder der Proteinkinase C (PKC)-Familie erfolgen (Muszynski et al., 2000). Da die Expression von zwei Mitgliedern dieser Familie, PKC $\alpha$  und PKC $\beta$ , während der Reifung von hämatopoetischen Vorläuferzellen entlang der erythroiden Linie deutlich ansteigt (Myklebust et al., 2000), wurden diese Kinasen mittels *in vitro* Kinaseassays nach Epo-Stimulation untersucht. Es konnte jedoch keine signifikante Aktivierung von PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  beobachtet werden. Da auch keine Phosphorylierung mit Hilfe phosphoepitop-spezifischer Antikörper gegen verschiedene PKC-Isoformen (PKC $\alpha$ , $\beta$ II Thr638/641; PKC $\delta$



Thr505; PKC $\delta$  Ser603; PKD/PKC $\mu$  Ser744/748; PKD/PKC $\mu$  Ser916; PKC $\theta$  Thr538; PKC $\zeta/\lambda$  Thr410/403) detektiert werden konnte (Ergebnisse nicht abgebildet), wurden häufig eingesetzte und strukturell verschiedene Inhibitoren (GF109203X, Gö6983, CalphostinC, Ro-31-8220), welche ein breites Spektrum von PKC-Isoformen blockieren, verwendet, um die Epo-stimulierte MEK- und Erk-Aktivierung zu blockieren. CalphostinC, ein von *Cladosporium cladosporioides* produzierter zellpermeabler Metabolit, welcher mit der regulatorischen Untereinheit von PKC durch Konkurrenz um die Bindungsstelle für Diazylglycerin und Phorbolster interagiert, sowie Ro-31-8220, ein synthetisch hergestellter Inhibitor, zeigten eine signifikante Blockierung der Epo-induzierten Erk-Aktivierung, wobei die SCF-induzierte MAPK-Aktivierung nicht inhibiert wurde (Abbildung 18). Als zusätzliche Kontrolle wurden PEPs mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, auch 12-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) genannt) stimuliert. TPA aktiviert PKCs *in vitro* und *in vivo* schon im nanomolaren Bereich.



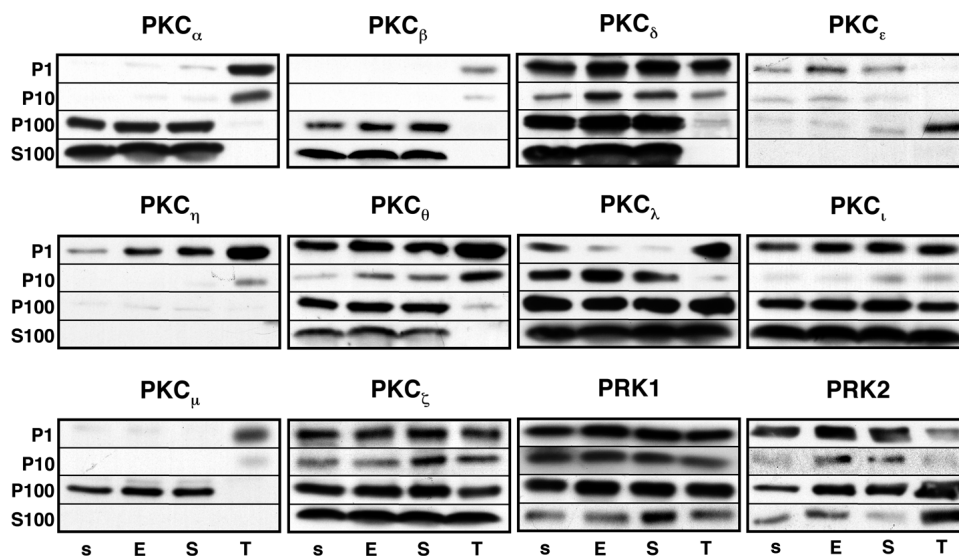
**Abb. 18: Die PKC-Inhibitoren CalphostinC und Ro-31-8220 blockieren die Epo-induzierte Erk-Aktivierung.**

Gehungerte PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit Inhibitoren, wie unten beschrieben, vorbehandelt und mit Epo oder SCF stimuliert. 100  $\mu$ g Zellextrakt wurden mit anti-P-STAT5 und anti-P-Erk1/2 geblottet. Ø zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

**A** Mit 10, 100 oder 1000 nM CalphostinC (CalC) für 1 h vorbehandelte PEPs wurden mit Epo stimuliert oder mit 1000 nM CalphostinC vorbehandelte PEPs wurden mit SCF stimuliert.

**B** PEPs wurden vor der Stimulation mit Epo mit 0,1, 1, 10 oder 100  $\mu$ M Ro-31-8220 (Ro) für 1 h vorbehandelt oder vor der Stimulation für 10 min mit SCF oder 100  $\mu$ M TPA mit 100  $\mu$ M Ro vorbehandelt.

Wie erwartet wurde durch die Behandlung der PEPs mit TPA die MAPK Erk aktiviert, was durch die Vorbehandlung mit Ro völlig blockiert werden konnte. Das zeigt sehr eindrucksvoll, wie der Epo-, als auch der TPA-Signalweg sich von dem SCF-induzierten unterscheiden. Leider ist es auf Grund der Größe und Komplexität der PKC-Familie zur Zeit nicht möglich mit Hilfe von Inhibitoren eindeutige Rückschlüsse auf beteiligte PKC-Isoformen zu ziehen.



**Abb. 19: Translokation in PEPs exprimierter PKC-Isoformen.**

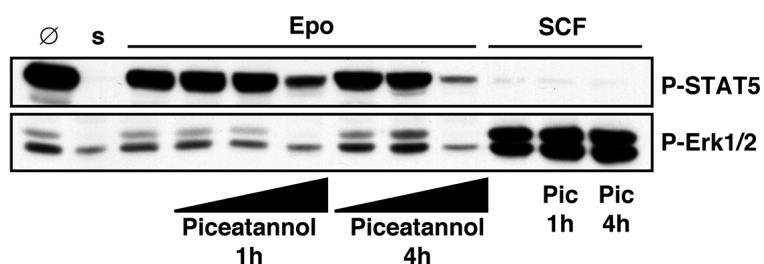
Gehungerte PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit Epo (E), SCF (S) oder 100  $\mu$ M TPA (T) für 10 min stimuliert. 10% Zellextrakt von jeder Fraktion (P1-100, S100) wurde mit anti-PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\lambda$ ,  $\iota$ ,  $\mu$ ,  $\zeta$ ), anti-PRK1 oder anti-PRK2 geblottet.

Western-Blot-Analysen totaler Proteinextrakte zeigten, dass die meisten Isoformen in PEPs exprimiert sind (Abbildung nicht gezeigt). Aktivierte PKCs haben die Eigenschaft in der Zelle zu translozieren. Deshalb wurden die Änderungen der subzellulären Lokalisation exprimierter PKC-Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\lambda$ ,  $\iota$ ,  $\mu$ ,  $\zeta$ ), sowie der Proteinkinase C-verwandten Kinasen PRK1/2, durch Zellfraktionierung schein-, Epo-, SCF- bzw. TPA-stimulierter PEPs analysiert. In den meisten Fällen kam es durch TPA-Stimulation zu detektierbaren Translokationen. Im Gegensatz zur TPA-Positivkontrolle

konnte dies nach SCF- oder Epo-Behandlung nicht oder nicht eindeutig detektiert werden (Abbildung 19). Deshalb bleibt noch offen, welche PKC-Isoform bedeutend für die Epo-induzierte MEK- und Erk-Aktivierung ist.

### **3.7. Suche nach Epo-aktivierten Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen**

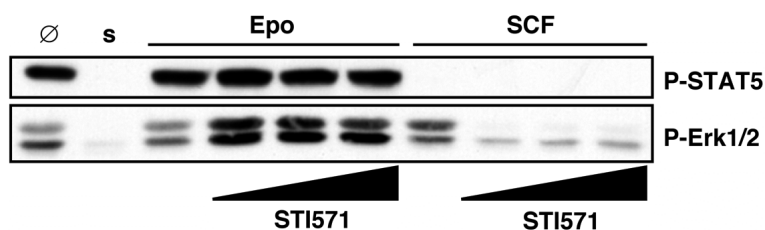
Allgemein wird angenommen, dass die Nichtrezeptor-Tyrosinkinase Jak2, welche konstitutiv an den EpoR gebunden ist, nach Epo-Stimulation alle weiteren Signalkaskaden auslöst. Zwar wurde Jak2 nach Epo-Stimulation von PEPs phosphoryliert (Abbildung 9B), aber der Versuch diese Kinase mit Hilfe des spezifischen und weit angewendeten Inhibitors AG490 zu blockieren, war im verwendeten Zellsystem nicht erfolgreich. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass AG490 in humanen PEPs durch mangelndes Eindringen, rapiden Metabolismus oder Export nicht in wirksamer Konzentration intrazellulär angereichert wird. Da die meisten Jak2-betreffenden Studien mit AG490 in Mauszelllinien durchgeführt wurden, könnten aber auch in Epo-stimulierten humanen PEPs andere Tyrosinkinasen von Bedeutung sein. Um das zu untersuchen, wurden PEPs mit unterschiedlichen Inhibitoren von Tyrosinkinasen vorbehandelt. Ein für die Janus-Proteintyrosinkinase Jak3 spezifischer Inhibitor (Jak3-InhibitorIII) hatte, genauso wie der Inhibitor PP2 (spezifisch für die Tyrosinkinasen Lck, Fyn und Hck (Hanke et al., 1996)), unspezifische Nebeneffekte, wie durch die Verwendung jeweiliger Kontrollkomponenten („Jak3-Inhibitor-Negativkontrolle“ und PP3) gezeigt werden konnte. Piceatannol, ein Pflanzenmetabolit und Inhibitor für die Src-Kinase Syk (Cambien et al., 1999) zeigte, wie in Abbildung 20 zu sehen ist, neben einer Inhibierung der Epo-induzierten Erk-Aktivierung auch eine Blockierung der Epo-induzierten STAT5-Phosphorylierung. Die durch SCF aktivierten Erks wurden durch Piceatannol nicht blockiert. Somit bleibt offen, ob es sich um eine unspezifische Inhibierung oder einen Epo-spezifischen Effekt handelt, wobei eine Src-Kinase dem EpoR vorgeschaltet bzw. statt Jak2 eine Src-Kinase (z.B. Syk) essentiell sein müsste. Es bleibt zu klären, welche Src-Kinasen durch Piceatannol blockiert werden. Erste Versuche mit *in vitro* Syk-Kinaseassays ergaben keinerlei Erkenntnisse.



**Abb. 20: Der Src-Kinaseinhibitor Piceatannol blockiert die Epo-induzierte Erk-Aktivierung.**

Gehungerte PEPs wurden schein-stimuliert (s) oder mit 0, 1, 10 oder 100  $\mu\text{M}$  Piceatannol (Pic) für 1 h oder 4 h vorbehandelt und mit Epo stimuliert. Parallel dazu wurden Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  Pic vorbehandelt und mit SCF stimuliert. 100  $\mu\text{g}$  Zellextrakt wurden mit anti-P-STAT5 oder anti-P-Erk1/2 geblottet.  $\emptyset$  zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

STI571 (Imatinibmesylat, Glivec; ursprünglich als „platelet-derived growth factor receptor“ (PDGFR)-Inhibitor entwickelt) inhibiert Tyrosinkinasen, wie c-Abl, Arg und Bcr-Abl, aber auch c-Kit und wurde in, mit Epo oder SCF zu stimulierenden, PEPs eingesetzt. Es konnte jedoch nicht nur keine Inhibierung der Epo-induzierten Erk-Aktivierung detektiert werden (Abbildung 21), sondern die P-Erk-Signale waren in STI571-behandelten PEPs sogar stärker als in unbehandelten Zellen. Ohne weitere umfangreiche Experimente, die nicht dem Thema dieser Arbeit entsprechen, ist dieser Befund nicht eindeutig interpretierbar. Dagegen wurde, wie erwartet, die SCF-induzierte Erk-Aktivierung schon mit geringen STI571-Konzentrationen blockiert. Dieses Experiment zeigt, dass c-Kit nicht essentiell für Epo-induzierte Signale ist, d.h. es findet nach Epo-Gabe kein Rezeptor-Crosstalk mit c-Kit statt, wie dies bei diversen anderen Transmembranrezeptoren beschrieben wurde.



**Abb. 21: Der Tyrosinkinaseinhibitor STI571 blockiert nicht die durch Epo-induzierte Erk-Aktivierung.**

Gehungerte PEPs werden schein-stimuliert (s) oder mit 3, 10 oder 30  $\mu\text{M}$  STI571 für 1 h vorbehandelt und mit Epo oder SCF stimuliert. 100  $\mu\text{g}$  Zellextrakt wurden mit anti-P-STAT5 oder anti-P-Erk1/2 geblottet.  $\emptyset$  zeigt Proteinextrakt von nicht gehungerten, unbehandelten PEPs.

## **4. Diskussion**

Es ist wichtig die Physiologie der Erythropoese zu verstehen, um Krankheiten, wie z.B. Anämien, gezielt bekämpfen zu können. Wie bereits im Abschnitt 2.4. erwähnt, spielt Epo mittels seiner endokrinen Wirkung auf die Erythrozytenentstehung eine essentielle Rolle. Durch die Untersuchung der Wirkungsweise von Epo auf die Zellen sollen entscheidende Erkenntnisse gewonnen werden, die es unter anderem erlauben, pathologische Veränderungen der Erythropoese besser zu erkennen und eventuell zu beeinflussen.

Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Systeme, alle mit spezifischen Vor- und Nachteilen, wurden bisher verwendet, um Epo-induzierte intrazelluläre Ereignisse zu untersuchen. In diesem Teil der Arbeit werden zu Beginn die verschiedenen Systeme diskutiert, vor allem, um die Bedeutung des in dieser Arbeit verwendeten Systems herauszustellen. Anschließend werden die gewonnenen Erkenntnisse in einem Modell integriert und diskutiert.

### **4.1. Systeme zur Untersuchung von Epo-induzierten intrazellulären Signalen**

#### **4.1.1. *In vivo* Analysen im Maus-Modell**

Mutierte Mausembryonen, die keinen EpoR exprimieren, entwickeln eine schwere Anämie und sterben nach ca. 13,5 Tagen *in utero* (Zang et al., 2001). Der in den EpoR<sup>-/-</sup>-Mäusen gesehene Defekt kann durch die Expression eines humanen EpoR-Transgens umgangen werden (Yu et al., 2001), womit sich für den humanen EpoR spezifische Interaktionen untersuchen lassen, auch wenn das von der Maus produzierte Epo eine ca. 10-fach geringere Aktivität als humanes Epo auf den humanen EpoR hat (Nicolini et al., 1999) und die Interaktionen zwischen humanem EpoR und Maus-Signalproteinen weniger effizient sind (Divoky et al., 2001). Andere wichtige Erkenntnisse für die Epo-induzierte Signalkaskade konnten durch die Ausschaltung der Gene für Jak2, SHP2, PLC $\gamma$ , STAT5a/b sowie GATA-1 und -2 gewonnen werden (Liao et al., 2002; Ohneda und Yamamoto, 2002;

Qu et al., 1997; Socolovsky et al., 1999; Socolovsky et al., 2001). Obwohl durch solche Mausstudien Schlüsselproteine für die Epo-induzierte Signaltransmission identifiziert werden können, sind doch biochemische Analysen, wie z.B. GTPase-Assays oder Kinaseassays in Mäusen kaum durchführbar. Deshalb wurden bisher die meisten biochemischen Studien zur Aufklärung des Epo/EpoR-Systems in Zelllinien durchgeführt, die endogenen oder stabil transfizierten EpoR exprimieren (z.B. UT-7, SKT6, HEL, F-36P, HCD57, JE-2, AS-E2, K562, Friend cells, Ba/F3-EpoR, 32D-EpoR und FDCP-EpoR).

