

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



**„Analyse funktioneller Elemente des egr-1-Promotors in EPO -
sensitiven Zellen“**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Medizin“
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Dominik Wurm
geb. am 03.01.1984 in Kandel

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. Robert Jaster
Klinik Innere Medizin, Abteilung Gastroenterologie,
Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: PD Dr. Michael Steiner
Leiter der Abteilung für Labordiagnostik, Klinikum
Südstadt Rostock
3. Gutachter: PD Dr. Thomas Bittorf
Institut für Medizinische Biochemie und
Molekularbiologie, Universität Rostock

Datum der Einreichung: 23.05.2016

Datum der Verteidigung: 25.04.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV-VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII-VIII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1. Einleitung	1
2. Stand der Forschung	2
2.1. Erythropoetin	2
2.1.1. Struktur und Funktion.....	2
2.1.2. Regulation der EPO-Expression.....	3
2.1.3. Erythropoietinrezeptor-abhängige Signaltransduktion.....	3
2.2. Der Transkriptionsfaktor Egr-1 als Zielstruktur zytokinabhängiger Signalprozesse	5
2.2.1. Egr1- Struktur	6
2.2.2. Egr-1-Promotor und die Regulation der Egr-1-Expression	7
2.2.3. Egr-1: Funktionelle Bedeutung in der Hämatopoiese	9
2.2.4. Egr-1: Funktion in pankreatischen β -Zellen und bei der Diabetogenese	12
2.2.5. Egr-1 als Tumorsuppressor.....	15
3. Zielsetzung.....	16
4. Material und Methoden	17
4.1. Zelllinien.....	17
4.1.1. Hämatopoetische Zellen	17
4.2. Zellkulturtechniken.....	17
4.2.1. Zellkultur	17
4.2.2. Inhibitoren	17
4.2.3. Zellgewinnung	18
4.2.4. Zellzählung	18
4.2.5. Einfrieren von Zellen.....	18
4.2.6. Transiente Transfektion (Elektroporation)	18
4.2.7. Reportergenassay.....	19
4.3. Nukleinsäure-Isolation/Modifikation/Klonierung	20

4.3.1. RNA-Isolation und cDNA-Synthese	20
4.3.2. Isolierung von genomischer DNA.....	20
4.3.3. Primer	21
4.3.4. PCR und RT-PCR.....	22
4.3.5. Restriktionsanalyse von DNA-Sequenzen	23
4.3.6. Klonierung von DNA	24
4.3.7. Transfer von Plasmid-Vektoren in kompetente E.coli-Bakterien	26
4.3.8. Agarose-Gelelektrophorese	26
4.3.9. Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
4.3.10. Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen.....	27
4.3.11. Sequenzanalyse.....	27
4.4. Chromatin-Präzipitationsassay (ChIP)	28
4.5. Statistische Auswertung	30
5. Ergebnisse	31
5.1. EPO-abhängige Induktion des egr-1-Gens	31
5.2. Klonierung des egr-1-Promoters aus genomischer DNA der Ratte	32
5.2.1. Amplifikation der egr-1-Promotor-Sequenz und Klonierung des PCR-Produktes	32
5.2.2. Sequenzanalyse des klonierten 5'-Bereiches des egr-1-Gens der Ratte und Lokalisation putativer regulatorischer Sequenzen.....	33
5.2.3. Herstellung von Reportergenvektoren.....	35
5.2.4. Herstellung von Reportergenkonstrukten mit verkürzten Promotorabschnitten.....	35
5.3. Analyse des egr-1-Promoters unter Epo-Stimulation.....	37
5.3.1. Untersuchung des egr-1-Promoters nach transienter Transfektion von Reportergenkonstrukten in hämatopoetische Zellen und EPO-Stimulation.....	37
5.3.2. Analyse zur Rolle von EPO-abhängigen Signalwegen für die Promotor-Induktion.....	38
5.4. Analyse Egr-1-abhängiger Zielgene	45
5.4.1. Induktion potentieller Egr-1-Zielgene durch EPO	46
5.4.2. Epigenetische Konfiguration und Egr-1-Bindung an EPO-abhängige Zielgene	46
6. Diskussion.....	49

7. Zusammenfassung	64
8. Literaturverzeichnis	66
Schaefer A, Kósa F, Bittorf T, Magósci M, Rosche A, Ramirez-Chávez Y, Marotzki S, Marquardt H (2004) Opposite effects of inhibitors of mitogen- activated protein kinase pathways on the <i>egr-1</i> and β -globin expression in erythropoietin-responsive murine erythroleukemia cells. <i>Cell. Signalling</i> 2004 <i>Feb</i> , 223-234.....	76
9. Thesen.....	82
10. Danksagung.....	84
11. Selbständigkeitserklärung	85

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AP-1	activator protein-1
ATF-2	activating transcription factor-2
ATP	Adenosintriphosphat
bcl-2	b-cell lymphoma-2
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaar
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD131	cluster of differentiation 131
CRE(B)	cAMP response element (binding protein)
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(complementary) desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EBS	Egr-1-Bindungsstelle
EDTA	Ethyldiamintetraazetat
EGF	epithelial growth factor
egr-1	early growth response-1
EPAC	exchange factor directly activated by cAMP
EPO	Erythropoetin
EPOR	Erythropoetinrezeptor
ERK	extracellular regulated kinase
FKS	Fetales Kälberserum
FoXO	forkhead-box-protein
G	Guanin
GAB	GRB2-associated-binding protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GLP	glucagon-like peptide
(h)GM-CSF	(human) granulocyte macrophage-colony stimulating factor

GTP	Guanosintriphosphat
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
HDAC	Histon-Deacetylase
HIF	hypoxia inducible factor
HPLC	high performance liquid chromatography
IL	Interleukin
INF	Interferon
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JAK	Januskinase
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinase
MAPKAPK	MAP kinase-activated protein kinase
M-MLV	Moloney-murine leukemia virus
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NAB	NGFI-A binding protein
NGFI-A	nerve growth factor-inducible protein A
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDX-1	pancreatic duodenum homeobox-1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKI	Proteinkinaseinhibitor
PLC	Phospholipase C
PTEN	phosphatase and tensin homolog
raf	rat fibrosarcoma
ras	rat sarcoma
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR

SAP	stress activated protein
SAPK	stress activated protein kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH2	Src homology 2
SHP	Src homology region 2 domain-containing phosphatase
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SOCS	suppressor of cytokine signaling protein
SOS	son of sevenless
SP-1	specificity protein-1
SRE	serum response element
SRF	serum response factor
STAT	signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCF	ternary complex factor
TE	Tris-EDTA
TGF	transforming growth factor
TZR	T-Zell-Rezeptor
ZIF-268	zink finger protein 268

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der durch EPO aktivierten Signalwege im erythroiden Zellsystem (modifiziert nach Chateauvieux et al. 2011).....	4
Abb. 2: Struktur-Funktionsbeziehungen im Egr-1-Moleköl (nach Mayer et al 2009).....	6
Abb. 3: Egr-1/GGPPS/ERK1/2-Interaktion bei Entstehung der Insulinresistenz (nach Shen et al., 2011).....	14
Abb. 4: Prinzip der Klonierung von PCR-Fragmenten mit TOPO-TA-Vektoren.....	24
Abb. 5: Induktion des egr-1-Gens durch EPO.....	31
Abb. 6: Amplifikation der Promotorregion des egr-1-Gens und Klonierung des PCR-Produkts	33
Abb. 7: Lokalisation potentiell regulatorischer Sequenzen im egr-1-Promotor (AP-1 activator protein 1; CRE cAMP-responsive element; SRE serum response element; EBR Egr-1 binding region)	34
Abb. 8: Herstellung eines Reportergenkonstruktes mit der putativen regulatorischen Sequenz des egr-1-Promotors	35
Abb. 9: Herstellung verkürzter egr-1-Promotor-Konstrukte	36
Abb. 10: Analyse verkürzter egr-1-Promotor-Konstrukte durch Restriktionsspaltung (Die hergestellten Vektoren bzw. als Kontrolle der leere Vektor wurden mit KpnI/XhoI behandelt. Die Größe der erhaltenen Fragmente entspricht den Erwartungen.)	36
Abb. 11: Dosisabhängige Induktion von Reportergenkonstrukten mit unterschiedlichen Anteilen der putativen egr-1-Promotor-Sequenz durch EPO	37
Abb. 12 a: Dosisabhängige Hemmung der egr-1-Promotoraktivierung durch den MEK1/2-Inhibitor PD98059	38
Abb. 12 b: Dosisabhängige Hemmung der egr-1-Promotoraktivierung durch den MEK1/2-Inhibitor UO126	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abb. 13: Dosisabhängige Hemmung der egr-1-Promotoraktivierung durch den PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002	39
Abb. 14: Dosisabhängige Hemmung der egr-1-Promotoraktivierung durch den p38-MAPKinase-Inhibitor SB203580	40
Abb. 15: Dosisabhängige Hemmung der egr-1-Promotoraktivierung durch den PKA-Inhibitor H-89	41
Abb. 16 a: Einfluss der Überexpression der Tyrosinkinase JAK2 bzw. eines dominant negativen JAK2-Konstrukts auf die Promotorinduktion.....	42

Abb. 16 b: Einfluss der Überexpression der Tyrosinkinase Lyn bzw. eines dominant negativen Lyn-Konstrukts auf die Promotorinduktion. Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Abb. 17: Einfluss der Überexpression der egr-1-cDNA auf die Promotorinduktion	43
Abb. 18: Einfluss signalwegspezifischer Inhibitoren auf die EPO-abhängige Aktivierung verkürzter Promotorkonstrukte.....	44
Abb. 19: Einfluss der Überexpression von egr-1-cDNA auf die EPO-abhängige Aktivierung verkürzter Promotorkonstrukte	45
Abb. 20: Induktion von egr-1 und potentiellen egr-1-Zielgenen in EPO-stimulierten Ba/F3-EPOR-Zellen	46
Abb. 21: Induktion von egr-1 und potentiellen Egr-1-Zielgenen in EPO-stimulierten Ba/F3-EPOR-Zellen	47
Abb. 22: Bindung von Egr-1 an regulatorische Sequenzen von Zielgenen in EPO-stimulierten Ba/F3-EPOR-Zellen	48
Abb. 23: Schematische Darstellung des egr-1-Promotors und seiner regulatorischen Elemente	50
Abb. 24: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Epo-abhängigen Signalwege bei der egr-1-Regulation	58

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primer zur Klonierung des egr-1-Promotors und verkürzter Promotorfragmente ..	21
Tab. 2: Reaktionsbedingungen der PCR-Zyklen	22
Tab. 3: PCR-Produkt/ Taq-Polymerase-Reaktionsansatz.....	24
Tab. 4: Ligationsansatz von PCR-Produkt und TOPO-Vektor	25
Tab. 5: Ansatz zur Klonierung der Restriktionsfragmente in Reportergenvektor	25
Tab. 6: Zyklische Reaktionsfolge im Thermocycler	28
Tab. 7: Basenabweichungen innerhalb des klonierten egr-1-Abschnitts	33
Tab. 8: Regulatorische Bereiche innerhalb des egr-1-Promotors (Ratte).....	34

1. Einleitung

In höheren Organismen bildet die Kommunikation von extra- und intrazellulären Signalen die Grundlage der Regulation der Genexpression und somit der Induktion zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose.

Extrazelluläre Signale werden durch Zytokine und Hormone übermittelt, die nach Bindung an einen Rezeptor intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, welche neben direkten Effekten auf den Stoffwechsel an spezifischen Genabschnitten die Genexpression regulieren.

In dieser Arbeit wird die Funktion eines Zytokin-abhängigen regulatorischen Elementes, des Promotors des egr-1-Gens der Ratte, analysiert. Egr-1 ist ein Zinkfingerprotein, welches als Transkriptionsfaktor die Expression mehrerer Gene reguliert und Einfluss auf den Zellzyklus in unterschiedlichen Geweben nimmt. Für Egr-1 wurde bereits eine Beteiligung an inflammatorischen (Gong et al., 2005), angiogenetischen (Khachigian et al., 1995), neuroprotektiven (Watson et al., 1990) und kanzerogenen (Gibbs et al., 2007) Prozessen nachgewiesen. Auch bei der Proliferation erythroider Zellen wurde ein Mitwirken von Egr-1 demonstriert (Krishnaraju et al., 2001).