#### **4.1.2. Zelllinien als *in vitro* Modell**

Die Arbeit mit Zelllinien hat den Vorteil relativ preiswert zu sein, da mit einfachen Kulturmedien schnell sehr große Zellzahlen generiert werden können. Da die Zellen in den meisten Fällen auch leicht zu transfizieren sind, bietet dieses System die Möglichkeit, Proteine gezielt überzuexprimieren. Unglücklicherweise führten die in der Vergangenheit so gewonnenen Ergebnisse von verschiedenen Epo-Studien sehr häufig zu Diskrepanzen, welche z.B. aus den unterschiedlichen genetischen Hintergründen aller der verschiedenen verwendeten Krebszelllinien resultieren könnten. Zusätzlich wurden viele dieser Experimente mit sehr hohen Konzentrationen von Epo ( $> 1$  E/ml) durchgeführt. So kommt es z.B. in 32D-Zellen, welche EpoR mit mutierten Tyrosinresten überexprimieren (womit die Rekrutierung von Proteinen mit SH2-Domänen (z.B. STAT5) verhindert wurde) immer noch zu einer effizienten Aktivierung der *bcl-x* Genexpression (Quelle et al., 1998). Dagegen ist in HCD-57-Zellen die *bcl-x*-Expression von der STAT5-Aktivierung durch den EpoR abhängig (Silva et al., 1999). Zwar führte die Überexprimierung solcher EpoR-Mutanten zur Identifizierung von Proteinen, die nach Epo-Stimulation spezifisch an die verschiedenen Tyrosinreste rekrutiert wurden (Klingmuller, 1997; Wojchowski et al., 1999), aber inwieweit dies *in vivo* von Bedeutung ist, bleibt zur Zeit noch ungeklärt. So sind z.B. Mäuse, die EpoR ohne funktionsfähige Tyrosine exprimieren, unter normalen Umständen überlebensfähig und zeigen gegenüber Wildtypmäusen keine offensichtlichen Veränderungen in der Erythropoese (Zang et al., 2001). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass *in vivo* kompensatorische Mechanismen existieren, d.h. dass ein Signalweg,

unabhängig von den Tyrosinen des EpoR, ausreicht, um das Epo-Signal effizient weiterzuleiten. Diese Theorie könnte auch erklären, warum in diesen mutierten Mäusen z.B. durch starken Blutverlust eine notwendige Antwort der Erythropoese im Vergleich zu Wildtypmäusen ausbleibt, und somit der plötzliche starke Verlust von roten Blutzellen nicht kompensiert werden kann. Dafür sind wahrscheinlich, neben dem EpoR-Tyrosin-unabhängigen Signalweg, zusätzliche stärkere Signale notwendig, die nun allerdings von EpoR-Tyrosinen abhängig sind.

#### **4.1.3. *In vitro* Untersuchungen von primären Zellen**

Die *in vitro* Untersuchung primärer hämatopoetischer Zellen bietet eine andere Möglichkeit molekulare Mechanismen der erythroiden Zellentwicklung zu studieren. Allerdings ist es nicht billig Zellen aus z.B. Mäusen oder Menschen zu isolieren und zu kultivieren. Die Abhängigkeit von der Verfügbarkeit humanen Materials ist ebenfalls ein Nachteil, da primäre Zellen nicht unsterblich sind und deshalb ständig neue Zellen generiert werden müssen. Das sich daraus ergebende kleine zeitliche Fenster für Experimente macht es oftmals unmöglich auf z.B. gerade erzielte Ergebnisse mit großer Flexibilität z.B. durch Parameteränderungen zu reagieren. Desweiteren ist es bisher kaum möglich Primärzellen effizient zu transfizieren ohne ihre normale Proliferation und Differenzierung nachhaltig zu beeinflussen. Trotzalledem bleibt die Untersuchung von primären Zellen *in vitro* zur Zeit die einzige Möglichkeit, um physiologisch relevante Ergebnisse mittels umfangreiche biochemische Experimente zu erlangen.

Es ist zur Zeit nicht möglich hämatopoetische Vorläuferzellen (z.B. Erythroblasten) gezielt durch direkte Aufreinigung über Immunselektion von spezifischen Oberflächenmarkern aus humanem Knochenmark oder peripherem Blut in hoher Zellzahl aufzureinigen. Dagegen ist es durch die von Freyssinier et al. beschriebene Methode möglich geworden, hämatopoetische Stammzellen (HSC) aus humanem Nabelschnurblut zu gewinnen und durch *in vitro* Expansion und Differenzierung Erythroblasten (PEPs) in hoher Zellzahl zu generieren (Freyssinier et al., 1999). Diese Zellen eignen sich wegen

ihrer starken Abhängigkeit von Epo gut zur Untersuchung Epo-induzierter intrazellulärer Signalereignisse.

Bekanntermaßen können Epo-induzierte Signale mit denen anderer Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Hormone *in vivo* zusammenarbeiten. Um Epo-spezifische Signale herauszuarbeiten, sollten Epo-stimulierte Zellen unter serumfreien Kulturbedingungen analysiert werden, so dass Effekte anderer im Serum vorliegender unbekannter Faktoren ausgeschlossen werden können. Diese Fehlerquelle wurde in der vorliegenden Studie durch den Einsatz serumfreien Mediums und eines definierten Zytokincocktails während der gesamten Kultivierung und Experimente eliminiert. Eine andere mögliche Quelle der Unsicherheit ist das heterogene Genom der Blutspender. Die wesentlichen Ergebnisse der vorgelegten Untersuchungen sind jedoch unabhängig vom individuellen Spender sehr gut reproduzierbar, so dass humane Zellen in dieser Hinsicht gut geeignet erscheinen.

## 4.2. Inhibitoren

Wie schon erwähnt, können primäre Zellen nur in den seltensten Fällen transfiziert werden. Die zur Zeit einzige Alternative, um Signalwege zu beeinflussen, besteht im Einsatz von enzyspezifischen Inhibitoren. Diese kleinen membranpenetrierenden Moleküle haben für die Untersuchung von Signalkaskaden verschiedene Vorteile. So können sie im Gegensatz zu Transformationen einfach und sehr kurzzeitig eingesetzt werden. Sie inhibieren endogene Proteine, was den Einsatz dominant negativer Proteine überflüssig macht und durch Überexpression induzierte unspezifische Effekte auf Signalkaskaden vermeidet. Trotzdem muss bei der Verwendung von Inhibitoren beachtet werden, dass die kommerziell verfügbaren Inhibitoren nur für ausgewählte Enzyme getestet werden und somit unspezifische Effekte nicht vollkommen ausgeschlossen werden können. Dieser Nachteil kann oft durch den Einsatz von mehreren, strukturell nicht verwandten und für das gleiche Protein spezifischen, Inhibitoren kompensiert werden. So z.B. inhibiert der PI3K-Inhibitor LY294002 im Gegensatz zu Wortmannin die Serin/Threoninkinase CK2 (Davies et al., 2000). Durch Testung beider Inhibitormoleküle kann aber ein unerwünschter Effekt auf CK2 erkannt und berücksichtigt werden. In einigen Fällen werden von den Herstellern



Kontrollkomponenten angeboten, welche dem Inhibitor strukturell zwar sehr ähnlich sind, aber keine inhibitorische Wirkung auf das Zielenzym haben. Diese sind gerade für die Untersuchung von Proteinen, die sich am Anfang einer Signalkaskade befinden und multiple Signalwege beeinflussen, sehr nützlich. So konnten z.B. die Effekte des Src-Kinaseinhibitors PP2, welcher neben der Epo-induzierten Erk-Signalkaskade auch die STAT5-Aktivierung inhibiert, mit Hilfe der Kontrollkomponente PP3 als unspezifisch erkannt werden (siehe auch 3.7.).

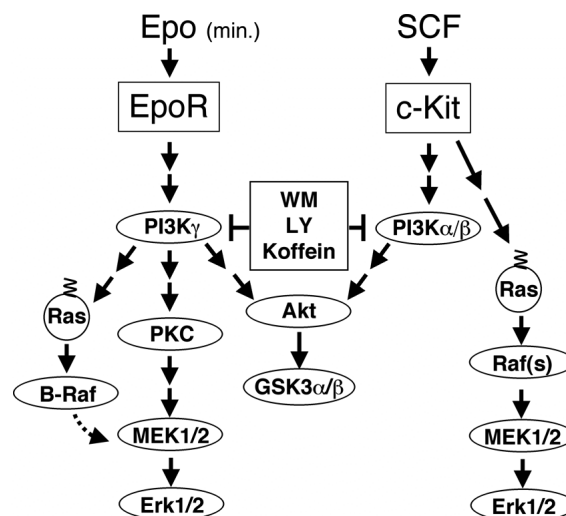
Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren sind ATP-Kompetitoren. Die von den Herstellern angegebenen Spezifitäten stammen aus *in vitro* Experimenten mit genau definierten ATP-Konzentrationen. Da in den Zellen jedoch eine viel höhere Konzentration an ATP herrscht, müssen die Inhibitoren oftmals in mehr als 10-fach höheren Mengen, als vom Hersteller angegeben, verwendet werden. Diese nun hohen Konzentrationen verursachen gelegentlich unspezifische Effekte durch Inhibierung mehrerer Kinasen. Daher können nur über Durchführung geeigneter Kontrollexperimente Fehlinterpretationen vermieden werden.

### **4.3. SCF/c-Kit-Signalkaskade als distinkter Signalweg der Erk-Aktivierung**

Wie erwartet, wurde im Gegensatz zum Epo-Signalweg, in SCF-stimulierten PEPs Erk über die klassische Raf-abhängige mitogene Signalkaskade aktiviert (vergleiche Abschnitt 3.). Damit konnte das SCF/c-Kit-System dem Epo/EpoR-System gegenübergestellt werden und als Kontrolle für den Einsatz von Inhibitoren verwendet werden. Somit wurde eine Fehlinterpretation von Inhibitor-induzierten Effekten auf die untersuchte Signalkaskade vermieden. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass SCF das Epo-induzierte Zellwachstum erythroider Zelllinien nachahmen kann, wobei SCF die Phosphorylierung beider Rezeptoren induziert (Kapur et al., 1998; Wu et al., 1995a). Jedoch konnte in den in dieser Arbeit untersuchten PEPs keine SCF-induzierte EpoR-Phosphorylierung beobachtet werden (Abbildung 9B). Des weiteren konnte der Transkriptionsfaktor STAT5 zwar durch Epo, nicht aber durch SCF aktiviert werden.

#### 4.4. PI3K als Vermittler der Epo-induzierten Erk-Aktivierung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass PI3-Kinasen, insbesondere PI3K $\gamma$ , essentielle Moleküle der durch minimale Konzentrationen an Epo induzierten MEK- und Erk-Aktivierung sind. Dieser neu definierte Epo-induzierte Signalweg ist zusammenfassend und im Vergleich zum SCF-induzierten Signalweg in Abbildung 22 dargestellt.



**Abb. 22: Der durch minimale Epo-Konzentrationen induzierte Signalweg zu MEKs und Erks.**

Die dargestellten Signalproteine wurden im vorangehenden Text bereits eingehend erläutert.

Das abgebildete basale Epo-Signal kann durch andere, hier nicht vollständig gezeigte, Signalwege (aktiviert durch höhere Epo-Konzentrationen und/oder andere Faktoren) amplifiziert oder moduliert werden. Das würde dann oft von SH2-Domänen-Interaktionen mit dem zytosomatischen EpoR-Teil abhängig sein. Ob Ras eine essentielle Rolle in der Aktivierung von MEK und Erk nach Epo-Stimulation spielt, muss noch abgeklärt werden. Die beobachtete Aktivierung von B-Raf ist jedenfalls kein essentielles Signal für die MEK-Erk-Aktivierung durch minimale Epo-Konzentrationen, könnte aber bei der Signalamplifizierung von Bedeutung sein.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass PI3K $\gamma$  das Signal von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren übertragen. Dabei assoziiert die regulatorische Untereinheit p101 der PI3K $\gamma$  eng mit G $\beta\gamma$ , was zu einer starken Aktivierung der PI3K $\gamma$  führt (Stephens et al., 1997). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass heterotrimere G-Proteine an transfizierten EpoR koppeln können und eine Epo-induzierte Erk-Aktivierung von PI3K abhängig ist (Guillard et al., 2003). Jedoch kann, wie in dieser Arbeit gezeigt, in PEPs die Erk-Aktivierung nicht durch Pertussistoxin (welches die

Aktivierung von G $\beta\gamma$  inhibiert) blockiert werden. Erweiternd könnte noch versucht werden, die Beteiligung von G-Proteinen durch Expression des  $\beta\gamma$ -Kompetitorpolypeptids  $\beta$ ARK1 nachzuweisen, wobei hier wiederum das Problem besteht, dass PEPs sich nicht leicht transfizieren lassen und somit vermutlich auf eine Zelllinie zurückgegriffen werden müsste.

Eine direkte Interaktion von Ras und PI3K $\gamma$  wurde bereits mehrfach *in vitro* gezeigt (Pacold et al., 2000; Rubio et al., 1997). Der Nachweis eines Komplexes dieser beiden Proteine in PEPs war jedoch nicht erfolgreich, ebensowenig wie eine Komplexbildung zwischen p110 $\gamma$ - oder p101-Untereinheiten und Jak2 oder EpoR. Welcher Mechanismus genau zur Epo-induzierten Aktivierung von PI3K $\gamma$  führt, bleibt somit noch zu klären. Letztendlich könnte PI3K $\gamma$  auch als Proteinkinase funktionieren. Ob allerdings eine solche Aktivität im Epo-induzierten System eine Rolle spielt, muss ebenfalls noch untersucht werden.

Um die Funktion der PI3K $\gamma$  genauer aufzuklären, werden im Labor zur Zeit mehrere Systeme etabliert. Zum einen werden in UT-7 Zellen dominant negative Konstrukte der PI3K $\gamma$  überexprimiert und zum anderen soll über ein virales Infektionssystem kleine interferierende RNA (siRNA) für die Herunterregulierung der PI3K $\gamma$ -Expression in PEPs eingebracht werden.

Ein alternativer Weg Erks zu aktivieren, wäre über die Regulierung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dabei phosphorylieren z.B. aktivierte Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen der Tec-Familie (z.B. Btk und Bmx) die Phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) (Scharenberg und Kinet, 1998). Das führt zum erhöhten Kalziumeinstrom, was wiederum über die prolinreiche Tyrosinkinase 2 (Pyk2) und Ras die Erk-Aktivität induziert (Lev et al., 1995). Wie schon im Ergebnisteil 3.2. erwähnt, konnten erste Experimente in PEPs keine Hinweise auf solch einen Mechanismus geben. Trotzdem sollten neben dem Nachweis von Phosphorylierungen zusätzlich verschiedene Inhibitoren für z.B. Btk und verwandte Kinasen getestet, sowie der Kalziumspiegel in PEPs vor und nach Epo-Stimulation gemessen werden. Dies würde möglicherweise weitere Ansatzpunkte zur Klärung einer Epo-induzierten und PI3K- und/oder eventuellen Ras-abhängigen Erk-

Aktivierung schaffen. PLC $\epsilon$  könnte ebenfalls im Zusammenspiel mit kleinen Ras-GTPasen involviert sein (Rhee, 2001) (siehe 4.7.).

#### 4.5. Die Rolle der kleinen Ras-GTPasen

Das Ras-Proteine in der Erythropoese von Bedeutung sind, zeigt die Tatsache, dass *K-ras*<sup>-/-</sup>, *N-ras*<sup>-/-</sup> und *K-ras*<sup>+/-</sup>-Mäuse schwere Anämien haben und schon im frühen embryonalen Alter sterben (Johnson et al., 1997). Andere Studien belegen, dass Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS), als Folge einer Ras-Mutation, eine reduzierte erythroide Zellproduktion haben, was durch Blockierung der erythroiden Vorläuferproduktion hervorgerufen werden könnte (Backx et al., 1993; Chui und Clarke, 1982; Sawada et al., 1995). Des weiteren ist die terminale erythroide Differenzierung humaner CD34<sup>+</sup>-Zellen, welche onkogenes N-Ras exprimieren, durch erhöhte Apoptose und reduzierte Proliferationsrate gekennzeichnet (Darley et al., 1997). Dagegen hat z.B. die Überexpression von dominant negativem H-Ras (H-RasN17) in fötalen Mausleberzellen, bei anschließender Differenzierung in die erythroide Richtung, keinen negativen Einfluss auf die terminale erythroide Entwicklung (Zhang et al., 2003). Durch die Vielzahl kontroverser Ergebnisse aus solchen und anderen Experimenten (Carroll et al., 1991; Chida et al., 1999; Miura et al., 1994; Sakamoto et al., 2000) bleibt die genaue Rolle von Ras-Proteinen in der Erythropoese bisher ungeklärt.