Die Synthese von Egr-1 wird durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, aber auch toxische Substanzen beeinflusst. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass das Glykoprotein Erythropoetin (EPO) durch Bindung an den Erythropoetinrezeptor (EPO-R) die egr-1-mRNA-Synthese reguliert. Die Bildung von EPO wird beim Menschen ebenso wie bei anderen Säugetieren durch Hypoxie induziert und stimuliert in der Folge die Synthese roter Blutkörperchen, um die Sauerstofftransportkapazität des Blutes kompensatorisch zu erhöhen. Jedoch nimmt EPO auch außerhalb des erythroiden Systems wichtige Funktionen ein. So konnte EPO eine Beteiligung bei angiogenetischen sowie neuro- und kardioprotektiven Prozessen nachgewiesen werden (Kertesz et al., 2004, Digicaylioglu et al., 2001, Wright et al., 2004).

Zu den EPO-abhängigen Signalkaskaden, die die Egr-1-Synthese beeinflussen, gehören der JAK2/STAT5- (Schulze et al., 2008) und der Raf-MEK-ERK-Signalweg (Schaefer et al., 2004). Es liegen außerdem Daten über eine Epo-abhängige Stimulation des p38-MAPK-Signalwegs (Nagata et al., 1998) sowie über eine p38-MAPK-abhängige Induktion der Egr-1-Synthese (Rolli et al., 1999) vor. Es lassen sich in der Literatur jedoch keine Hinweise zu einer direkten Epo-abhängigen Stimulation der Egr-1-Synthese über den p38-

MAPK-Signalweg finden. Stattdessen wurde sogar ein inhibitorischer Effekt von p38 auf die Egr-1-Synthese unter EPO-Stimulation postuliert (Schaefer et al., 2004). Die Beteiligung der Proteinkinase A bei der Regulation des egr-1-Promotors wird in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert.

Mit Hilfe signalwegspezifischer Inhibitoren wird in dieser Arbeit untersucht, welche Signalwege an der Regulation der Egr-1-Synthese in EPO-stimulierten Ba/F3-Zellen beteiligt sind. Dabei wird angestrebt, den im egr-1-Promotor identifizierbaren regulatorischen Elementen konkrete Signalwege zuzuordnen. Bisher sind die Egr-1-Zielgene im EPO-Signaltransfer unbekannt. Es ist deshalb auch Ziel der Arbeit, solche Gene zu identifizieren und die Rolle von Egr-1 bei ihrer Aktivierung aufzuklären.

2. Stand der Forschung

2.1. Erythropoetin

2.1.1. Struktur und Funktion

Erythropoetin (EPO) ist ein aus 165 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, das im menschlichen Körper regulatorische Funktionen in unterschiedlichen Geweben übernimmt (Chateauvieux et al., 2011). Es wird beim erwachsenen Menschen vor allem in peritubulären Fibroblasten der Niere gebildet (Lacombe et al., 1988). In geringerem Maße sind auch Hepatozyten und perisinusoidale Ito-Zellen der Leber (Maxwell et al., 1994) sowie Zellen des Zentralnervensystems (Masuda et al., 1994) an der Synthese von EPO beteiligt.

Eine vermehrte Synthese von Erythropoetin wird durch einen verminderten Sauerstoffgehalt des Blutes induziert. Die Plasma-EPO-Konzentration kann bei dauerhafter Hypoxie auf das Tausendfache ihres Normwertes ansteigen und somit die Hämoglobin- und Erythrozytensynthese stimulieren (Erslev, 1997).

EPO bindet an einen Membranrezeptor, der auf CFU-E-Zellen (colony forming units-erythroid) bis zum Stadium des basophilen Erythroblasten exprimiert wird und die Differenzierung zu reifen Erythrozyten vermittelt (Spivak, 2005).

Das EPO-Gen wurde erstmals Mitte der achtziger Jahre kloniert, wodurch nachfolgend die Herstellung rekombinanter EPOs ermöglicht wurde (Jacobs et al., 1985). Seitdem wird EPO erfolgreich bei der Therapie EPO-defizienter Anämieformen eingesetzt, wodurch die Zahl notwendiger Erythrozytentransfusionen deutlich reduziert werden konnte (Rizzo et al., 2010).

Inzwischen wurde deutlich, dass nicht nur Zellen des hämatopoetischen Systems durch EPO beeinflusst werden. Mehrere Studien konnten beispielsweise direkte neuro- und kardioprotektive Effekte von EPO bei ischämischen Ereignissen nachweisen (Digicaylioglu et al., 2001; Wright et al., 2004). Auch bei der Gefäßneubildung ist EPO beteiligt (Kertesz et al., 2004).

Bei der Vermittlung des EPO-Signals außerhalb des erythroiden Zellsystems ist möglicherweise ein Rezeptor involviert, der sich strukturell von dem auf erythroiden Zellen exprimierten Rezeptor unterscheidet (Brines & Cerami et al., 2006).

2.1.2. Regulation der EPO-Expression

Zu den wichtigsten Mediatoren bei der Regulation der EPO-Synthese gehört eine Gruppe Hypoxie-gesteuerter Transkriptionsfaktoren aus der Familie der HIF-Proteine (hypoxia inducible factors), insbesondere HIF-1 und 2 (Tan et al., 2013). Diese Proteine besitzen eine zytosolische α - und eine nukleäre β -Untereinheit. Nach Translokation der zytosolischen HIF- α -Untereinheit in den Zellkern und Heterodimerisierung mit der nukleären β -Untereinheit kommt es zur Aktivierung von HIF als Transkriptionsfaktor und einer gemeinsam mit Coaktivatoren (CREB/p300) realisierten Steigerung der transkriptionellen Aktivität des EPO-Gens (Chateauxvieux et al., 2011). Durch hohe Sauerstoffspiegel des Blutes nimmt die Aktivität einer zytoplasmatischen HIF-Prolylhydroxylase (HIF-PH) zu. Diese initiiert durch Hydroxylierung des zytosolischen HIF dessen Bindung mit dem Von-Hippel-Lindau-Protein (VHL), was zu einer Ubiquitin-abhängigen Reduktion von HIF- α und damit zu einer abgesenkten EPO-Expression führt (Epstein et al., 2001; Masson et al., 2001).

2.1.3. Erythropoietinrezeptor-abhängige Signaltransduktion

Der EPO-Rezeptor (EPOR) gehört zur Klasse der Transmembranrezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase. Die Ligandbindung führt zu einer Konformationsänderung der bereits präassoziierten Rezeptorketten, wodurch die assozierte zytosolische Januskinase 2 (JAK2) durch Autophosphorylierung aktiviert wird. Anschließend werden 8 Tyrosinreste des zytosolischen Rezeptorbereichs phosphoryliert (Frank et al., 2002) und dienen in der Folge zur Rekrutierung von Proteinen mit einer SH2 (src-homology2)-Domäne. Ausgehend von dem sich ausbildenden Signalkomplex werden unterschiedliche Signalwege initiiert (Abb. 1).