In den hier verwendeten PEPs kommt es durch Stimulation mit minimalen Konzentrationen an Epo zur PI3K-abhängigen Ras-Aktivierung (Ergebnisteil 3.2.). Da es jedoch wegen fehlender Ras-spezifischer Inhibitoren bisher nicht möglich war, Ras zu inhibieren, kann die Rolle von Ras nicht eindeutig gezeigt werden. So könnte Ras auf der einen Seite die Raf-Kinasen aktivieren, was jedoch in PEPs bei minimalen Epo-Konzentrationen keine Bedeutung für die Erk-Aktivierung hat (Ergebnisteil 3.5.), und auf der anderen Seite Raf-unabhängig die Phosphorylierung von Erk induzieren. Die Aufgabe von Ras könnte auch die Rekrutierung von PI3K an die Zellmembran sein. Allerdings wäre damit Ras in der Signalkaskade oberhalb von PI3K angesiedelt, was nicht vereinbar ist mit der Tatsache, dass PI3K-Inhibitoren die Epo-induzierte Ras-Aktivierung in PEPs

inhibieren. Hinweise auf die Funktion von Ras könnte möglicherweise eine Überexpression von dominant negativem Ras in PEPs geben, falls diese technisch machbar ist. Des Weiteren wäre es von Bedeutung zu wissen, welche Isoform von Ras in den Epo-induzierten PEPs aktiviert und durch PI3K-Inhibitoren geblockt ist, da es, wie oben diskutiert, entscheidende Unterschiede in den Funktionen der verschiedenen Isoformen gibt.

#### 4.6. Die Funktion der Raf-Kinasen

Raf-Kinasen können unter anderem durch die kleinen Ras-GTPasen reguliert werden. Dieses Ereignis ist allerdings sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden. Während der Aktivierung von z.B. der am besten untersuchten Raf-Kinase c-Raf1 kommt es zu mehrfachen Änderungen von Phosphorylierungen, Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen (Dhillon et al., 2002). So hat z.B. in 3T3-Säugerzellen c-Raf1 eine Grundphosphorylierung der Serine 43, 259 und 621. Eine mitogene Stimulation dieser Zellen resultiert in der Phosphorylierung anderer Stellen in der Kinasedomäne (Serin 338 und Tyrosin 341), in der Aktivierungsschleife (Threonin 491 und Serin 494) und im C-terminalen Teil von c-Raf1 (Serin 621) (Dhillon et al., 2002).

In den PEPs wurden die Isoformen c-Raf1 und B-Raf durch Epo aktiviert (Ergebnisteil 3.5.). Die Steigerung der katalytischen Aktivität von Raf-Kinasen durch diverse Stimuli ist generell gering, jedoch ausreichend, um *in vivo* ein Signal zu den Erks weiterzuleiten. Zusammen mit den komplexen Phosphorylierungsereignissen erschwert dies allerdings eine direkte Detektion der Raf-Kinaseaktivität und könnte erklären, warum in PEPs mit Phosphoepitop-spezifischen Raf-Antikörpern keine Phosphorylierungsänderungen nachweisbar waren. Dennoch kann mit Hilfe des gekoppelten Raf-Kinaseassays das schwache Raf-Signal amplifiziert und somit gemessen werden (Ergebnisteil 3.5.). Die in Epo-stimulierten PEPs vergleichsweise geringe Aktivierung von c-Raf1 schließt nicht automatisch eine funktionelle Rolle von c-Raf1 aus. So konnte z.B. in anderen Zellsystemen gezeigt werden, dass c-Raf1-Moleküle andere Proteine durch Bildung eines sogenannten „scaffold“-Proteinkomplexes stabilisieren können (Denouel-

Galy et al., 1998; Yu et al., 1998). Deshalb wäre es von Interesse mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen eventuell in PEPs existierende Komplexe, welche Proteine wie Raf, MEK, Erk oder auch Mitglieder der p21-aktivierten Kinase (PAK)- Superfamilie einschließen könnten, zu identifizieren.

Die B-Raf-Aktivierung setzt nicht unbedingt eine Tyrosinphosphorylierung voraus, wie durch Marais et al. und Mason et al. (Marais et al., 1997; Mason et al., 1999) gezeigt wurde. B-Raf wird bereits durch Ras-induzierte Translokation zur Zellmembran aktiviert. Über subzelluläre Fraktionierungen oder auch Immunfluoreszenzmarkierungen könnte gezeigt werden, ob Epo in PEPs eventuell über solche Mechanismen die B-Raf-Aktivierung induziert.

Der Raf-Inhibitor ZM336372 blockierte in PEPs die Epo-induzierte B-Raf-Aktivierung, aber nicht die der Erks (Abbildung 16. und 17.). In einer Veröffentlichung wurde von einem Paradoxon gesprochen, da dieser Inhibitor die c-Raf1-Kinase angeblich bis zu 100-fach aktivieren kann, ohne jedoch Erks zu aktivieren (Hall-Jackson et al., 1999). In den PEPs inhibiert ZM B-Raf, und ZM alleine ist nicht in der Lage die Erk-Phosphorylierung (z.B. durch eine unspezifische Raf-Aktivierung) zu stimulieren. Dagegen wird die SCF-induzierte Erk-Aktivität mit ZM inhibiert (Abbildung 17). Zur Zeit sind außer Raf1-Kinase-InhibitorI und GW5074, welche beide in den PEPs unwirksam sind, keine weiteren Raf-Inhibitoren kommerziell erhältlich.

#### **4.7. Die Beteiligung von Kinasen der PKC-Familie**

Die Raf-unabhängige Erk-Aktivierung kann zum Beispiel durch PKCs vermittelt werden (Kamiguti et al., 2003; Monick et al., 2000). Aufgrund der breiten Palette der PKCs sind keine spezifischen Inhibitoren für einzelne PKC-Isoformen erhältlich. Wie Abbildung 18 zeigt, konnte die Epo-induzierte Erk-Aktivierung durch zwei verschiedene breit wirksame PKC-Inhibitoren geblockt werden. Da in den PEPs 11 verschiedene Isoformen exprimiert sind, konnten daraus noch keinerlei Rückschlüsse auf einzelne beteiligte Isoformen gezogen werden. Jedoch könnten zukünftig durch gezielte Kombination verschiedener Inhibitoren (blockieren jeweils nur ein bestimmtes Spektrum an Isoformen) einige PKC-

Isoformen bereits ausgeschlossen werden, was gezielte Experimente, wie Kinaseassays, für die verbleibenden Isoformen weniger aufwändig machen würde.

Aktivierte PKCs translozieren oft innerhalb der Zelle (Abbildung 19). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit neben subzellulären Fraktionierungen aktivierte translozierte PKC-Isoformen z.B. auch über Immunfluoreszenzfärbungen nachzuweisen. Das könnte jedoch durch den großen Zellkern der PEPs und seinen sehr geringen Abstand zur Zellmembran erschwert werden. PKCs benötigen für die Translokation spezifische Ankerproteine, welche eventuell einen guten Angriffspunkt bieten, um z.B. mit Peptidfragmenten in PEPs eine PKC-Bindung zu blockieren oder die Translokation zu induzieren (Csukai und Mochly-Rosen, 1999; Liu et al., 1999).

Unsere Hypothese, dass die Epo-stimulierte Erk-Aktivierung PI3K- und PKC-abhängig ist (Abbildung 22), wobei PKC durch PI3K reguliert wird, lässt die Frage offen, ob PKC nicht vielleicht auch die PI3K-Aktivität induzieren kann. So wurde z.B. in einer Epo-stimulierten murinen Zelllinie durch PKC-Inhibierung die Kinase Akt blockiert (von Lindern et al., 2000). Es wurde auch gezeigt, dass Blockierung der PI3K-Aktivität teilweise durch PKC kompensiert werden konnte und beide Kinasen nach Epo-Stimulation miteinander interagierten. Um das zu untersuchen, könnte getestet werden, ob in PEPs die PKC-Inhibitoren eine Epo-induzierte PI3K-Aktivität blockieren. Eine andere interessante und noch zu prüfende Theorie wäre die Epo-induzierte PKC-abhängige Aktivierung von Ras (Marshall, 1995), oder aber die Ras induzierte PKC-Aktivierung über PLC $\epsilon$ , die in beiden Fällen zur einer Raf-unabhängigen Erk-Aktivierung führen könnten. PLC $\epsilon$  besitzt eine Ras-GEF-ähnliche Domäne und eine Ras-Bindungsdomäne, wodurch es Ras regulieren, aber auch durch Ras reguliert werden kann (Lopez et al., 2001; Song et al., 2001).

#### 4.8. Der SH2-enthaltende Inositol-5-Phosphatase (SHIP)-Komplex

In PEPs konnte ein 150 kDa großes, durch Epo tyrosinphosphoryliertes Protein als SHIP identifiziert werden, welches in einem Epo-induzierten Komplex mit Grb2 und Shc vorliegt. In diesem Komplex ist auch Shc tyrosinphosphoryliert und Grb2 agiert möglicherweise als Komplex-stabilisierendes Protein. Wie dieser Komplex in den PEPs genau stabilisiert wird, bleibt vorerst ungeklärt. Möglicherweise bindet Grb2 über die SH3-Domäne an eine prolinreiche Region im C-terminalen Teil von SHIP und über die SH2-Domäne an tyrosinphosphoryliertes Shc. Shc könnte über die phosphotyrosin-bindende (PTB)-Domäne an das NPxY-Motif von SHIP koppeln, aber auch eine Bindung über die SHIP-SH2-Domäne wäre vorstellbar (Rohrschneider et al., 2000). Einfache Erklärungen für die Funktion dieses heterotrimerischen Komplexes wären, dass SHIP als Kompetitor zu Sos wirkt oder der Komplex zur Rekrutierung von SHIP an die Zellmembran dient (Harmer und DeFranco, 1999). Dort könnte es als PI3K-Antagonist durch seine katalytische Aktivität das PI3K-Produkt PIP<sub>3</sub> dephosphorylieren und z.B. der Bindung der AKT-PH-Domäne an PIP<sub>3</sub> entgegenwirken (Aman et al., 1998). Daneben kann SHIP, wie von Huber et al. gezeigt (Huber et al., 1998), Einfluss auf die Regulierung des intrazellulären Kalziumspiegels haben. Der Verlust von SHIP führt zum verstärkten Kalziumeinstrom und zur Erhöhung der PIP<sub>3</sub>-Konzentration. So könnte SHIP auch PKC-Isoformen regulieren, indem, je nach zellulärer Kalziumkonzentration, Ca<sup>2+</sup>-abhängige oder Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PKC-Isoformen aktiviert werden. Im Gegensatz zur negativen Rolle von SHIP durch die Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub> steht die positive Regulierung der Akt-Ser473-Phosphorylierung. So wurde in Mastzellen (aus Knochenmark generiert) von SHIP<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt, dass das SHIP-Produkt PIP<sub>2</sub> entscheidend für die Ser473-Phosphorylierung und Aktivierung von Akt ist. Jedoch ist zur Zeit nicht bekannt, welche Kinase an PIP<sub>2</sub> binden und Akt phosphorylieren kann. Es ist allerdings fraglich, ob diese positive Regulation durch SHIP in der Erythropoese von Bedeutung ist, da in SHIP<sup>-/-</sup>-Mäusen eine reduzierte Anzahl an CFU-Es vorliegt (Helgason et al., 1998).

Die Tatsache, dass Epo-Behandlung von PEPs die SHIP-Phosphatase beeinflusst, eröffnet aber noch eine weitere interessante Möglichkeit. So wurde kürzlich gezeigt, dass



eine Reihe von Proteinphosphatasen nach der Rekrutierung zu einem aktiven Rezeptorkomplex durch eine transiente Oxidation vorübergehend inaktiviert wurden (Meng et al., 2002). In Kombination mit der Inaktivierung von SHIP könnte eine moderate Aktivierung der PI3K $\gamma$  zu einer starken Erhöhung der signalübertragenden Phosphatidylinositole führen.

#### **4.9. Jak2 und Src-Tyrosinkinasen**

Membranständige Rezeptoren ohne intrinsische katalytische Aktivität, wie z.B. der EpoR, benutzen oft zytoplasmatische Tyrosinkinasen, um Signale weiterzuleiten. Der EpoR bindet die Jak2-Kinase, welche im aktivierten Zustand zytoplasmatische EpoR-Tyrosine phosphoryliert. Es wurde gezeigt, dass nur eine geringe Anzahl von EpoR-Molekülen an der Zelloberfläche exprimiert wird (ca. 1000/PEP) und das Jak2 schon an die im endoplasmatischen Retikulum vorliegende, unreife Form des EpoR bindet (Huang et al., 2001), wo es eine korrekte Faltung und die anschließende Expression des EpoR an der Zelloberfläche unterstützt. Für diese Funktion wird keine Jak2-Kinaseaktivität benötigt. Somit sollte Jak2 als essentielle Untereinheit eines EpoR/Jak2-Komplexes angesehen werden. Es konnte gezeigt werden, dass in PEPs Jak2 nach Epo-Stimulation phosphoryliert war (Abbildung 9). Inwieweit diese Kinaseaktivität für die Epo-Signaltransduktion in PEPs von Bedeutung ist, bleibt leider ungeklärt, da Jak2 zwar in einer Maus-Zelllinie (BaF3EpoR), nicht aber in den humanen Primärzellen durch den häufig verwendeten spezifischen Jak2-Inhibitor AG490 blockiert wird. Wie schon unter 3.7. erwähnt, könnte es in humanen PEPs durch mangelndes Eindringen, rapiden Metabolismus oder Export von AG490 zur ungenügenden intrazellulären Anreicherung kommen. Um die Rolle von Jak2 genauer zu analysieren, könnten z.B. dominant-negative Jak2-Konstrukte in den PEPs exprimiert werden. Wenn es jedoch nicht möglich sein sollte, die Kinaseaktivität komplett herunterzuregulieren, dann könnte durch starke Signalamplifikation entlang der Signalkaskade bis zur Ebene der Erks eventuell keine vollständige Abschaltung von Erk erzielt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass andere Kinasen der Jak-Familie (Jak1, Jak3 und TYK2) die Blockierung von Jak2 kompensieren.

Zur Zeit wird zwar davon ausgegangen, dass im EpoR-Signalweg Jak2 die wichtigste Tyrosinkinase ist, jedoch ist bekannt, dass zumindest in Zelllinien neben Kinasen der Jak-Familie auch Tyrosinkinasen der Src-Familie, wie z.B. Src, Lyn oder Yes, beteiligt sein können (Reddy et al., 2000). So wurde in UT-7-Zellen gezeigt, dass Syk nach Epo-Stimulation mit dem EpoR assoziiert und aktiviert ist (Duprez et al., 1998), und dass Src den EpoR phosphorylieren kann (Kubota et al., 2001). Dagegen spielt in unreifen erythroiden Mauszellen (J2E-Zelllinie) Lyn für die Epo-abhängige erythroide Differenzierung eine Rolle (Tilbrook et al., 1997). Trotz dieser Beobachtungen haben Src<sup>-/-</sup>-Mäuse (Soriano et al., 1991), Lyn<sup>-/-</sup>-Mäuse (Hibbs et al., 1995) und Hck<sup>-/-</sup>-Mäuse eine normale Erythropoese und einen normalen Erythrozytenspiegel. Src<sup>-/-</sup>/Hck<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln dagegen eine Anämie und Leukozytopenie (Verminderung der Leukozytenzahl) (Varmus und Lowell, 1994). Diese Diskrepanz könnte damit erklärt werden, dass in frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen verschiedene Src-Kinasen zusammenarbeiten und funktionelle Defekte durch jeweilige andere Mitglieder der Familie kompensiert werden können.

Da Src-Kinasen in zahlreichen Signalkaskaden funktionell bedeutsam sind, sollte darauf geachtet werden, dass durch ihre Inhibierung multiple Signalkaskaden beeinflusst werden können. So zeigte in PEPs z.B. der Src-Inhibitor PP2 starke unspezifische Effekte, welche aber mit Hilfe der Kontrollsubstanz PP3 als solche identifiziert werden konnten. Für den Inhibitor Piceatannol existiert keine solche Kontrolle, so dass die in den PEPs gesehenen Effekte (Abbildung 20) vorsichtig interpretiert werden müssen. Da in diesem konkreten Fall neben der Erk-Aktivierung auch die STAT5-Signale inhibiert wurden, könnte die inhibierte Src-Kinase eventuell Jak2 beeinflussen. Den einzigen Beleg, dass es sich nicht um einen unspezifischen Effekt auf Kinasen handelte, lieferte die nicht durch Piceatannol inhibierte SCF-induzierte Erk-Aktivierung. Da bisher keine Epo-induzierte Src-Kinaseaktivierung in PEPs gezeigt werden konnte und auch kein anderer Src-Inhibitor ähnliche Resultate lieferte, muss diese Interpretation mit Vorbehalt betrachtet werden. Um handfeste Ergebnisse zu erhalten, könnten auch hier, neben dem Einsatz von Inhibitoren, dominant negative oder konstitutiv aktive Tyrosinkinasen überexprimiert, oder die Proteinexpression durch siRNA blockiert werden.

#### **4.10. Ausblick**

Die vorgelegte Untersuchung hat erneut gezeigt, wie wichtig es ist, Signalwege soweit wie möglich auch in Primärzellen zu analysieren. Die hier gewonnenen Ergebnisse mit Nabelschnurblutzellen lassen sich nicht ohne weiteres auf ähnliche erythroide Vorläuferzellen in der fötalen Leber bzw. aus dem adulten Knochenmark übertragen, so dass weitere Studien auch mit diesen Zellen erforderlich sind.

Darüber hinaus verwenden unterschiedliche Arbeitsgruppen abweichende Protokolle zur Generierung der Erythroblasten aus CD34<sup>+</sup>-Nabelschnurblutzellen, welche ebenfalls verglichen werden sollten. Abschließend bleibt zu sagen, dass trotz der großen physiologischen Bedeutung von Erythropoetin und einer Vielzahl von wissenschaftlichen Untersuchungen die molekularen Grundlagen der induzierten Signale erst in groben Umrissen bekannt sind.

## **5. Material und Methoden**

### **5.1. Arbeitsmaterialien**

#### **5.1.1. Geräte**

Bakterien-Brutschrank	Heraeus B 6200
Bakterien-Schüttler	New Brunswick Scientific innova 4300 und 4400
Dünnschichtchromatographieplatte	TLC LK6D (4865-821), Whatman
Einfrierbehälter für Zellen	„Mister Frosty“, Nalgene
Elektrophoresekammer, groß	Bio-Rad Protean II xi
Elektrophoresekammer, klein	Bio-Rad Mini-Protean II
Elektroporationsgerät	Bio-Rad Gene-Pulser
Entwicklungsmaschine	Xograph SRX201 und Vari-Speed X150
„fluorescence-activated cell sorter“	
FACS	Coulter EPICS XL, Coultronics
Feinwaage	Scaltec SBC 21
Heizblock	Liebisch, Typ 2099-DA
Magnetrührer	Heidolph MR1000
Megazentrifugen	Avanti J-25 Sorvall Legend RT und Beckman J-6B
Minizentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417R Heraeus Biofuge 15
Nutator (Taumler)	Clay Adams Brand Model 421106
Phosphoimager	Storm 840, Molecular Dynamics mit Software ImageQuant 5.2 und Bildplatte BAS-MP 2040P, Fuji
Schüttler	Eppendorf Thermomixer comfort
„Semidry“-Blotsystem	Bio-Rad Trans-Blot S
Sonifiziergerät	Bandelin UW-70 mit Pulsgeber Sonopuls GM 70 und Sonotrode MS 72/D
Spannungsquellen	Bio-Rad Power Pac 200
Spektrophotometer	Eppendorf Bio-Photometer
Sterilbank	Microflow ABS1200F
Ultrazentrifuge	Optima TLX, Beckman
Vakuumsrotationsverdampfer	SpeedVac Concentrator SVC100H mit Pumpe Edwards5
Vortex	Scientific Industries Genie-2
Wasserbad	GFL 1083
Zell-Zählkammer	Neubauer
Zellkultur-Brutschrank	Heraeus BB 6220
Zellkultur-Mikroskop	Nikon Eclipse TS100

### 5.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Der Reinheitsgrad aller verwendeten Chemikalien war „pro analysi“ oder höher.

Allgemeine Laborchemikalien wurden von den Firmen Roth, Sigma, Gibco BRL, Fluka und Serva bezogen.

Acrylamid (30%) / Bisacrylamid (0,8%)	Roth (3029.1)
Ampicillin	Roth (K0292)
Antipain	Sigma (A-6191)
Aprotinin	Roth (A 162.3)
complete™ Proteaseinhibitor Tabletten (PIT)	Roche (10019600)
Coomassie-Brilliant-Blau	Sigma (B-0630)
Deoxycholat (DOC)	Sigma (D-6750)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (6908.2)
„enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Lösung	Amersham (RPN2106V2)
Fettfreie Trockenmilch	Roth (T 145.2)
Glutathion	Sigma (G-4251)
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham (27-4574-01)
HEPES	Roth (9105.3)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (2316.4)
Leupeptin	Serva (51867)
Natriumorthovanadat	Sigma (S-6508)
Nonidet P-40 / Igepal CA-630	Sigma (I-3021)
Ovalbumin	Sigma (A-5378)
Pepstatin A	Boehringer (1524488)
Phosphatidylinositol (PI)	Sigma (P2517)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (P-7626)
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran	Amersham (RPN303F)
Protein A-Sepharose	Pharmacia (17-0780-01)
Protein G-Sepharose	Pharmacia (17-0885-01)
Proteinmarker HMW (Rainbow)	Amersham (RPN756V)
Quiagen Plasmid Maxi Kit	Quiagen (12163)
Rinderserumalbumin	Serva (11935)
Röntgenfilme, Hyperfilm™	Amersham (RPN1675K)
Radiochemikalie $\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP	Amersham (AA0068)
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma (T-8133)
Triton X-100	Sigma (T-9284)
Tween 20	Roth (9127.2)

### 5.1.3. Zellkulturmaterial

„bovine serum albumin“ (BSA) (detoxifiziert)	Stemcell Technology (09300)
Anti-CD34 <sup>+</sup> -Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Antikörper	Immunotech (IM1870)
CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec (467-01)
Anti-CD36	Immunotech (0765)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (D-2650)
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Cancer Research UK
Erythropoetin (Epo)	Janssen-CILAG (00JS19T)
Ficoll <sup>®</sup> , Histopaque-1077	Sigma (1077-1)
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN (3102-P991807)
L-Glutamin	Gibco BRL (25030-024)
Interleukin-3	PeptoTech EC Ltd. (200-03)
Interleukin-6	PeptoTech EC Ltd. (200-06)
LS Column	Miltenyi Biotec
„magnetic cell separation“ (MACS) MultiStand	Miltenyi Biotec
MidiMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec
MiniMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec
MS Column	Miltenyi Biotec
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL (15140-114)
Preseparationsfilter	Miltenyi Biotec (130-041-407)
Anti-Rat Microbeads	Miltenyi Biotec (471-01)
„Roswell Parc Memorial Institute“ (RPMI) 1640 Medium	Cancer Research
„stem cell factor“ (SCF)	PeptoTech EC Ltd. (300-07)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, syn. TPA)	Calbiochem (524400)
Zell-Expansionsmedium RM-B00	RTM/MABIO-International (00201)

### 5.1.4. Inhibitoren

Inhibitor	Firma (Katalognummer)	Konz. + Inkubationszeit
Caffeine (Koffein)	Sigma (C-8960)	0,1-10 mM für 1 h
Calphostin C	Calbiochem (208725)	0,01-10 µM für 1 h
LY294002	Calbiochem (440202)	30-100 µM für 1 h
Piceatannol	Alexis (ALX-270-202)	1-100 µM für 1-4 h
Ro-31-8220	Calbiochem (557520)	0,1-100 µM für 1 h
STI571	Medikament von Novartis (Glivec, 100mg Kapseln)	3-30 µM für 1 h
UO126	Cell Signaling Technology (9903)	1-10 µM für 1 h
Wortmannin	Sigma (W-1628)	25-100 nM für 30 min
ZM336372	Calbiochem (692000)	0,1-10 µM für 1-4 h

AFC	Calbiochem (110110)	1-300 $\mu$ M für 1-12 h
AG490	Calbiochem (658401)	3-300 $\mu$ M für 1-4 h
GW5074	Sigma (G 6416)	0,1-30 $\mu$ M für 1 h
FTI-276	Calbiochem (344550)	0,01-1000 nM für 1-12 h
GF109203X	Calbiochem (203290)	0,3-300 nM für 1-4 h
Gö6983	Calbiochem (365251)	0.03-20 $\mu$ M für 1-4 h
Jak3-InhibitorIII	Calbiochem (420106)	1-300 $\mu$ M für 1-4 h
ManumycinA	Sigma (M-6418)	0,3-100 $\mu$ M für 1-12 h
Pertussistoxin	Alexis (ALX-630-003)	0,01-10 mM für 1-4 h
PP2	Calbiochem (529573)	0,01-100 $\mu$ M für 1-4 h
Raf1-Kinase InhibitorI	Calbiochem (553008)	0,01-1 $\mu$ M für 1-4 h
U-73122	Calbiochem (662035)	0,1-100 $\mu$ M für 1-4 h

### 5.1.5. Antikörper

Akt (pcl)	Cell Signaling Technology (9272)
EpoR (pcl)	Geschenk von Patrick Mayeux, Paris
Erk2 (pcl)	Santa Cruz (sc-154)
Grb2 (mcl)	Transduction Laboratories (G16720)
Grb2 (pcl)	Santa Cruz (sc-255)
Jak2 (pcl)	Upstate (06-255)
Lyn (mcl)	Transduction Laboratories (L05620)
MEK1/2 (pcl)	Cell Signaling Technology (9122)
PI3K-p101 (pcl)	Upstate (22156)
PI3K-p110 $\alpha$ (pcl)	Upstate (06-567)
PI3K-p110 $\beta$ (pcl)	Upstate (06-568)
PI3K-p110 $\gamma$ (mcl)	Alexis (804-230-L001)
PI3K-p110 $\gamma$ (pcl)	Santa Cruz (sc-7177)
PI3K-p110 $\delta$ (pcl)	Santa Cruz (sc-7176)
PI3K-p85 (mcl)	Transduction Laboratories (P13020)
PKC $\alpha$ (mcl)	Transduction Laboratories (P16520)
PKC $\beta$ (mcl)	Transduction Laboratories (P17720)
PKC $\gamma$ (mcl)	Transduction Laboratories (P82820)
PKC $\delta$ (mcl)	Transduction Laboratories (P36520)
PKC $\epsilon$ (mcl)	Transduction Laboratories (P14820)
PKC $\eta$ (mcl)	Transduction Laboratories (P64720)
PKC $\theta$ (mcl)	Transduction Laboratories (P15120)
PKC $\lambda$ (mcl)	Transduction Laboratories (P22520)
PKC $\iota$ (mcl)	Transduction Laboratories (P20520)
PKC $\mu$ (pcl)	Santa Cruz (sc-935), Cell Signaling Technology(2052)

PKC $\zeta$ (pcl)	Sigma (P0713)
PLC $\gamma$ 1 (mcl)	Santa Cruz (sc-7290)
PLC $\gamma$ 2 (pcl)	Santa Cruz (sc-407)
PRK1 (mcl)	Transduction Laboratories (610687)
PRK2 (mcl)	Transduction Laboratories (610795)
PYK2 (mcl)	Transduction Laboratories (610549)
Rac1 (mcl)	Transduction Laboratories (R56220)
A-Raf (pcl)	Santa Cruz (sc-408)
B-Raf (pcl)	Upstate (07-453)
c-Raf1 (mcl)	Transduction Laboratories (R19120)
RalA (mcl)	Transduction Laboratories (R23520)
Rap1 (mcl)	Transduction Laboratories (R22020)
Ras (mcl)	Transduction Laboratories (R02120)
Shc (mcl)	Santa Cruz (sc-967)
Shc (pcl)	Transduction Laboratories (610081)
SHIP (pcl)	Santa Cruz (sc-6244)
Sos (mcl)	Transduction Laboratories (S15520)
Syk (pcl)	Santa Cruz (sc-929)
P-Akt (Ser473) (pcl)	Cell Signaling Technology (9271)
P-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) (pcl)	Cell Signaling Technology (9101)
P-GSK3 $\alpha/\beta$ (Ser21/9) (pcl)	Cell Signaling Technology (9331)
P-Jak2 (Tyr1007/1008) (pcl)	Biosource International (44-426)
P-MEK1/2 (Ser217/221) (pcl)	Cell Signaling Technology (9121)
P-PDK1 (Ser241) (pcl)	Cell Signaling Technology (3061)
P-PKC (sampler kit) (pcl)	Cell Signaling Technology (9921)
P-PRK1/2 (Thr778/816) (pcl)	Cell Signaling Technology (2611)
P-Pyk2 (Tyr402/579/580/881) (pcl)	Biosource International (44-638)
P-Raf (Ser259) (pcl)	Cell Signaling Technology (9421)
P-c-Raf1 (Tyr340/341) (pcl)	Biosource International (44-506)
P-c-Raf1 (Ser338) (mcl Ratte)	Upstate (05-534)
P-Shc (Tyr317) (pcl)	Upstate (07-206)
P-Src Family (Tyr416) (pcl)	Cell Signaling Technology (2101)
P-STAT5a/b (Tyr694/699) (mcl)	Upstate (05-495)
P-Tyrosin 4G10 (mcl)	laboreigene Herstellung
anti-Kaninchen (HRP-gekoppelt)	Jackson Immuno-Research (711-036-152)
anti-Maus (HRP-gekoppelt)	Jackson Immuno-Research (715-036-151)
anti-Ratte (HRP-gekoppelt)	Jackson Immuno-Research (212-036-105)
anti-Ziege (HRP-gekoppelt)	Jackson Immuno-Research (111-165-003)



### 5.1.6. Plasmide und Expressionsvektoren

pGEX-c-Raf-1-RBD	S. Taylor, New York, (Taylor und Shalloway, 1996)
pGEX-RalGDS-RBD	B. Franke & J.L. Bos, (Franke et al., 1997)
pGEX-PAK-CRIB	J. Collard, Amsterdam, (Sander et al., 1998)

GST-Erk1 K63M	Heidi Greulich, Boston
GST-MEK1 (human, inaktiv)	Upstate (14-420)

Bakterienstämme: *E.coli* DH5 $\alpha$ , BL21 (DE3), TOPP 1-3 (Stratagene)

### 5.1.7. Zellen

CD34<sup>+</sup> Zellen, isoliert aus humanem Nabelschnurblut von anonymisierten Spendern aus Paris.

### 5.1.8. Lösungen und Puffer

<b>Bakterienlysepuffer (TPE):</b>	10%	PBS
	100 mM	EDTA
	1%	Triton X-100
	0,2 mM	PMSF
	5x	complete <sup>TM</sup> PIT
	10 $\mu$ g/ml	Aprotinin
	5 $\mu$ g/ml	Antipain
	0,5 $\mu$ g/ml	Leupeptin
	0,7 $\mu$ g/ml	Pepstatin A
<b>4x Bradford-Reagenz</b>	250 mg	Coomassie-Brilliant-Blau G
	120 ml	Ethanol
	250 ml	o-Phosphorsäure
	500 ml	H <sub>2</sub> O bidest.
<b>Dialysepuffer:</b>	5 mM	TrisHCl pH 7,5

<b>Elutionspuffer:</b>	100 mM (mit 1 M TrisHCl pH 8,8 auf pH 7,0 einstellen) 0,1%	Glutathion Tween 20
<b>GTB-Waschpuffer:</b>	50 mM 100 mM 0,1%	TrisHCl pH 7.5 EDTA Tween 20
<b>Hypotonischer Lysepuffer (HLB):</b>	10 mM 10 mM 1 mM 1 mM 2 mM 1 mM 1x	TrisHCl pH 7.5 KCl EDTA EGTA MgCl <sub>2</sub> DTT MIX (siehe MIX)
<b>Immunpräzitationspuffer (IP Puffer):</b>	20 mM 100 mM 0,1% 5% (v/v) 10 mM 10 mM 1 mM 1 mM 1 mM 10 µg/ml 1x	TrisHCl pH 7,5 NaCl Tween 20 Glycerin EDTA EGTA NaF Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> PMSF Aprotinin MIX (siehe MIX)
<b>Magnesium-enthaltender Lysepuffer (MLB):</b>	25 mM 150 mM 10 mM 1 mM 10% 1% 0,25% 1 mM 1 µg/ml 0,5 µg/ml	Hepes pH 7,5 Natriumchlorid MgCl <sub>2</sub> EDTA Glycerin Nonidet P-40 Deoxycholat Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> Aprotinin Leupeptin

<b>MIX (25x) Protease-u. Phosphataseinhibitoren:</b>	125 µg/ml	Antipain
	12,5 µg/ml	Leupeptin
	17,5 µg/ml	Pepstatin A
	25x	complete™ PIT
	75 mM	Dithiotreitol (DTT)
<b>NP-40-Lysispuffer:</b>	50 mM	HEPES pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1%	Nonidet P-40
	2 mM	EDTA
	10%	Glyzerol
	1 mM	PMSF
	50 mM	NaF
	1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	10 µg/ml	Aprotinin
1x	MIX (siehe MIX)	
<b>Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):</b>	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	1,4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Polyacrylamidgele:</b>		
Trenngel, für 50 ml:	für ein 12%-iges Gel: 20 ml	Acrylamid (30%)/ Bisacrylamid (0,8%)
	18,8 ml	1 M TrisHCl pH 8,8
	0,5 ml	SDS (10%)
	0,5 ml	APS (10%)
	50 µl	TEMED
Sammelgel (5%), für 10 ml:	1,67 ml	Acrylamid (30%)/ Bisacrylamid (0,8%)
	1,27 ml	1 M TrisHCl, pH 6,8
	0,1 ml	SDS (10%)
	0,9 ml	Glycerin (50%)
	0,1 ml	APS (10%)
	10 µl	TEMED

<b>Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA) Puffer:</b>	20 mM	TrisHCl pH 7,5
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2,5 mM	EGTA
	1%	Triton X-100
	0,5%	Deoxycholat
	0,1%	SDS
	1 mM	PMSF
	500 mM	NaF
	1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	1 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
	10 µg/ml	Aprotinin
	1x	MIX (siehe MIX)
<b>2-4 fach SDS-PAGE-Ladepuffer:</b>	70 mM	TrisHCl pH 6,8
	5%	β-Mercaptoethanol
	40%	Glyzin
	3%	SDS
	0,05%	Bromphenol-Blau
<b>„Semidry“-Blotpuffer (SDBB):</b>	5,8 g	Tris Base
	2,9 g	Glyzin
	0,37 g	SDS
	(auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O bidest. auffüllen)	
<b>Tris-gepufferte Salzlösung (TBS):</b>	20 mM	TrisHCl pH 7,5
	100 mM	NaCl

## **5.2. Arbeitsmethoden**

### **5.2.1. Aufreinigung und Amplifikation humaner primärer hämatopoetischer Stammzellen**

#### **5.2.1.1. Ficoll-Gradient**

Ca. 80 ml Nabelschnurblut wurden in Blutkonservenbeuteln mit 50 E/ml Heparin als Antikoagulant geliefert. Das Blut wurde mit Hilfe einer Spritze unter sterilen Bedingungen in einen Plastikbecher überführt und 1:1 mit PBS/4% FCS-Lösung verdünnt.