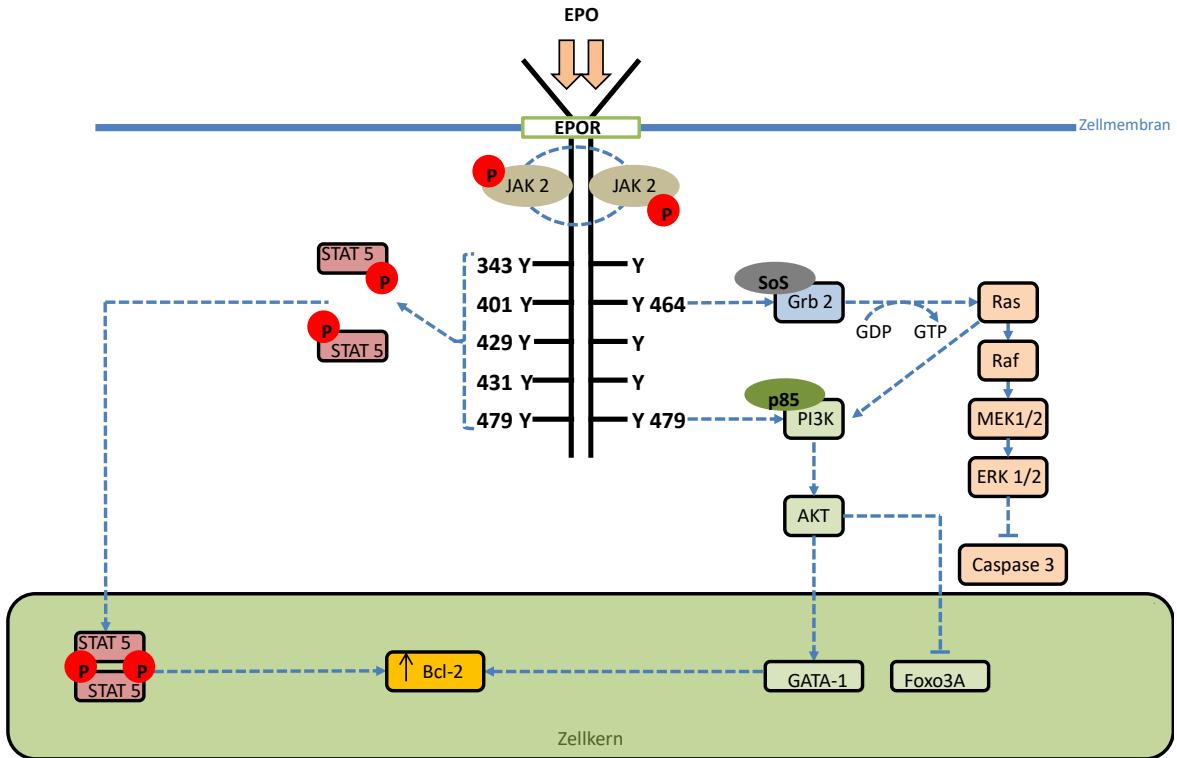


Abb. 1: Schematische Darstellung der durch EPO aktivierten Signalwege im erythroiden Zellsystem (modifiziert nach Chateauvieux et al. 2011)

Ein zentrales durch den EPOR produziertes Signal ist die Aktivierung des JAK2/STAT5-Systems, das Veränderungen in der Genexpression der betroffenen Zellen induziert und u.a. zu einer vermehrten Expression von Bcl2 und damit zur Hemmung der Apoptose erythrozytärer Vorläuferzellen führt (Socolovsky et al., 2001).

STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) bindet mit seiner SH2-Domäne an spezifische phosphorylierte Tyrosinreste (Y343, Y401, Y429, Y431, Y479) des Rezeptors. Hier erfolgt eine Phosphorylierung von STAT5 durch die assoziierte Januskinase 2, sodass STAT5 nach anschließender Ausbildung eines Homodimers und Translokation in den Zellkern als Transkriptionsfaktor aktiv wird (Schulze et al., 2008).

Ein weiterer durch den EPOR aktiverter Signalweg ist die PI3K/AKT-Kaskade (Chateauvieux et al., 2011). Die PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) kann sowohl direkt über die Bindung der regulatorischen Einheit (p85) an einen phosphorylierten Tyrosinrest (Y479) des EPOR als auch indirekt über das Adapterprotein Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) rekrutiert werden (Wojchowski et al., 2010) (Abb. 1). Grb2 bindet gemeinsam mit SOS (son of sevenless) an den Tyrosinrest Y464 des zytosolischen Rezeptorbereichs. Dieser Komplex ist in der Lage, das G-Protein Ras durch einen Austausch von GDP gegen GTP zu aktivieren, was anschließend zu einer Phosphorylierung der PI3K führt (Chateauvieux et al., 2011). Am Ende dieser Kaskade

wird durch die Proteinkinase AKT der Transkriptionsfaktor GATA-1 phosphoryliert und eine verstärkte Transkription von antiapoptotischem Bcl-2 eingeleitet (Zhao et al., 2006). Der Transkriptionsfaktor FoXO3A, dessen Zielgene proapoptotische und antiproliferative Funktionen besitzen, wird hingegen durch Phosphorylierung inhibiert (Bouscary et al., 2003, Lei et al., 2009). Über das Ras-Protein kann neben dem PI3K/AKT- auch der Raf-MEK-ERK-Signalweg aktiviert werden (Haq et al., 2002), welcher u.a. in einer Hemmung der proapoptotischen Caspase 3 resultiert (Abb. 1).

Die negative Regulation des EPO-Signals erfolgt über die aus dem Zytosol rekrutierte Tyrosinphosphatase SHP-1 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1) und die SOCS-1/2-Proteine (suppressor of cytokine signaling protein1/2), die eine Daueraktivierung der genannten Signalkaskaden verhindern (Jegalian et al., 2002; Minoo et al., 2004). Eine weitere negative Kontrolle des EPO-Signals erfolgt durch Ubiquitin-abhängigen Abbau des EPOR und damit dessen verminderte Exposition an der Zelloberfläche (Verdier et al., 2000).