12 ml Ficoll<sup>®</sup>-Trennlösung (Histopaque-1077) mit einer Dichte von 1.077 wurden in 50 ml Falconröhrchen vorgelegt und mit Hilfe einer 10 ml Plastikpipette mit 25 ml Blut vorsichtig und langsam überschichtet, so dass sich beide Schichten nicht vermischten. Es ist wichtig, dass das Ficoll Raumtemperatur hat. Die Röhrchen wurden 30 min mit 600 g bei 20°C bei abgestellter Bremse zentrifugiert. Die mononukleären Zellen bilden eine weiße Grenzschicht zwischen Plasma und Ficoll<sup>®</sup>-Trennlösung, die Erythrozyten und Granulozyten befinden sich im Sediment. Wenn die Grenzschicht nicht klar genug war, wurde ein zweites mal unter den gleichen Bedingungen, aber für 15 min zentrifugiert. Die mononukleären Zellen der Grenzschicht wurden in ein frisches 50 ml Falcon-Röhrchen mit Hilfe einer 5 ml Plastikpipette überführt. Diese Suspension wurde 5:1 mit PBS/4% FCS verdünnt und für 12 min mit 850 g bei 20°C und Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde noch einmal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und die beiden Zellpellets in 5 ml PBS/4% FCS-Lösung suspendiert. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

#### **5.2.1.2. Magnetische Separation von CD34<sup>+</sup>-Zellen**

Die CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden in Anlehnung an das Protokoll zum CD34<sup>+</sup>-Isolationskit (MACS) aufgereinigt. Dafür wurde nach dem Ficoll-Gradienten und den Waschungen die Zellsuspension für 12 min mit 600 g bei 20°C zentrifugiert und das Pellet in 300 µl PBS/4% FCS-Lösung pro  $1 \times 10^8$  Zellen (bei mehr Zellen in maximal 900 µl) suspendiert. Nun wurden 75 µl der Lösung A1 (FcR-Blocker) und 75 µl der Lösung A2 (Hapten-

Antikörper) pro  $1 \times 10^8$  Zellen (aber maximal 225  $\mu$ l von jeder Lösung bei mehr Zellen) dazugegeben, vorsichtig gemischt und bei 4°C für 15-60 min inkubiert. Danach wurde mit der 20-fachen Menge an PBS/4% FCS verdünnt, für 10 min mit 600 g bei 20°C zentrifugiert und in der gleichen Menge PBS/4% FCS wie zuvor resuspendiert. 75  $\mu$ l Lösung B (anti-Hapten-Mikrobeads) (maximal 225  $\mu$ l) wurden dazugegeben, vorsichtig gemischt und bei 4°C für 15-60 min inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und in 5 ml PBS/4% FCS resuspendiert.

Eine Midi-Säule mit aufgesetztem Präseparationsfilter wurde in der Magnethalterung fixiert und mit 5 ml PBS/4% FCS equilibriert. Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und dreimal mit 5 ml PBS/0,8% detoxifiziertem BSA gewaschen. Danach wurden 5 ml PBS/0,8% BSA auf die Säule gegeben, diese aus der Magnethalterung genommen und mit Hilfe des Säulenstempels die 5 ml durch die Säule gepresst, wobei zwischendurch der Stempel kurz zurückgezogen wurde, um alle Zellen zu lockern. Die Zellen wurden gezählt. Die Ausbeute sollte ungefähr 0,5% der Ausgangszellzahl sein. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in serumfreiem Expansionsmedium RM-B00 mit 100 E/ml Pen/Strep und 2 mM Glutamin, 10 ng/ml Interleukin-3 (IL-3), 10 ng/ml IL-6 und 25 ng/ml Stammzellfaktor (SCF) aufgenommen und für sieben Tage bei 37°C kultiviert ohne eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml zu überschreiten.

### **5.2.1.3. Magnetische Separation erythroider Vorläuferzellen**

Nach 7 Tagen Kultivierung wurden die Zellen gezählt, pelletiert (10 min mit 600 g bei 20°C) und in 400  $\mu$ l Medium resuspendiert. Anschließend wurden 400  $\mu$ l monoklonaler anti-CD36-Antikörper (100  $\mu$ g/ml) dazugegeben und für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit der 20-fachen Menge PBS/4% FCS verdünnt, pelletiert (10 min mit 600 g bei 20°C) und in 80  $\mu$ l PBS/4% FCS pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. 20  $\mu$ l anti-Maus-IgG1-Mikrobeads pro  $10^7$  Zellen wurden dazugegeben, für 15-60 min bei 4°C inkubiert und wiederum mit PBS/4% FCS gewaschen. Die weitere Isolierung und Kultivierung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie in 5.2.1.2. beschrieben. Jedoch wurde dem Medium 2 E/ml Epo zugegeben und die Kultivierung nach vier Tagen beendet.

#### **5.2.1.4. Einfrieren und Auftauen von CD34<sup>+</sup>-Zellen**

Das Zellpellet wurde nach der letzten Zentrifugation (siehe 5.2.1.2.) auf Eis gekühlt und in einer Konzentration von  $2-4 \times 10^6$  Zellen/ml in FCS resuspendiert. Eine FCS/DMSO-Lösung (4:1) wurde langsam bei leichtem Schütteln Tropfen für Tropfen dazugegeben bis eine Konzentration von 10% DMSO erreicht wurde. 1 ml Zellsuspension pro Gefrierrohrchen wurde mit Hilfe des auf 4°C vorgekühlten Gefriersystems „Mister Frosty“ (Nalgene) bei -70°C eingefroren. Nach einem Tag wurden die Gefrierrohrchen in den Flüssigstickstofftank überführt.

Zum Auftauen wurde ein Gefrierrohrchen mit Zellen im 37°C warmen Wasserbad vorsichtig bewegt bis alles Eis geschmolzen war und dann sofort auf Eis gelegt, um eine Aufwärmung zu vermeiden. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falconrohrchen überführt und 10 ml kaltes Expansionsmedium Tropfen für Tropfen unter vorsichtigem Schütteln des Falconrohrchens auf die Zellsuspension gegeben. Nach Zentrifugation (10 min mit 600 g bei 4°C) wurde das Zellpellet in Expansionsmedium resuspendiert und, wie unter 5.2.1.2. beschrieben, kultiviert.

#### **5.2.2. Immunphänotypisierungsassay**

Bei der „fluorescence-activated cell sorter“ (FACS)-Analyse werden Antigene auf der Oberfläche (oder innerhalb der Zellen) mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern nachgewiesen. Die Zellen bei der FACS-Analyse liegen in einer Suspension vor und werden durch Photomultiplier analysiert.

In dem FACS-Gerät existiert ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit. In diese Trägerflüssigkeit wird die Probe eingebracht. Durch die Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden die Zellen vereinzelt und in einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt. Das Argon-Laserlicht führt zu einer Exitation der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Die emittierten Fluoreszenzen können durch verschiedene Photozellen detektiert werden. Pro Zelle können beim verwendeten FACS-Modell drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und vier weitere Parameter gleichzeitig gemessen werden. Zwei dieser zusätzlichen Parameter (Vorwärtsstreuung („forward

scatter“; FSC) und Seitwärtsstreuung („sideward scatter“; SSC)) erlauben eine Unterscheidung der Zellen auf Grund von morphologischen Zellparametern (Zellgröße, Oberflächenbeschaffenheit).

$1 \times 10^5$  Zellen wurden in PBS/0,8% BSA gewaschen, die Zellpellets in 100  $\mu$ l PBS/0,8% BSA resuspendiert und mit 5  $\mu$ l Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppelten anti-CD34-Antikörper für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut in PBS/0,8% BSA gewaschen, um den überschüssigen Antikörper zu entfernen und in 250  $\mu$ l PBS/0,8% BSA für die FACS-Analyse resuspendiert.

### **5.2.3. Zellstimulation, Lyse und Proteinquantifikation**

Vier Tage nach der CD36<sup>+</sup>-Separation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 6 h gehungert, um die Zytokin-induzierten Signale in den Zellen herunterzuregulieren. Dafür wurden den Zellen IL-3, IL-6, SCF und Epo entzogen. Die Zellen wurden, wie im Ergebnisteil beschrieben, teilweise mit spezifischen Inhibitoren inkubiert und mit Epo, SCF oder TPA stimuliert. Die Stimulation wurde mit eiskaltem PBS (mindestens 3-faches Volumen) gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (10 min mit 600 g bei 4°C). Die Pellets wurden entweder bis zur Lyse bei -70°C eingefroren oder sofort mit einem für das Experiment bestimmten Lysepuffer für 20-30 min bei 4°C auf dem Nutator lysiert und anschließend in einer Mikro-Zentrifuge für 20 min bei 20000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue vorgekühlte Eppendorfgläser überführt. Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) über eine photometrische Messung bei 595 nm, bezogen auf eine Standard-Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) im Konzentrationsbereich von 2-12  $\mu$ g/ml, durchgeführt. Nicht für das Experiment verwendetes Lysat wurde mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.



#### 5.2.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Vertikale Polyacrylamidgele wurden zwischen zwei Glasplatten polymerisiert, die einen Zwischenraum von 1,5 mm besaßen. Die Gele bestanden aus einem Trenngel für die Auftrennung der Proteine und einem niedrigprozentigem Sammelgel, das auf das Trenngel gegossen wurde und dafür sorgt, dass alle Proteine vor Eintritt in das Trenngel unabhängig von ihrer Größe auf derselben Höhe laufen. Der Laufpuffer enthielt Glyzin, das bei niedrigem pH-Wert protoniert und zwitterionisch, bei hohem pH-Wert anionisch vorliegt (isoelektrischer Punkt ca. pH6). Im Sammelgel mit seinem niedrigen pH wandern deshalb die Chloridionen (Leitonen) schneller als das Glyzin (Folgeionen). Durch diese Ladungstrennung kommt es lokal zu erhöhter Spannung. Die Proteine werden beschleunigt und kommen so, unabhängig von ihrer Größe, fast gleichzeitig am Trenngel an. Durch die pH-Änderung am Trenngel wird das Glyzin zum Anion und kann somit genauso schnell wie das Chloridion im elektrischen Feld wandern. Die Proteine werden nun nach ihrer Größe aufgetrennt.

Das Prinzip des Trenngels besteht darin, dass die Proteine durch negativ geladenes Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert werden, das sich an die hydrophoben Bereiche im Protein anlagern kann. Zusätzlich werden durch Mercaptoethanol im Probenpuffer und durch Aufkochen unmittelbar vor dem Auftragen Disulfidbrücken im Protein reduziert. Durch die Denaturierung der Proteine werden diese in erster Linie entsprechend ihres Molekulargewichtes bei der Wanderung durch die Gelmatrix aufgetrennt. Für die ungefähre Bestimmung der Größen der Proteine wurde auf jedem Gel gefärbte Molekulargewichtsstandards verwendet (Rainbow Marker).

Die Gele wurden anschließend zur Detektion der Proteine entweder einer Autoradiographie unterzogen, geblottet (siehe 5.2.5.) oder gefärbt. Die Färbung der Gele erfolgte in Coomassie-Blau-Lösung für mindestens 2 h auf einem Rundschüttler. Danach wurden sie in Entfärbelösung auf dem Schüttler entfärbt, bis der gewünschte Kontrast der Proteinbanden gegenüber dem entfärbenden Hintergrund erreicht wurde.

### **5.2.5. Elektrotransfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Membran**

Das Polyacrylamidgel wurde aus der Elektrophoresekammer entfernt und die obere Glasplatte vorsichtig abgehoben. Das Sammelgel und überflüssige Gelteile wurden abgetrennt. Der Transfer erfolgte mit dem „Semidry“-Blotsystem (Bio-Rad). Dazu wurden zwei Stapel Filterpapier mit je sechs Lagen, sowie ein Stück Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Membran wurde mit Methanol benetzt und anschließend, ebenso wie das Gel und das Filterpapier, in „Semidry“-Blotpuffer (SDBB) äquilibriert. Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine wurde der Blot in folgender Reihenfolge luftblasenfrei aufgebaut: 6 Lagen Filterpapier auf die Anode, PVDF-Membran, Gel und 6 Lagen Filterpapier (Kathodenseite). Die denaturierten, durch SDS negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld zum Pluspol. Der Transfer in der Kammer erfolgte also vom Gel auf die darunterliegende Membran. Transferiert wurde für 15 min bei 15 V und anschließend 1 h bei 20 V, bei einer Stromstärke von nicht mehr als 3 mA/cm<sup>2</sup>.

### **5.2.6. Western-Blot (Immunblot)**

Zum Nachweis bestimmter Proteine wurde die Membran mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Nach dem Blotvorgang wurde die Membran zunächst in einem Blockpuffer mit Milchproteinen (5% fettfreies Milchpulver in TBS mit 0,1% Tween 20 (TBS-T)) inkubiert, um die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran vor Antikörperzugabe zu sättigen. Für die Detektion mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern wurde TBS-T mit 1% BSA und 1% Ovalbumin als Blockpuffer verwendet, da Milchpulver vor allem Casein-Phosphoprotein in großer Menge enthält. Die Membran wurde dann für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen Antikörper in der gewünschten Konzentration in Blockpuffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T wurde mit einem sekundären Antikörper (1:5000 verdünnt in TBS-T) für 1 h inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper erkennt und bindet an die Fc-Region von

Antikörpern einer bestimmten Spezies und ist mit der Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Das Antikörper-Nachweissystem („Enhanced Chemiluminescence“; ECL) basiert auf einer durch die Peroxidase katalysierten Oxidation von Luminol, das in seinem angeregten Zustand Lichtenergie freisetzt. Die Membran wurde dazu für 1 min in einem 1:1-Gemisch der ECL-Lösungen 1 und 2 inkubiert und zwischen Filterpapier getrocknet. Durch Exposition und Entwicklung eines Films können so markierte Proteine detektiert werden.

### **5.2.7. Immunpräzipitation**

Im Eppendorfröhrchen wurden in 500 µl Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer) zu 500 µg Zelllysat gegeben und mit dem spezifischen Antikörper für 1-2 h oder auch über Nacht auf dem Nutator bei 4°C inkubiert. Dann wurden 20 µl Protein-G-Sepharose (1:3 in PBS) für monoklonale und Protein-A-Sepharose (1:3 in PBS) für polyklonale Antikörper zugegeben und für weitere 1-2 h auf dem Nutator (Taumler) bei 4°C inkubiert. Danach wurde dreimal mit IP-Puffer gewaschen und anschließend 20 µl SDS-PAGE-Ladepuffer zugegeben und schließlich die immunpräzipitierten Proteine in SDS-PAGE-Ladepuffer aufgenommen, für 10 min aufgekocht und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

### **5.2.8. PI3-Kinase-Assay**

500 µg NP-40-Zelllysat wurden mit 4 µg monoklonalem anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 oder mit 4 µg polyklonalen PI3K-Antikörpern in 500 µl NP-40-Lysepuffer für 2 h inkubiert. Dann wurden G- bzw. A-Sepharosebeads dazugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden dreimal mit NP-40-Lysepuffer, zweimal mit 50 mM Tris pH 7,5; 500 mM Lithiumchlorid, einmal mit 20 mM Tris pH 7,5; 100 mM Natriumchlorid; 1 mM EDTA und einmal mit 2 mM HEPES pH 7,5 gewaschen. 10 µg lyophilisiertes Phosphatidylinositol (PI) wurde mit 10 µl Kinasepuffer (20 mM Tris pH 7,6; 100 mM Natriumchlorid; 1 mM EGTA) so lange gemischt bis eine milchige Suspension

entstand und anschließend sechsmal 5 s mit 30%-iger Energie mit einer MS72 Sonotrode sonifiziert. Zwischen den einzelnen Sonifikationen wurde die Probe für 10 s auf Eis gekühlt. Das sonifizierte PI wurde dann mit 30 µl Kinasepuffer gemischt und zu den Immunpräzipitaten gegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 10 µl Kinasepuffer mit 10 µCi  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP (3000 Ci/mMol) und 2 mM Magnesiumchlorid dazugegeben und bei 30°C für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 200 µl 1 N Salzsäure gestoppt. Nach Extraktion der Probe mit 200 µl Methanol/Chloroform (1:1) wurden 50 µl der organischen Phase auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (LK6D) punktförmig aufgetragen und mit Laufpuffer (Methanol:Chloroform:H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=20:23:4:1) in einer Glaskammer für 90 min laufen gelassen. Danach wurde die Platte aus der Kammer genommen, für 1 h getrocknet, ca. 30-60 min exponiert und mit dem Storm 860 Phosphoimager und der Software ImageQuant 5.2 gemessen und analysiert.

### 5.2.9. Zellfraktionierung

Alle Schritte erfolgten gekühlt. Die zu analysierenden Zellen (ca.  $10^7$ ) wurden in 500 µl hypotonischen Lysepuffer (HLB) für 20 min aufgenommen. Dann wurde die Zellsuspension in einen Dounce-Homogenisator überführt und mit dem engen T-Pistell durch 30-maliges Auf- und Abbewegen zerkleinert. Danach wurde das homogenisierte Lysat mit 1000 g für 30 min zentrifugiert. Das Zellpellet (P1) enthält Zellkerne mit Teilen der Zellmembran und Zytoskelett. Der Überstand (S1) wurde mit 10000 g für 30 min zentrifugiert. Relativ große Partikel, wie Mitochondrien, befinden sich im Zellpellet (P10). Die S10 wurde mit 100000 g für 1 h ultrazentrifugiert. In der S100 befinden sich gelöste Proteine und in der P100 kleine Membranvesikel und Poly-Ribosomen. Die P1, P10 und P100 wurden nun mit RIPA-Lysepuffer für 30 min auf dem Nutator lysiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt. 10% jeder Fraktion (P1, P10, P100 und S100) wurden zur weiteren Analyse verwendet.

### 5.2.10. Raf-MEK-gekoppelter Kinaseassay

Der gekoppelte Kinaseassay wurde in Anlehnung an das von Dhillon (Dhillon et al., 2002) beschriebene Protokoll durchgeführt. 500 µg NP-40-Zelllysate wurden dazu mit 4 µg monoklonalem anti-c-Raf1-Antikörper, polyklonalem anti-A-Raf-Antikörper oder polyklonalem anti-B-Raf-Antikörper in 500 µl Puffer A (20 mM TrisHCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% Glycerin) für 1 h bei 4°C auf dem Nutator inkubiert. Dann wurden 20 µl Protein-A/B-Sepharose dazugegeben und für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Immunpräzipitate dreimal mit Puffer A und zweimal mit Puffer B (50 mM TrisHCl pH 7,5, 75 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen. 0,2 µg aktivierbares GST-MEK1 wurden zusammen mit 5 µl Puffer C (50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP) und 10 µl Puffer B zu den gewaschenen Immunpräzipitaten gegeben, gemischt und für 20 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde unterbrochen, indem die Proben auf Eis gelegt und mit 100 µl Puffer D (Puffer B plus 1 mM DTT und 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) versetzt wurden. Anschließend wurden 25 µl Reaktionsmix mit 20 µg kinaseinaktivem GST-Erk1K63M, 2 µl Puffer E (Puffer B mit 37,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1,25 mM ATP) und 5 µCi <sup>32</sup>P-γ-ATP für 15 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit SDS-PAGE-Ladepuffer gestoppt, die Proben für 10 min aufgekocht und nach SDS-PAGE die Raf-Kinaseaktivität über die GST-Erk1K63M-Phosphorylierung mit ImageQuant 5.2 detektiert.

### 5.2.11. Affinitätspräzipitation aktivierter GTPasen

Die Bestimmung der GTPase-Aktivitäten erfolgte durch einen nichtradioaktiven Präzipitationsassay mit Hilfe aktivierungsspezifischer GST-Fusionsproteine. Stimulierte Zellen wurden mit MLB lysiert. Dieser Lysepuffer enthält Magnesiumionen, die als Kofaktoren die Komplexe zwischen GTP und den Ras-Proteinen stabilisieren. Natriumfluorid darf nicht zugesetzt werden, es bildet mit den Magnesiumionen unlösliches MgF<sub>2</sub> und fällt aus. Nach Extraktion für 15 min bei 4°C auf dem Nutator und nachfolgender Zentrifugation (20 min mit 20000 g bei 4°C) wurde der Überstand abgenommen und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Die Lysate wurden meist

sofort weiterverarbeitet. War dies nicht möglich, wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der GTPase-GTP-Komplex unterliegt der Autohydrolyse, so dass zügig gearbeitet wurde. Die GST-Fusionsproteine mit den spezifischen Bindedomänen wurden in Bakterien exprimiert. Die Bakterien wurden in TPE mit 1 mM DTT, 10% Glycerin und Inhibitoren (siehe 5.1.8.) lysiert und der 10000 g Überstand wurde aliquotiert und nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zu einem Jahr gelagert. Der Gehalt an Fusionsprotein wurde anhand eines Aliquots durch Affinitätsaufreinigung, Proteinbestimmung, SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bestimmt. 20-30  $\mu\text{g}$  GST-c-Raf-1-RBD (1-149) (Taylor und Shalloway, 1996) wurden am Tag des Assays frisch aus bakteriellem 10000 g Überstand an 20  $\mu\text{l}$  Glutathion-Sepharose immobilisiert (2-5 h,  $4^{\circ}\text{C}$ , Nutator). Nach dreimaligem Waschen mit MLB wurden ca. 500  $\mu\text{g}$  der MLB-Zellysate dazugegeben und gegebenenfalls mit MLB auf gleiche Volumina aufgefüllt. Die Affinitätspräzipitation erfolgte für eine Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf dem Nutator. Anschließend wurde dreimal mit MLB gewaschen, die präzipitierten Proteine in SDS-PAGE-Ladepuffer aufgenommen, aufgeköcht und durch SDS-PAGE aufgetrennt, wobei das Gel nur zu ca. 30% gelaufen lassen wurde, um eine Doppelbande im Bereich der Ras-Proteine zu vermeiden.

## **5.2.12. Arbeiten mit Bakterienkulturen**

### **5.2.12.1. Kultivierung und Lagerung durch Einfrieren**

Plasmid-transformierte Bakterienstämme wurden auf LB-Platten mit Ampicillin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  selektioniert. Für Übernachtskulturen wurde 1 Kolonie mit einer sterilen Impföse in LB-Medium mit Ampicillin bei  $37^{\circ}\text{C}$  angezogen. Die Kultur wurde dann benutzt, um Glycerindauerkulturen anzulegen, Plasmid-DNS zu präparieren oder Fusionsproteine aufzureinigen.

Für die Lagerung der Bakterien wurden diese in glycerinhaltiges Medium überführt. Dafür wurden 500  $\mu\text{l}$  einer Bakterienkultur mit einer optischen Dichte (OD; gemessen in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm) von ungefähr 0,8 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Dann wurden 500  $\mu\text{l}$  80%-iges Glycerin dazugegeben, gut

vermischt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zum Animpfen einer Übernachtskultur wurde die Glycerindauerkultur von außen nur an der Oberfläche soweit angetaut, dass mit einer Impföse etwas der Kultur aufgenommen und in LB-Medium überführt werden konnte.

### **5.2.12.2. Herstellung kompetenter Bakterien**

Um Bakterien transformieren zu können, müssen diese durch Behandlung der Bakterienmembran durchlässig (kompetent) gemacht werden. Dafür wurden die Bakterien in 100 ml LB-Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 300 UpM kultiviert, bis die Kultur eine OD von 0,2 erreicht hat. Die Bakterien wurden dann für 10 min auf Eis gekühlt und für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 2500 g (Megazentrifuge Beckman J-6B) abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 10 ml eiskalter 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung vorsichtig resuspendiert und für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 2 ml 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung aufgenommen. Die Bakterien wurden dann 24-48 h auf Eis gelagert und anschließend sofort verwendet oder eingefroren. Zum Einfrieren wurden die kompetenten Bakterien portioniert und zu jeweils 1 ml Bakteriensuspension wurden 35  $\mu\text{l}$  DMSO pipettiert. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt und die kompetenten Bakterien wurden daraufhin in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **5.2.12.3. Transformation kompetenter Bakterien**

Die kompetenten Bakterien des gewünschten Bakterienstammes wurden auf Eis aufgetaut. 50  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden mit 1-2  $\mu\text{l}$  aufgereinigter Plasmid-DNS in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorsichtig gemischt und 10-30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 90 s, um nach der Aufnahme der Plasmid-DNS die Reparatur der Bakterienmembran einzuleiten. Danach wurden die Bakterien 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 125  $\mu\text{l}$  auf Raumtemperatur vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden dann für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Heizblock inkubiert. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte durch Ausplattieren von 50-100  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension auf antibiotikahaltige SOB-Agarplatten. Da die transformierten

Plasmide z.B. Resistenzgene für Ampicillin besitzen, die Ausgangsstämme jedoch Ampicillin-sensitiv sind, können nur Kolonien aus transformierten Bakterien auf den Agarplatten entstehen. Eine Übernachtskultur wurde mit einer der entstandenen Kolonien angeimpft und zur DNS-Präparation oder Expression des GST-Konstrukts weiterverwendet.

#### **5.2.12.4. Präparation von Plasmid-DNS aus Bakterienkulturen**

500 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurden aus der Glycerindauerkultur oder von einer Agarplatte mit Bakterien, die das gewünschte Plasmid tragen, angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 220 UpM wachsen gelassen. Die Bakterien wurden dann geerntet und die Plasmid-DNS mit Hilfe eines QIAGEN Plasmid Maxi Kits isoliert. Die Extraktion beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim. Dafür wurden die Bakterien zunächst bei 2500 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die weitere Extraktion folgte der dem Kit beiliegenden Anweisung.

Aus dem Eluat wurde schließlich die DNS mit 10,5 ml Isopropanol gefällt, bei 3200 g für 30 min abzentrifugiert, zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde dann vorsichtig in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und z.B. für Transfektionen von Säugerzellkulturen verwendet. Die DNS-Konzentration wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Für die Bestimmung der DNS-Konzentration einer Lösung gilt, dass eine optische Dichte von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS entspricht.

#### **5.2.12.5. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli***

Eine 20 ml *E.coli*-Übernachtskultur wurde in einem Erlenmeyerkolben mit 600 ml LB-Medium und Ampicillin überimpft. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer OD von 0,8 bei 37°C und 220 UpM im Schüttler wachsen gelassen (ca. 3-4 h). Die für die Expression von GST-Proteinen verwendeten pGEX-Vektoren (Pharmacia) besitzen einen LacZ-Promotor, der die Transkription kontrolliert. Dieser Promotor wird durch Laktose oder das Laktose-



Analogon Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert, woraufhin mRNA und schließlich GST-Protein produziert wird.

Haben die Bakterien die gewünschte Dichte in der Kultur erreicht, induziert man die Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG für 2 h bei 25°C und 220 UpM. Die Bakterien wurden anschließend für 30 min bei 4°C und 2500 g in einer Beckman J-6B Megazentrifuge abzentrifugiert und in Lysepuffer (TPE), versetzt mit Protease-Inhibitoren (siehe 5.1.8.), resuspendiert. Das Lysat wurde dreimal für 1 min in Intervallen sonifiziert, um die Bakterien aufzubrechen und die DNS durch den Ultraschall zu zerstören. Da sich die Suspension während der Beschallung erhitzt, wurde sie auf Eis vorgenommen, um Degradation von Proteinen zu vermeiden. Zellfragmente wurden bei 10000 g (Avanti J-25 Sorvall Legend RT) und 4°C abzentrifugiert und das Pellet verworfen. Das bakterielle Rohlysat, das die löslichen GST-Fusionsproteine enthält, wurde entweder in flüssigem Stickstoff portionsweise eingefroren oder über Nacht mit Glutathion-Sepharose bei 4°C auf dem Nutator inkubiert. Die so an der Sepharose immobilisierten Proteine wurden dann in der Zellsuspension auf eine Poly-Prep-Säule (Bio-Rad) pipettiert. Die Sepharose wurde nach Durchlaufen der Zellsuspension mit 20 ml Bakterien-Lysepuffer (TPE), gefolgt von 40 ml GTB-Waschpuffer, gewaschen, um ungebundene, bakterielle Proteine zu entfernen. Die GST-Fusionsproteine sind in einer Verdrängungsreaktion in zwei Schritten mit insgesamt 400  $\mu$ l Elutionspuffer, der 100 mM Glutathion enthielt, von der Glutathion-Sepharose gewaschen worden (jeweils 2 h Inkubationszeit). Das Glutathion ist durch drei folgende Dialyseschritte (24 h, 4°C), gegen je 1 l 5 mM TrisHCl pH 7,5 entfernt worden. Bei leicht präzipitierenden Proteinen empfiehlt sich die Dialyse gegen 1 mM DTT, 0,1% Tween 20 in 50 mM TrisHCl pH 7,5. Die Konzentration der so gereinigten Fusionsproteine wurde in einem Bradfordassay bestimmt und die Integrität der Proteine durch ein 12% SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung verifiziert.

## **6. Literaturverzeichnis**

- Alberts, B. (1994) *Molecular biology of the cell*. Garland Pub., New York.
- Alexanian, R. (1969) Erythropoietin and erythropoiesis in anemic man following androgens. *Blood*, **33**, 564-572.
- Aman, M.J., Lamkin, T.D., Okada, H., Kurosaki, T. and Ravichandran, K.S. (1998) The inositol phosphatase SHIP inhibits Akt/PKB activation in B cells. *J Biol Chem*, **273**, 33922-33928.
- Backx, B., Broeders, L., Touw, I. and Lowenberg, B. (1993) Blast colony-forming cells in myelodysplastic syndrome: decreased potential to generate erythroid precursors. *Leukemia*, **7**, 75-79.
- Berridge, M.J., Lipp, P. and Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 11-21.
- Beru, N., McDonald, J., Lacombe, C. and Goldwasser, E. (1986) Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol*, **6**, 2571-2575.
- Beutler, E. and Williams, W.J. (1995) *Williams hematology*. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York.
- Bondurant, M.C. and Koury, M.J. (1986) Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol*, **6**, 2731-2733.
- Bos, J.L. (1995) A target for phosphoinositide 3-kinase: Akt/PKB. *Trends Biochem Sci*, **20**, 441-442.
- Boulton, T.G. and Cobb, M.H. (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul*, **2**, 357-371.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Cales, C., Hancock, J.F., Marshall, C.J. and Hall, A. (1988) The cytoplasmic protein GAP is implicated as the target for regulation by the ras gene product. *Nature*, **332**, 548-551.
- Cambien, B., Millet, M.A., Schmid-Antomarchi, H., Brossette, N., Rossi, B. and Schmid-Alliana, A. (1999) Src-regulated extracellular signal-related kinase and Syk-regulated c-Jun N-terminal kinase pathways act in conjunction to induce IL-1 synthesis in response to microtubule disruption in HL60 cells. *J Immunol*, **163**, 5079-5085.
- Cantor, A.B. and Orkin, S.H. (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*, **21**, 3368-3376.
- Carroll, M.P., Spivak, J.L., McMahon, M., Weich, N., Rapp, U.R. and May, W.S. (1991) Erythropoietin induces Raf-1 activation and Raf-1 is required for erythropoietin-mediated proliferation. *J Biol Chem*, **266**, 14964-14969.
- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C. and Schumacker, P.T. (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11715-11720.
- Chida, D., Miura, O., Yoshimura, A. and Miyajima, A. (1999) Role of cytokine signaling molecules in erythroid differentiation of mouse fetal liver hematopoietic cells: functional analysis of signaling molecules by retrovirus-mediated expression. *Blood*, **93**, 1567-1578.
- Chitambar, C.R. and Zivkovic, Z. (1989) Release of soluble transferrin receptor from the surface of human leukemic HL60 cells. *Blood*, **74**, 602-608.