Auf nichterythroiden Zellen besteht der aktivierte EPO-Rezeptor möglicherweise aus einem Heterodimer und setzt sich aus einer einzelnen Rezeptorkette des normalen EPO-Rezeptors und einem CD131-Molekül zusammen (Brines & Cerami et al., 2006). Diese Rezeptoren besitzen eine deutlich niedrigere Affinität zu ihrem Liganden, sodass höhere EPO-Konzentrationen zu ihrer Aktivierung nötig sind als bei Rezeptoren erythroider Zellen (Hand & Brines et al., 2011). Es ist bisher noch nicht ausreichend belegt, ob sich die intrazellulären Signalwege von denen des erythroiden EPO-Rezeptors qualitativ unterscheiden und darüber hinaus ist auch unklar, ob Zellen existieren, die sowohl den homodimeren als auch den heterodimeren EPO-Rezeptor an ihrer Oberfläche exprimieren (Broxmeyer et al., 2013).

2.2. Der Transkriptionsfaktor Egr-1 als Zielstruktur zytokinabhängiger Signalprozesse

Egr-1 (early growth response-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der Ende der 1980er Jahre erstmals in Fibroblasten nachgewiesen wurde (Sukhatme et al., 1988). Da dieser Transkriptionsfaktor parallel in unterschiedlichen Geweben identifiziert und charakterisiert wurde, existieren für Egr-1 folgende Synonyme: NGFI-A (Milbrandt et al., 1987), Krox-24 (Lemaire et al., 1990), ZIF-268 (Christy et al., 1988), ETR-103 (Shimizu et al., 1992) sowie ZENK (Mello et al., 1992).

Egr-1 ist ein Zinkfingerprotein, welches in die Regulation diverser Gene involviert ist und an der Steuerung der Proliferation, Differenzierung und Apoptose unterschiedlicher Zellen

mitwirkt. So wurde beispielsweise eine maßgebliche Rolle von Egr-1 bei der Differenzierung von Makrophagen (Nguyen et al., 1993; Krishnaraju et al., 1995), neuronalen Zellen (Watson et al., 1990; Mellström et al., 1994) und B- bzw. T-Lymphozyten (Beckmann & Wilce et al., 1992) nachgewiesen. Daneben ist Egr-1 an der Regulation der Insulinsynthese in pankreatischen β -Zellen (Eto et al., 2006), an der Steuerung angiogenetischer Prozesse (Khachigian et al., 1995) und beim Wachstum bestimmter Tumoren beteiligt. Auch bei Entzündungsreaktionen wird Egr-1 eine wichtige Rolle zugesprochen. So wurde bei der akuten Pankreatitis von Mäusen eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors nachgewiesen (Gong et al., 2005).

Die Biosynthese von Egr-1 wird durch extrazelluläre Signalmoleküle wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter aber auch toxische Metabolite stimuliert (Thiel et al., 2002).

Egr-1 bindet innerhalb des Zellkerns an eine Konsensus-Struktur, die GC-reiche DNA-Sequenz 5'-GCGGGGCG-3', und beeinflusst dementsprechend die Aktivität von Genen, die derartig strukturierte Promotoren besitzen (Lemaire et al., 1990).

2.2.1. Egr1- Struktur

Das Egr-1-Protein besteht aus 533 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 80-82 kDa (Gashler et al., 1995). Der DNA-bindende Bereich von Egr-1 befindet sich am carboxyterminalen Ende innerhalb der Aminosäuresequenz 331 – 419 und besteht aus drei Zinkfingermotiven, die jeweils aus einer antiparallelen β -Faltblattstruktur und einer α -Helix bestehen (Christy & Nathans, 1989; Pavletich & Pabo, 1991) (Abb. 2).

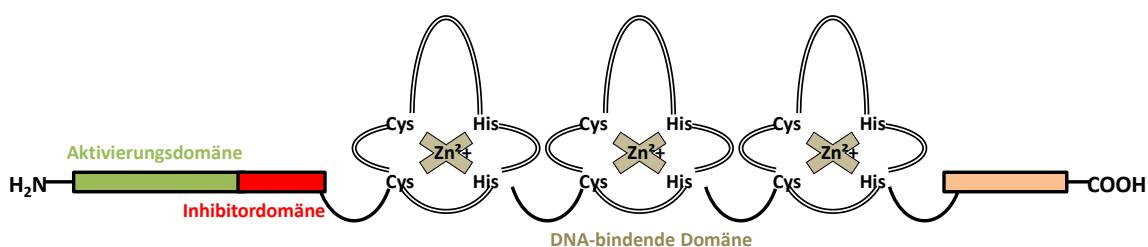


Abb. 2: Struktur-Funktionsbeziehungen im Egr-1-Molekül (nach Mayer et al 2009)

Der transaktivierende Bereich wird von den Aminosäuren 3 - 281 gebildet (Gashler et al., 1993; Thiel et al., 2000). Eine inhibitorische Domäne befindet sich zwischen der transaktivierenden und der DNA-bindenden Domäne. An diesen Bereich können die inhibitorischen Proteine NAB-1 und -2 (NGFI-A binding protein-1/-2) binden, um die konstitutiv transaktivierende Funktion von Egr-1 zu hemmen (Russell et al., 1995; Svaren et al., 1996; Thiel et al., 2000).

2.2.2. Egr-1-Promotor und die Regulation der Egr-1-Expression

Die Analyse des 5'-Bereichs des egr-1-Gens lässt Aufschlüsse über die Regulation der Transkription und der beteiligten Signalwege zu. Der in 5'-Position gelegene Abschnitt des egr-1-Gens besitzt mehrere Bereiche mit räumlich benachbarten regulatorischen Elementen. Auf dem humanen egr-1-Promotor konnten fünf serum response-Elemente (SRE), zwei cAMP response-Elemente (CRE), zwei specificity protein-1-Bindungsstellen (SP-1), eine activator protein-1-Bindungsstellen (AP-1) und eine Egr-1-Bindungsstelle (EBS) identifiziert werden (Sakamoto et al., 1991, Schwachtgen et al., 2000). Innerhalb des egr-1-Promotors der Maus wurde sogar ein sechstes SRE nachgewiesen (Ouelette et al., 1990, Xi et al., 2003).