- Chong, H., Vikis, H.G. and Guan, K.L. (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*, **15**, 463-469.
- Chui, D.H. and Clarke, B.J. (1982) Abnormal erythroid progenitor cells in human preleukemia. *Blood*, **60**, 362-367.
- Clark, O., Adams, J.R., Bennett, C.L. and Djulbegovic, B. (2002) Erythropoietin, uncertainty principle and cancer related anaemia. *BMC Cancer*, **2**, 23.
- Claustres, M., Chatelain, P. and Sultan, C. (1987) Insulin-like growth factor I stimulates human erythroid colony formation in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, **65**, 78-82.
- Congote, L.F., Brox, A., Lin, F.K., Lu, H.S. and Fauser, A.A. (1991) The N-terminal sequence of the major erythropoietic factor of an anephric patient is identical to insulin-like growth factor I. *J Clin Endocrinol Metab*, **72**, 727-729.
- Constantinescu, S.N., Ghaffari, S. and Lodish, H.F. (1999) The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol Metab*, **10**, 18-23.
- Constantinescu, S.N., Keren, T., Socolovsky, M., Nam, H., Henis, Y.I. and Lodish, H.F. (2001) Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4379-4384.
- Cooper, G.M. (1995) *Oncogenes*. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Cotes, M.P. and Bangham, D.R. (1966) The international reference preparation of erythropoietin. *Bull WHO*, **35**, 751.
- Csukai, M. and Mochly-Rosen, D. (1999) Pharmacologic modulation of protein kinase C isozymes: the role of RACKs and subcellular localisation. *Pharmacol Res*, **39**, 253-259.
- Cullen, P.J. and Lockyer, P.J. (2002) Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 339-348.
- Damen, J.E., Wakao, H., Miyajima, A., Krosli, J., Humphries, R.K., Cutler, R.L. and Krystal, G. (1995) Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation. *EMBO J*, **14**, 5557-5568.
- Darley, R.L., Hoy, T.G., Baines, P., Padua, R.A. and Burnett, A.K. (1997) Mutant N-RAS induces erythroid lineage dysplasia in human CD34+ cells. *J Exp Med*, **185**, 1337-1347.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. and Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, **351**, 95-105.
- De Meyts, P., Christoffersen, C.T., Urso, B., Wallach, B., Gronskov, K., Yakushiji, F. and Shymko, R.M. (1995) Role of the time factor in signaling specificity: application to mitogenic and metabolic signaling by the insulin and insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinases. *Metabolism*, **44**, 2-11.
- Denny, W.F., Flanagan, W.J. and Zukoski, C.F., 3rd. (1966) Serial erythropoietin studies in patients undergoing renal homotransplantation. *J Lab Clin Med*, **67**, 386-397.
- Denouel-Galy, A., Douville, E.M., Warne, P.H., Papin, C., Laugier, D., Calothy, G., Downward, J. and Eychene, A. (1998) Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Curr Biol*, **8**, 46-55.
- Denton, R.M. and Tavaré, J.M. (1995) Does mitogen-activated-protein kinase have a role in insulin action? The cases for and against. *Eur J Biochem*, **227**, 597-611.
- Dhillon, A.S., Meikle, S., Yazici, Z., Eulitz, M. and Kolch, W. (2002) Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J*, **21**, 64-71.

- Divoky, V., Liu, Z., Ryan, T.M., Prchal, J.F., Townes, T.M. and Prchal, J.T. (2001) Mouse model of congenital polycythemia: Homologous replacement of murine gene by mutant human erythropoietin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 986-991.
- Duprez, V., Blank, U., Chretien, S., Gisselbrecht, S. and Mayeux, P. (1998) Physical and functional interaction between p72(syk) and erythropoietin receptor. *J Biol Chem*, **273**, 33985-33990.
- Erbayraktar, S., Yilmaz, O., Gokmen, N. and Brines, M. (2003) Erythropoietin Is a Multifunctional Tissue-protective Cytokine. *Curr Hematol Rep*, **2**, 465-470.
- Erslev, A.J. (1953) Humoral regulation of red cell production. *Blood*, **8**, 349.
- Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A. and Trzaskos, J.M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, **273**, 18623-18632.
- Fitzsimons, E.J. and Brock, J.H. (2001) The anaemia of chronic disease. *Bmj*, **322**, 811-812.
- Foresta, C., Mioni, R., Bordon, P., Miotto, D., Montini, G. and Varotto, A. (1994) Erythropoietin stimulates testosterone production in man. *J Clin Endocrinol Metab*, **78**, 753-756.
- Foukas, L.C., Daniele, N., Ktori, C., Anderson, K.E., Jensen, J. and Shepherd, P.R. (2002) Direct effects of caffeine and theophylline on p110 delta and other phosphoinositide 3-kinases. Differential effects on lipid kinase and protein kinase activities. *J Biol Chem*, **277**, 37124-37130.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C. and Toker, A. (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*, **275**, 665-668.
- Freyssinier, J.M., Lecoq-Lafon, C., Amsellem, S., Picard, F., Ducrocq, R., Mayeux, P., Lacombe, C. and Fichelson, S. (1999) Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. *Br J Haematol*, **106**, 912-922.
- Gobert, S., Chretien, S., Gouilleux, F., Muller, O., Pallard, C., Dusanter-Fourt, I., Groner, B., Lacombe, C., Gisselbrecht, S. and Mayeux, P. (1996) Identification of tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor crucial for STAT5 activation. *EMBO J*, **15**, 2434-2441.
- Guillard, C., Chretien, S., Pelus, A.S., Porteu, F., Muller, O., Mayeux, P. and Duprez, V. (2003) Activation of the mitogen-activated protein kinases Erk1/2 by erythropoietin receptor via a G(i) protein beta gamma-subunit-initiated pathway. *J Biol Chem*, **278**, 11050-11056.
- Hall-Jackson, C.A., Evers, P.A., Cohen, P., Goedert, M., Boyle, F.T., Hewitt, N., Plant, H. and Hedge, P. (1999) Paradoxical activation of Raf by a novel Raf inhibitor. *Chem Biol*, **6**, 559-568.
- Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brisette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A. and Connelly, P.A. (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem*, **271**, 695-701.
- Hanspal, M. (1997) Importance of cell-cell interactions in regulation of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*, **4**, 142-147.
- Harmer, S.L. and DeFranco, A.L. (1999) The src homology domain 2-containing inositol phosphatase SHIP forms a ternary complex with Shc and Grb2 in antigen receptor-stimulated B lymphocytes. *J Biol Chem*, **274**, 12183-12191.

- Harris, A.L. (2002) Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, **2**, 38-47.
- Haseyama, Y., Sawada, K., Oda, A., Koizumi, K., Takano, H., Tarumi, T., Nishio, M., Handa, M., Ikeda, Y. and Koike, T. (1999) Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis. *Blood*, **94**, 1568-1577.
- Helgason, C.D., Damen, J.E., Rosten, P., Grewal, R., Sorensen, P., Chappel, S.M., Borowski, A., Jirik, F., Krystal, G. and Humphries, R.K. (1998) Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev*, **12**, 1610-1620.
- Hibbs, M.L., Tarlinton, D.M., Armes, J., Grail, D., Hodgson, G., Maglitta, R., Stacker, S.A. and Dunn, A.R. (1995) Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell*, **83**, 301-311.
- Huang, L.J., Constantinescu, S.N. and Lodish, H.F. (2001) The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell*, **8**, 1327-1338.
- Huber, M., Helgason, C.D., Scheid, M.P., Duronio, V., Humphries, R.K. and Krystal, G. (1998) Targeted disruption of SHIP leads to Steel factor-induced degranulation of mast cells. *EMBO J*, **17**, 7311-7319.
- Itoh, T. and Takenawa, T. (2002) Phosphoinositide-binding domains: Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling. *Cell Signal*, **14**, 733-743.
- Ivan, M., Haberberger, T., Gervasi, D.C., Michelson, K.S., Gunzler, V., Kondo, K., Yang, H., Sorokina, I., Conaway, R.C., Conaway, J.W. and Kaelin, W.G., Jr. (2002) Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13459-13464.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. and Kaelin, W.G., Jr. (2001) HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*, **292**, 464-468.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (2001) Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468-472.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fritsch, E.F. and et al. (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, **313**, 806-810.
- Jacobson, L.O. (1957) Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*, **179**, 633.
- Jepson, J.H. and McGarry, E.E. (1972) Hemopoiesis in pituitary dwarfs treated with human growth hormone and testosterone. *Blood*, **39**, 229-248.
- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R.T., Umanoff, H., Edelman, W., Kucherlapati, R. and Jacks, T. (1997) K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev*, **11**, 2468-2481.
- Juul, S.E., Joyce, A.E., Zhao, Y. and Ledbetter, D.J. (1999) Why is erythropoietin present in human milk? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates. *Pediatr Res*, **46**, 263-268.

- Kadri, Z., Petitfrere, E., Boudot, C., Freyssinier, J.M., Fichelson, S., Mayeux, P., Emonard, H., Hornebeck, W., Haye, B. and Billat, C. (2000) Erythropoietin induction of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 expression and secretion is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cell Growth Differ*, **11**, 573-580.
- Kamiguti, A.S., Harris, R.J., Slupsky, J.R., Baker, P.K., Cawley, J.C. and Zuzel, M. (2003) Regulation of hairy-cell survival through constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene*, **22**, 2272-2284.
- Kapur, R., Majumdar, M., Xiao, X., McAndrews-Hill, M., Schindler, K. and Williams, D.A. (1998) Signaling through the interaction of membrane-restricted stem cell factor and c-kit receptor tyrosine kinase: genetic evidence for a differential role in erythropoiesis. *Blood*, **91**, 879-889.
- Ketteler, R., Heinrich, A.C., Offe, J.K., Becker, V., Cohen, J., Neumann, D. and Klingmuller, U. (2002) A functional green fluorescent protein-erythropoietin receptor despite physical separation of JAK2 binding site and tyrosine residues. *J Biol Chem*, **277**, 26547-26552.
- Kling, P.J. (2002) Roles of erythropoietin in human milk. *Acta Paediatr Suppl*, **91**, 31-35.
- Klingmuller, U. (1997) The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells--signals emanating from the erythropoietin receptor. *Eur J Biochem*, **249**, 637-647.
- Klingmuller, U., Bergelson, S., Hsiao, J.G. and Lodish, H.F. (1996) Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8324-8328.
- Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G. and Lodish, H.F. (1995) Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*, **80**, 729-738.
- Klingmuller, U., Wu, H., Hsiao, J.G., Toker, A., Duckworth, B.C., Cantley, L.C. and Lodish, H.F. (1997) Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3016-3021.
- Koshimura, K., Murakami, Y., Sohmiya, M., Tanaka, J. and Kato, Y. (1999) Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem*, **72**, 2565-2572.
- Koury, S.T., Koury, M.J., Bondurant, M.C., Caro, J. and Graber, S.E. (1989) Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood*, **74**, 645-651.
- Kubota, Y., Tanaka, T., Kitanaka, A., Ohnishi, H., Okutani, Y., Waki, M., Ishida, T. and Kamano, H. (2001) Src transduces erythropoietin-induced differentiation signals through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J*, **20**, 5666-5677.
- Lappin, T.R., Maxwell, A.P. and Johnston, P.G. (2002) EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells*, **20**, 485-492.
- Lee, G.R. and Wintrobe, M.M. (1993) *Wintrobe's clinical hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B. and Schlessinger, J. (1995) Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature*, **376**, 737-745.

- Lewczuk, P., Hasselblatt, M., Kamrowski-Kruck, H., Heyer, A., Unzicker, C., Siren, A.L. and Ehrenreich, H. (2000) Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport*, **11**, 3485-3488.
- Liao, H.J., Kume, T., McKay, C., Xu, M.J., Ihle, J.N. and Carpenter, G. (2002) Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in Plcg1-deficient mice. *J Biol Chem*, **277**, 9335-9341.
- Lindquist, J.A., Simeoni, L. and Schraven, B. (2003) Transmembrane adapters: attractants for cytoplasmic effectors. *Immunol Rev*, **191**, 165-182.
- Liu, G.S., Cohen, M.V., Mochly-Rosen, D. and Downey, J.M. (1999) Protein kinase C-epsilon is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, **31**, 1937-1948.
- Livnah, O., Stura, E.A., Middleton, S.A., Johnson, D.L., Jolliffe, L.K. and Wilson, I.A. (1999) Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science*, **283**, 987-990.
- Lopez, I., Mak, E.C., Ding, J., Hamm, H.E. and Lomasney, J.W. (2001) A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, **276**, 2758-2765.
- Lu, L., Han, A.P. and Chen, J.J. (2001) Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Mol Cell Biol*, **21**, 7971-7980.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., Mason, C.S. and Marshall, C.J. (1997) Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem*, **272**, 4378-4383.
- Marshall, M.S. (1995) Ras target proteins in eukaryotic cells. *Faseb J*, **9**, 1311-1318.
- Marti, H.H., Gassmann, M., Wenger, R.H., Kvietikova, I., Morganti-Kossmann, M.C., Kossmann, T., Trentz, O. and Bauer, C. (1997) Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int*, **51**, 416-418.
- Mason, C.S., Springer, C.J., Cooper, R.G., Superti-Furga, G., Marshall, C.J. and Marais, R. (1999) Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J*, **18**, 2137-2148.
- Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Ueda, M. and Sasaki, R. (1994) A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*, **269**, 19488-19493.
- McDonald, J.D., Lin, F.K. and Goldwasser, E. (1986) Cloning, sequencing, and evolutionary analysis of the mouse erythropoietin gene. *Mol Cell Biol*, **6**, 842-848.
- Meng, T.C., Fukada, T. and Tonks, N.K. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell*, **9**, 387-399.
- Miller, C.P., Heilman, D.W. and Wojchowski, D.M. (2002) Erythropoietin receptor-dependent erythroid colony-forming unit development: capacities of Y343 and phosphotyrosine-null receptor forms. *Blood*, **99**, 898-904.
- Mioni, R., Gottardello, F., Bordon, P., Montini, G. and Foresta, C. (1992) Evidence for specific binding and stimulatory effects of recombinant human erythropoietin on isolated adult rat Leydig cells. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **127**, 459-465.
- Miura, Y., Miura, O., Ihle, J.N. and Aoki, N. (1994) Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J Biol Chem*, **269**, 29962-29969.
- Miyake, T., Kung, C.K. and Goldwasser, E. (1977) Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*, **252**, 5558-5564.

- Monick, M.M., Carter, A.B., Flaherty, D.M., Peterson, M.W. and Hunninghake, G.W. (2000) Protein kinase C zeta plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages. *J Immunol*, **165**, 4632-4639.
- Moreno, F., Sanz-Guajardo, D., Lopez-Gomez, J.M., Jofre, R. and Valderrabano, F. (2000) Increasing the hematocrit has a beneficial effect on quality of life and is safe in selected hemodialysis patients. Spanish Cooperative Renal Patients Quality of Life Study Group of the Spanish Society of Nephrology. *J Am Soc Nephrol*, **11**, 335-342.
- Moriya, S., Kazlauskas, A., Akimoto, K., Hirai, S., Mizuno, K., Takenawa, T., Fukui, Y., Watanabe, Y., Ozaki, S. and Ohno, S. (1996) Platelet-derived growth factor activates protein kinase C epsilon through redundant and independent signaling pathways involving phospholipase C gamma or phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 151-155.
- Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Rapp, U. and Roberts, T.M. (1988) Signal transduction from membrane to cytoplasm: growth factors and membrane-bound oncogene products increase Raf-1 phosphorylation and associated protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8855-8859.
- Muszynski, K.W., Thompson, D., Hanson, C., Lyons, R., Spadaccini, A. and Ruscetti, S.K. (2000) Growth factor-independent proliferation of erythroid cells infected with Friend spleen focus-forming virus is protein kinase C dependent but does not require Ras-GTP. *J Virol*, **74**, 8444-8451.
- Myklebust, J.H., Smeland, E.B., Josefsen, D. and Sioud, M. (2000) Protein kinase C-alpha isoform is involved in erythropoietin-induced erythroid differentiation of CD34(+) progenitor cells from human bone marrow. *Blood*, **95**, 510-518.
- Nicolini, F.E., Holyoake, T.L., Cashman, J.D., Chu, P.P., Lambie, K. and Eaves, C.J. (1999) Unique differentiation programs of human fetal liver stem cells shown both in vitro and in vivo in NOD/SCID mice. *Blood*, **94**, 2686-2695.
- Ohneda, K. and Yamamoto, M. (2002) Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol*, **108**, 237-245.
- Okada, A., Kinoshita, Y., Maekawa, T., Hassan, M.S., Kawanami, C., Asahara, M., Matsushima, Y., Kishi, K., Nakata, H., Naribayashi, Y. and Chiba, T. (1996) Erythropoietin stimulates proliferation of rat-cultured gastric mucosal cells. *Digestion*, **57**, 328-332.
- Oostendorp, R.A. and Dormer, P. (1997) VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells. *Leuk Lymphoma*, **24**, 423-435.
- Orkin, S.H. (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*, **1**, 57-64.
- Osawa, M., Yamaguchi, T., Nakamura, Y., Kaneko, S., Onodera, M., Sawada, K., Jegalian, A., Wu, H., Nakauchi, H. and Iwama, A. (2002) Erythroid expansion mediated by the Gfi-1B zinc finger protein: role in normal hematopoiesis. *Blood*, **100**, 2769-2777.
- Otsu, M., Terada, Y. and Okayama, H. (1993) Isolation of two members of the rat MAP kinase kinase gene family. *FEBS Lett*, **320**, 246-250.
- Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F. and Williams, R.L. (2000) Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell*, **103**, 931-943.



- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., Grosveld, G. and Ihle, J.N. (1998) Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*, **93**, 385-395.
- Pawson, T. and Nash, P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*, **300**, 445-452.
- Pircher, T.J., Geiger, J.N., Zhang, D., Miller, C.P., Gaines, P. and Wojchowski, D.M. (2001) Integrative signaling by minimal erythropoietin receptor forms and c-Kit. *J Biol Chem*, **276**, 8995-9002.
- Qu, C.K., Shi, Z.Q., Shen, R., Tsai, F.Y., Orkin, S.H. and Feng, G.S. (1997) A deletion mutation in the SH2-N domain of Shp-2 severely suppresses hematopoietic cell development. *Mol Cell Biol*, **17**, 5499-5507.
- Quelle, F.W., Wang, J., Feng, J., Wang, D., Cleveland, J.L., Ihle, J.N. and Zambetti, G.P. (1998) Cytokine rescue of p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest is mediated by distinct Jak kinase signaling pathways. *Genes Dev*, **12**, 1099-1107.
- Reddy, E.P., Korapati, A., Chaturvedi, P. and Rane, S. (2000) IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene*, **19**, 2532-2547.
- Reissman, K.R. (1950) Studies on the mechanism of rats during hypoxia. *Blood*, **5**, 372.
- Rhee, S.G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*, **70**, 281-312.
- Rohrschneider, L.R., Fuller, J.F., Wolf, I., Liu, Y. and Lucas, D.M. (2000) Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev*, **14**, 505-520.
- Rossomando, A., Wu, J., Weber, M.J. and Sturgill, T.W. (1992) The phorbol ester-dependent activator of the mitogen-activated protein kinase p42mapk is a kinase with specificity for the threonine and tyrosine regulatory sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5221-5225.
- Rubio, I., Rodriguez-Viciano, P., Downward, J. and Wetzker, R. (1997) Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Biochem J*, **326 ( Pt 3)**, 891-895.
- Sakamoto, H., Kitamura, T. and Yoshimura, A. (2000) Mitogen-activated protein kinase plays an essential role in the erythropoietin-dependent proliferation of CTLL-2 cells. *J Biol Chem*, **275**, 35857-35862.
- Sander, E.E., van Delft, S., ten Klooster, J.P., Reid, T., van der Kammen, R.A., Michiels, F. and Collard, J.G. (1998) Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol*, **143**, 1385-1398.
- Sawada, K., Sato, N., Notoya, A., Tarumi, T., Hirayama, S., Takano, H., Koizumi, K., Yasukouchi, T., Yamaguchi, M. and Koike, T. (1995) Proliferation and differentiation of myelodysplastic CD34+ cells: phenotypic subpopulations of marrow CD34+ cells. *Blood*, **85**, 194-202.
- Sawyer, S. (1990) *Receptor for erythropoietin. Distribution, structure, and role in receptor-mediated endocytosis in erythroid cells*. Plenum, New York.
- Scharenberg, A.M. and Kinet, J.P. (1998) PtdIns-3,4,5-P3: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals. *Cell*, **94**, 5-8.
- Schumacher, H.R. and Erslev, A.J. (1956) *Bone marrow kinetics*. In *Nuclear Kinetics*, ed E Szirmai. New York: Academic Press.
- Shih, T.Y., Papageorge, A.G., Stokes, P.E., Weeks, M.O. and Scolnick, E.M. (1980) Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21src protein of Harvey murine sarcoma virus. *Nature*, **287**, 686-691.

- Silva, M., Benito, A., Sanz, C., Prosper, F., Ekhterae, D., Nunez, G. and Fernandez-Luna, J.L. (1999) Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem*, **274**, 22165-22169.
- Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Brugnara, C. and Lodish, H.F. (1999) Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a<sup>-/-</sup>5b<sup>-/-</sup> mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*, **98**, 181-191.
- Socolovsky, M., Nam, H., Fleming, M.D., Haase, V.H., Brugnara, C. and Lodish, H.F. (2001) Ineffective erythropoiesis in Stat5a<sup>(-/-)</sup>5b<sup>(-/-)</sup> mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*, **98**, 3261-3273.
- Sokol, L., Prchal, J.F., D'Andrea, A., Rado, T.A. and Prchal, J.T. (1994) Mutation in the negative regulatory element of the erythropoietin receptor gene in a case of sporadic primary polycythemia. *Exp Hematol*, **22**, 447-453.
- Song, C., Hu, C.D., Masago, M., Kariyai, K., Yamawaki-Kataoka, Y., Shibatohe, M., Wu, D., Satoh, T. and Kataoka, T. (2001) Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras. *J Biol Chem*, **276**, 2752-2757.
- Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R. and Bradley, A. (1991) Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*, **64**, 693-702.
- Stein, R.C. and Waterfield, M.D. (2000) PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today*, **6**, 347-357.
- Stephens, L., McGregor, A. and Hawkins, P. (2000) Phosphoinositide 3-kinases: regulation by cell-surface receptors and function of 3-phosphorylated lipids. In Cockcroft, S. (ed.), *Biology of phosphoinositides*. Oxford University Press, Oxford, pp. 32-130.
- Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A.S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P. and Hawkins, P.T. (1997) The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell*, **89**, 105-114.
- Suda, T., Takakura, N. and Oike, Y. (2000) Hematopoiesis and angiogenesis. *Int J Hematol*, **71**, 99-107.
- Tapiero, H., Gate, L. and Tew, K.D. (2001) Iron: deficiencies and requirements. *Biomed Pharmacother*, **55**, 324-332.
- Taylor, S.J. and Shalloway, D. (1996) Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr Biol*, **6**, 1621-1627.
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G. and Ihle, J.N. (1998) Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, **93**, 841-850.
- Tilbrook, P.A., Ingley, E., Williams, J.H., Hibbs, M.L. and Klinken, S.P. (1997) Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells. *EMBO J*, **16**, 1610-1619.
- Till, J.E. and McCulloch, E. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, **14**, 213-222.
- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D.J., Ballas, L.M. and Cantley, L.C. (1994) Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J Biol Chem*, **269**, 32358-32367.
- van der Geer, P., Hunter, T. and Lindberg, R.A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 251-337.

- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J. and Waterfield, M.D. (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem*, **70**, 535-602.
- Varmus, H.E. and Lowell, C.A. (1994) Cancer genes and hematopoiesis. *Blood*, **83**, 5-9.
- von Lindern, M., Parren-van Amelsvoort, M., van Dijk, T., Deiner, E., van den Akker, E., van Emst-de Vries, S., Willems, P., Beug, H. and Lowenberg, B. (2000) Protein kinase C alpha controls erythropoietin receptor signaling. *J Biol Chem*, **275**, 34719-34727.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. and Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5510-5514.
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4304-4308.
- Wickrema, A., Uddin, S., Sharma, A., Chen, F., Alsayed, Y., Ahmad, S., Sawyer, S.T., Krystal, G., Yi, T., Nishada, K., Hibi, M., Hirano, T. and Platanias, L.C. (1999) Engagement of Gab1 and Gab2 in erythropoietin signaling. *J Biol Chem*, **274**, 24469-24474.
- Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O. and Ihle, J.N. (1993) JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*, **74**, 227-236.
- Wojchowski, D.M., Gregory, R.C., Miller, C.P., Pandit, A.K. and Pircher, T.J. (1999) Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res*, **253**, 143-156.
- Wolfman, A. and Macara, I.G. (1990) A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras. *Science*, **248**, 67-69.
- Wu, H., Klingmuller, U., Besmer, P. and Lodish, H.F. (1995a) Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*, **377**, 242-246.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. and Lodish, H.F. (1995b) Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, **83**, 59-67.
- Wymann, M.P., Bjorklof, K., Calvez, R., Finan, P., Thomast, M., Trifilieff, A., Barbier, M., Altruda, F., Hirsch, E. and Laffargue, M. (2003) Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy. *Biochem Soc Trans*, **31**, 275-280.
- Yu, W., Fantl, W.J., Harrowe, G. and Williams, L.T. (1998) Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol*, **8**, 56-64.
- Yu, X., Lin, C.S., Costantini, F. and Noguchi, C.T. (2001) The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse. *Blood*, **98**, 475-477.
- Zang, H., Sato, K., Nakajima, H., McKay, C., Ney, P.A. and Ihle, J.N. (2001) The distal region and receptor tyrosines of the Epo receptor are non-essential for in vivo erythropoiesis. *EMBO J*, **20**, 3156-3166.
- Zhang, J., Socolovsky, M., Gross, A.W. and Lodish, H.F. (2003) Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system. *Blood*.
- Zheng, C.F. and Guan, K.L. (1993) Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem*, **268**, 11435-11439.

## **Danksagung**

Stephan Feller, ich danke Dir für die Aufnahme in Dein Labor und die Bereitstellung dieses interessanten Themas, der Betreuung der Arbeit und die stetige Diskussionsbereitschaft. Vielen Dank auch für die Einweihung in die Sushi-Kultur und die Unterstützung beim Umsiedeln nach Oxford.

Herrn Prof. Dr. G. Krohne danke ich für die Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen und sein Interesse an meiner Arbeit.

Danke Guido Posern für Deine Hilfe und Betreuung in meiner Anfangsphase am MSZ, für Deine Freundschaft und den Huckel auf meiner rechten Schulter. Christian Kardinal, danke für anregende Unterhaltungen und Tips am Fenster. Ebenfalls möchte ich Antje Rhode für neue Unterhaltungsthemen, Dima Sakkab für angenehmen Stress, Jan Voss und Yvonne Starke für die Bewahrung einer angenehmen Atmosphäre im Labor danken. Marc Lewitzky, danke für Deine Hilfe bei der Ausübung der englischen Sprache und die schnarchigen Momente.

Ich danke Bruce Jordan für seine unvergesslichen Feiern und die Rückgabe unserer Wohnung, Bernd Neufeld (Kinaseassay mit 4 Wochen Planung), Marc Schmidt (kaltes Amsterdam), Suzanna Petrovic + Gordan Chan + Anke Harenberg für Dachmeetings und Dienstag-Cocktails und vielen anderen, die mir die Zeit am MSZ so angenehm machten.

Serge Fichelson, ich danke Dir für Deine Kollaboration und Fürsorge während meines Aufenthaltes in Paris. Desweiteren danke ich allen in Paris gewonnenen Freunden, für meine Integration in ihre Runde und die Nachsicht bei meinen mangelnden Sprachkenntnissen. Danke Aurelie Kieusseian für die andauernde Freundschaft und „Cafe au longe“.

Ich danke allen Mitgliedern unseres Oxford-Labors, Verity Cadd, Maria Harkiolaki, Silja Wessler (fürs Fehlerfinden und zahlreichen Tips), Tassos Konstantinou (my Greek successor), Marc Lewitzky (ja, immer noch) und Sunil Verma.

For keeping the unit running smoothly I must thank John Moffatt, James Beesley and Reginald Boone. For all their efforts in the washroom I extend my thanks to the washroom ladies; Carol Bowden, Linda Beattie and Rose Earp. For keeping me alive in the jungl of bureaucracy I have to thank all the secretaries.

It was not easy moving to a country whose language (e.g. John's) was initially difficult for me to understand. However, I was made to feel very welcome and I would like to thank everyone who became a good friend of mine throughout my time here. In particular I would like to thank certain people for giving me special memories; Rebecca Read (thanks for helping to find temporary accommodation), Sarah Watkins (thanks for the high table dinners at Christ Church!), Heidi Sowter, Kwok (Dai) Lee (thanks for grinning!), Phill North (for feeding me during my training runs), Peter Thomas (for a nice Irish wedding), Chit-Fang (Flea) Cheok, Rikki Khakhar (I'm still better than you at football, even with an injured knee), Hocine Mankouri (I'm better than you too), Ulrike Knies (thanks for corrections), Jonathon Ord (for nice wine experiences), Paul Heal (remember Antwerp) and Leonid Nikitenko (for keeping me fit).

I must thank my housemates Nico Lieke (for immortalising me in the body of a ceramic mole, among other things) and Nicola Maxwell.

I have to thank my wonderful „Berkshire Beauty“ Caroline Jenkins (you make my time so much more enjoyable), her parents, Graham and Gill Jenkins for providing hours of wonderful hospitality, and her little sister, Liz, for providing hours of amusement!

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Hans-Joachim und Karin Schmidt. Ich danke Euch für die langjährige hundertprozentige Unterstützung auf all meinen Wegen. Ohne Euch wäre es nicht möglich gewesen, da zu sein, wo ich jetzt bin. Ich danke auch meinen Großeltern für ihre Hilfe und klein Jonas, Du hast einen ganz besonderen Platz in meinem Herzen.

**Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorgelegte Arbeit noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

(Enrico Schmidt)

## Curriculum Vitae

Name:	Schmidt
Vorname:	Enrico
Geburtsdatum:	15.11.1973
Geburtsort:	Altenburg
Familienstand:	ledig
Nationalität:	Deutsch
Wohnort:	3 Woodbine Place Oxford OX1 1JS United Kingdom Tel.: 0044-1865-721180 Email: schmidtenrico@yahoo.de
seit 07/2001	Weiterführung der Doktorarbeit am Weatherall Institute of Molecular Medicine der Universität Oxford in der Cancer Research UK-Arbeitsgruppe „Cell Signalling“ von Dr. habil Stephan M. Feller
03/2001–05/2001	Forschungsaufenthalt im Rahmen der Doktorarbeit am Institut Cochin, Département d’Hématologie, Inserm U567, Maternité de Port-Royal in Paris (Frankreich): „Erythropoetin induzierte Signalereignisse in der Proliferation und Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen“. (EMBO Short Term Fellowship)
04/1999–06/2001	Doktorarbeit am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ) der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe „Molekulare Onkologie“ von Dr. habil Stephan M. Feller
10/1995–03/1999	Hauptstudium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena <i>Schwerpunkte:</i> Mikrobiologie, medizinische Mikrobiologie, Zoologie, Anthropologie <i>Diplomarbeit:</i> „Untersuchung des Wachstums von <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Phaseolicola</i> unter Eisenmangelbedingungen“ <i>Abschluss:</i> Diplom
10/1993–09/1995	Grundstudium der Biologie an der Universität Leipzig <i>Abschluss:</i> Vordiplom
07/1992–06/1993	Wehrdienst in der Bundeswehr
09/1990–06/1992	Staatliches Gymnasium Geraer-Str. 33 in Altenburg <i>Abschluss:</i> Abitur
09/1980–08/1990	Polytechnische Oberschule in Altenburg

### **Verzeichnis eigener Publikationen**

Kardinal C., Konkol B., Lin H., Eulitz M., **Schmidt E.K.**, Estrov Z., Talpaz M., Arlinghaus R.B., Feller S.M. (2001) CML blast cell proliferation is inhibited by peptides which disrupt Grb2-Sos complexes. *Blood*, **98**, 1773-81.

Lewitzky M., Kardinal C., Gehring N.H., **Schmidt E.K.**, Konkol B., Eulitz M., Birchmeier W., Schaeper U., Feller S.M. (2001) The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-x-x-P core motif. *Oncogene*, **20**, 1052-62.

### **Eingereichtes Manuskript**

**Schmidt E.K.**, Fichelson S., Feller S.M. (2004) PI3-kinase activity is important for Ras, MEK and MAPK/Erk activation of Epo-stimulated primary human erythroid progenitor cells.