Der egr-1-Promotor der Ratte wurde bisher noch nicht vollständig analysiert. In einer Arbeit wurde lediglich ein proximaler Abschnitt des Promotors untersucht, auf dem sich zwei SRE und ein CRE befanden (Bernal-Mizrachi et al., 2000). Eine weitere Untersuchung des proximalen Bereichs des egr-1-Promotors der Ratte wies zusätzlich ein zweites CRE nach (Kang et al., 2007).

Die SRE innerhalb des egr-1-Promotors, welche eine hochkonservierte Konsensussequenz aus CC[A/T]₆GG besitzen und auch als CArG-Box bezeichnet werden, sind aufgeteilt in ein distales und ein proximales Cluster (Sakamoto et al., 1991, Mayer et al., 2009). In direkter Nachbarschaft zu den SRE findet man Ets-Bindungsstellen, denen die Konsensussequenz GGAA/T gemein ist und an welche die TCF (ternary complex factors) Elk-1 oder SAP-1/-2 binden können (Bauer et al., 2005). Dies sind MAPK-abhängige Transkriptionsfaktoren, die gemeinsam mit SRF und SRE einen aktivierenden ternären Komplex ausbilden können (Whitmarch et al., 1995).

In humanen Neuroblastomzellen konnte mit Hilfe von Deletionsanalysen eine NO-induzierte Stimulation der Egr-1-Expression nur in Anwesenheit der distalen SRE nachgewiesen werden (Cibelli et al., 2002). Auch in murinen Fibroblasten, die mit IL-1 stimuliert wurden, konnte eine stärkere Beteiligung der distalen SRE bei der egr-1-Promotoraktivierung demonstriert werden (Hoffmann et al., 2008). Die proximalen SRE sind hingegen bei der EGF-vermittelten egr-1-Transkription in humanen Hepatomazellen (Tsai et al., 2001) sowie bei der Thrombin-abhängigen Egr-1-Synthese in humanen Endothelzellen von größerer Bedeutung als das distale Cluster (Wu et al., 2002). Bei TF-1-Zellen, einer humanen erythroleukämischen Zelllinie, die mit GM-CSF stimuliert wurden, konnte durch Deletionsanalysen ebenfalls die Aktivierung des proximalen, nicht aber des distalen SRE-Clusters gezeigt werden (Watanabe et al., 1997).

In Ba/F3-Zellen, einer murinen pro-B-Zelllinie konnte nach Stimulation mit GM-CSF hingegen demonstriert werden, dass sowohl die proximalen als auch die distalen SRE zu einer Steigerung der Egr-1-Expression beitragen (Watanabe et al., 1997).

Es existieren unterschiedliche Signalkaskaden mit dem Potential eine Aktivierung des egr-1-Promotors über SRE auszulösen. Alle Signalwege führen über die MAPK-abhängige Phosphorylierung eines jeweiligen TCF zur Ausbildung eines transaktivierenden ternären Komplexes.

In Ba/F3-Zellen konnte eine ERK1/2-abhängige egr-1-Induktion über SRE gezeigt werden (Watanabe et al., 1997), während in TF-1-Zellen eine p38-MAPK(SAPK2)-vermittelte SRE-Aktivierung nachweisbar war (Lim et al., 1998). In murinen IL-1 stimulierten Fibroblasten konnten Hoffmann und Mitarbeiter 2008 eine Beteiligung des JNK(SAPK1)-Signalwegs bei der SRE-abhängigen Aktivierung des egr-1-Promotors demonstrieren.

Bei Versuchen mit der murinen erythroleukämischen Zelllinie ELM-I-1 wurde durch EPO-Stimulation sowohl eine Aktivierung der ERK1/2 als auch der p38-MAPK festgestellt (Nagata et al., 1998). Interessanterweise wurde hier die Egr-1-Synthese bei Einsatz eines p38-MAPK-Inhibitors (SB 203580) verstärkt, was sich vermutlich durch eine negativ regulierende Wirkung des p38-MAPK-Signalwegs auf den Raf-MEK-ERK-Signalweg erklären lässt (Schäfer et al., 2004).

Eine PKC α -vermittelte Stimulation der Egr-1-Synthese konnte in bovinen Endothelzellen nachgewiesen werden, die gegenüber dauerhaftem hypoxischem Stress exponiert waren (Lo et al., 2001). Hierbei kommt es zu einer Phosphorylierung der PLC, die in der Folge zu einer kalziumabhängigen Aktivierung der PKC α führt. Diese phosphoryliert anschließend Raf-1, wodurch eine Ras-unabhängige Aktivierung des Raf-MEK-ERK-Signalwegs erfolgt (Lo et al., 2001).

Die PKA, welche eine cAMP-abhängige Aktivierung erfährt, ist in der Lage, CREB zu phosphorylieren und somit dessen Homodimerisierung zu ermöglichen. Die transaktivierende Funktion von CREB wird durch Binden eines Homodimers an ein jeweiliges CRE innerhalb des Promotors vermittelt. Die regulierende Funktion der PKA bei der egr-1-Transkription stellt sich allerdings als außerordentlich komplex und zellspezifisch dar.

In Zellen eines Phäochromozytoms der Ratte, die mit Forskolin, einem klassischen Aktivator der Adenylatzyklase, behandelt wurden, zeigte sich eine deutliche Steigerung der Egr-1-Biosynthese (Tai et al., 2001). Jedoch wurde 2002 eine cAMP-abhängige Egr-1-Synthese in humanen Gliomzellen durch Meyer und Mitarbeiter ausgeschlossen. In

Endothelzellen von Ratten wiederum wurde eine cAMP-abhängige Induktion von egr-1 beobachtet (Kimura et al., 2014). In Gefäßmuskelzellen von Ratten wurde eine durch PKA- und EPAC-vermittelte Reduktion der Egr-1-Expression beobachtet (Kimura et al., 2014). Durch Aktivierung von PKA und EPAC kam es dabei zu einer Veränderung des Zytoskeletts, die wahrscheinlich die Translokation von ERK in den Zellkern verhinderte und somit den Raf-MEK-ERK-Signalweg hemmte (Kimura et al., 2014). In menschlichen HEK-293-Zellen, die mit Anisomycin behandelt wurden, konnte man eine Aktivierung beider CRE innerhalb des egr-1-Promotors nachweisen. Hier kam es jedoch zu einer p38-MAPK-abhängigen Phosphorylierung von CREB, das als Heterodimer mit ATF-2 durch Bindung an ein CRE die Egr-1-Synthese induzierte (Rolli et al., 1999).

Neben der bereits erwähnten JNK-vermittelten SRE-abhängigen Promotoraktivierung in IL-1 stimulierten murinen Fibroblasten konnten Hoffmann und Mitarbeiter einen weiteren Mechanismus für die JNK-abhängige Aktivierung des Promotors identifizieren. Die MAPK JNK phosphorylierte dabei den Transkriptionsfaktor c-Jun, welcher über Bindung der distalen AP-1-Bindungsstelle eine Aktivierung des egr-1-Promotors herbeiführte. Auch für die basale Egr-1-Synthese scheint die distale AP1-Bindungsstelle in diesen Zellen von Bedeutung zu sein (Hoffmann et al., 2008).

Eine besondere Rolle bei der egr-1-Regulation nimmt der PI3K-Signalweg ein. Dieser kann durch EPO (Myklebust et al., 2002, Schulze et al., 2008) und EGF (Cabodi et al., 2008) aktiviert werden und führt in der Folge zu einer Aktivierung der AKT (= PKB, Proteinkinase B). Diese bewirkt durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FoXO1, der eine negativ regulierende Funktion auf die Egr-1-Synthese ausübt, dessen Ausschleusung aus dem Zellkern sowie dessen Abbau durch Ubiquitinierung (Cabodi et al., 2008). Somit wird durch Hemmung des inhibierenden Transkriptionsfaktors FoXO1, der für seine Funktion als egr-1-Repressor keiner physischen DNA-Bindung am egr-1-Promotor bedarf (Bouchard et al., 2004), eine Zunahme der egr-1-Transkription bewirkt. Im distalen Bereich des egr-1-Promotors befindet sich eine Egr-1-Bindungsstelle (EBS) mit inhibitorischem Potential, wodurch das Egr-1-Protein seine eigene Transkription beeinflussen kann (Cao et al., 1993).

2.2.3. Egr-1: Funktionelle Bedeutung in der Hämatopoiese

Die murine pro-B-Zelllinie Ba/F3 sowie die humanen erythroleukämischen TF-1-Zellen benötigen hGM-CSF (human granulocyte and macrophage-colony stimulating factor) oder IL-3 für Proliferation und Wachstum. Durch experimentelle Stimulation mit diesen Zytokinen konnte in beiden Zellreihen eine vermehrte Egr-1-Expression nachgewiesen

werden. Über unterschiedliche Regionen der β -Untereinheit des hGMR (hGM-CSF-Rezeptor) werden sowohl der JAK2/STAT5-Signalweg als auch der Raf-MEK-ERK-Signalweg aktiviert. Beide Signalwege führen zu einer Aktivierung der SRE (serum response elements) in Position -56 bis -116 und -235 bis -480 des egr-1-Promotors in Ba/F3-Zellen (Watanabe et al., 1997).

In TF-1-Zellen konnte man hingegen nur eine SRE-Aktivierung in Position -56 bis -116, nicht aber zwischen -235 bis -480 finden (Watanabe et al., 1997). In beiden Zellreihen wird neben dem egr-1-Promotor über die gleichen Signalwege simultan der Promotor von c-fos aktiviert (Sakamoto et al., 1994, Watanabe et al., 1997).

In TF-1-Zellen, denen hGM-CSF entzogen wurde, reduzierte sich die Menge von antiapoptotischem Bcl2 bei gleichzeitiger Erhöhung der Caspase 3-Aktivität, sodass die Zellen apoptotisch wurden (Kolonics et al., 2001). Die Raf-MEK-ERK-abhängige Proliferation scheint hierbei nicht nur durch eine Elk-1 vermittelte Aktivierung der SRE in Position -56 bis -116 des egr-1-Promotors, sondern auch durch eine cAMP-unabhängige Phosphorylierung von CREB (cAMP-response element binding protein) vermittelt zu werden (Kolonics et al., 2001). Zusätzlich konnte eine Erhöhung der DNA-Bindeaktivität der Transkriptionsfaktoren STAT5, AP-1, NFkB und c-myb beobachtet werden. JNK und p38-MAPK sind nicht in die hGM-CSF abhängige TF-1-Zellproliferation involviert (Kolonics et al., 2001).

EPO führt in diesen Zellen zu einer erythroiden Differenzierung, scheint hierfür aber weder den Raf-MEK-ERK- noch den JAK2/STAT5-Signalweg zu verwenden und auch keine aktivierende Funktion am egr-1-Promotor auszuüben (Kolonics et al., 2001). Bei hGM-CSF abhängiger Zellproliferation kommt es über einen ungeklärten Mechanismus zu einer gleichzeitigen Hemmung der EPO-induzierten Differenzierung. C-myb könnte hierbei möglicherweise durch simultane Förderung der Zellproliferation und gleichzeitige Hemmung der Differenzierung als regulierender Transkriptionsfaktor verantwortlich sein (Kolonics et al., 2001).

Bei Ba/F3-Zellen, die natürlicherweise keinen EPOR exprimieren, lässt sich bei ektoper EPOR-Expression eine β -Globin-Produktion als Zeichen erythroider Differenzierung nachweisen (Krosl et al., 1996). Bei Kostimulation dieser Zellen mit IL-3 und EPO scheint die Wirkung von IL-3 zu dominieren, da keine β -Globinsynthese nachweisbar ist (Krosl et al., 1996).

In der murinen erythroleukämischen Zelllinie ELM-I-1 wird die Expression von Egr-1 durch EPO über den JAK2/STAT5-(Schulze et al., 2008) sowie über den Raf-MEK-ERK-

Signalweg vermittelt (Schaefer et al., 2004). Hierbei wird der Tyrosinphosphorylierung an Position Y479 des EPOR durch Versuche mit EPOR-Mutanten eine wichtige Rolle zugeschrieben (Schulze et al., 2008). Dieser spezifische Bereich kann sowohl STAT5 als auch die PI3K aktivieren (Schulze et al., 2008). Eine Aktivierung des Raf-MEK-ERK-Signalwegs wird direkt über den phosphorylierten Tyrosinrest Y464 des EPO-Rezeptors realisiert (Barber et al., 1997).

Dem p38-MAPK-Signalweg, der auch über den EPO-Rezeptor aktiviert werden kann, konnte bei der Epo-abhängigen egr-1-Induktion in ELM-I-1-Zellen keine Beteiligung nachgewiesen werden (Schaefer et al., 2004). Interessanterweise führte die Inkubation der ELM-I-1-Zellen mit SB203580, einem selektiven p38-MAPK-Inhibitor, zu einer Zunahme der egr-1-mRNA, die ähnlich stark war wie bei alleiniger Epo-Stimulation. Bei kombinierter EPO- und SB203580-Stimulation kam es im Verhältnis zu alleiniger Stimulation mit EPO zu einer deutlichen Verstärkung der Egr-1-Expression. Somit kann angenommen werden, dass die p38-MAPK einen negativ regulierenden Effekt auf den Raf-MEK-ERK-Signalweg ausübt (Schaefer et al., 2004). Auch bei anderen Zelltypen konnte dieser Effekt beschrieben werden (Westermarck et al., 2001, Zhang et al., 2001). Eine simultane Promotoraktivierung des egr-1- und des c-fos-Gens konnte in ELM-I-1-Zellen nicht nachgewiesen werden (Schaefer et al., 2004).

Schaefer und Mitarbeiter konnten 2004 außerdem eine negative Korrelation zwischen der Raf-MEK-ERK-abhängigen Egr-1-Synthese und der Bildung von β -Globin nachweisen. So konnte eine Steigerung der β -Globin-Synthese bei Verwendung spezifischer MEK1/2-Inhibitoren und eine dadurch bedingte Reduktion der Egr-1-Synthese beobachtet werden. Egr-1 könnte somit direkt oder indirekt eine inhibierende Wirkung auf die erythroide Differenzierung von ELM-I-1-Zellen ausüben.

Um die Funktion von egr-1 auf Transkriptionsebene besser zu verstehen, wurden ELM-I-1-Zellen mit stabiler Egr-1-Überexpression hergestellt (Schulze et al., 2008). In diesen konnte eine deutliche Zunahme der DNA-Bindungsfähigkeit von STAT5 dargestellt werden, die möglicherweise auf einer Beeinflussung des JAK2/STAT5-Signalwegs durch Egr-1 beruht (Schulze et al., 2008). Im Gegensatz dazu scheint eine erhöhte Egr-1-Produktion einen negativ regulierenden Einfluss auf die DNA-Bindungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors AP-1 zu haben (Schulze et al., 2008). Interessanterweise konnte sich bei den Egr-1-überexprimierenden ELM-I-1-Zellen ein deutlich höheres Potential zur erythroiden Differenzierung nachweisen lassen (Schulze et al., 2008). Dies steht allerdings im Widerspruch zu früheren Ergebnissen, die eine Hemmung der erythroiden

Differenzierung bei EPO-induzierter MAPK-abhängiger egr-1-Stimulation postulieren (Schaefer et al., 2004). Inwieweit bei diesen Beobachtungen nun tatsächlich allein die Hemmung der MAPK-gesteuerten Egr-1-Synthese als Auslöser der erythroiden Differenzierung diente und in welchem Maße andere Signalwege, wie beispielsweise der JAK2/STAT5-Signalweg eine Rolle spielen, bleibt fraglich (Schulze et al., 2008).

Die Überexpression von Egr-1 in murinen myeloiden Progenitorzellen führt zu einer vermehrten Ausdifferenzierung dieser Zellen zu Makrophagen auf Kosten der Ausbildung granulozytärer und erythrozytärer Zelllinien. Hingegen waren Progenitorzellen Egr-1-defizienter Mäuse nicht mehr in der Lage, zu Makrophagen auszudifferenzieren (Krishnaraju et al., 2001).

2.2.4. Egr-1: Funktion in pankreatischen β -Zellen und bei der Diabetogenese

Die Regulation der Transkriptionsstärke des Insulingens erfolgt u.a. über entsprechende Bindungsstellen innerhalb des Promotors. Durch eine Reihe von Arbeiten wurde nachgewiesen, dass unter physiologischen Umständen Egr-1 daran beteiligt ist.

So wurde in β -Zellen der Ratte (INS-1) *in vitro* als auch in murinen β -Zellen *in vivo* ein deutlicher Anstieg der Egr-1-Expression bei einer Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration nachgewiesen (Josefsen et al., 1999, Müller et al., 2012). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die experimentelle Überexpression von Egr-1 in der Zelllinie INS-1 zu einer verstärkten Aktivierung des Insulinpromotors führte. Analog führt die Hemmung der Egr-1-Expression mittels siRNA (small interfering RNA) zu einer deutlichen Abnahme der Transkriptionsaktivität des Insulingens (Eto et al., 2006). Obwohl eine direkte Bindungsstelle für Egr-1 am Insulinpromotor bisher nicht nachgewiesen werden konnte, lässt sich bei Zunahme der intranukleären Egr-1-Konzentration eine Aktivitätssteigerung in einem Bereich des Insulinpromotors zeigen, der Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren PDX-1 (pancreas duodenum homeobox-1) und bHLH (basic Helix-Loop-Helix) besitzt (Eto et al., 2006, Müller et al., 2012). PDX-1 ist ein β -zellspezifischer Transkriptionsfaktor, dem eine große Bedeutung bei der Entwicklung und Differenzierung der Zellen und beim Erhalt der Glukosehomöostase zugeschrieben wird (Melloul 2004).

Die Rolle von egr-1 bei Diabetes mellitus Typ I

Diabetes mellitus Typ I ist eine Autoimmunerkrankung, bei der sich körpereigene Immunzellen gegen Inselzellen des Pankreas richten und dadurch den Untergang insulinproduzierender Zellen induzieren. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung ist bis

heute noch nicht vollkommen verstanden und bisher existieren keine therapeutischen Möglichkeiten, um die Zerstörung des pankreatischen Inselgewebes aufzuhalten.

Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und INF- γ sind wichtige Mediatoren der Apoptose pankreatischer β -Zellen bei DM Typ I (Grunnet et al., 2009). Dies konnte sowohl in Inselzellen von Ratten als auch beim Menschen nachgewiesen werden (Wu et al., 2011). IL-1 β führt in pankreatischen β -Zellen unter anderem zu einer Induktion der iNOS (induzierbare NO-Synthetase) und somit zu erhöhten NO-Spiegeln, welche nachweislich im Zusammenhang mit der IL-1 β -induzierten Apoptose der Inselzellen stehen (Størling et al., 2005, Kacheva et al., 2011). Seine schädigende Funktion übt NO sehr wahrscheinlich durch Veränderung der Syntheserate von Transkriptionfaktoren aus. Die Bildung von Egr-1 wird unter NO-Exposition von INS-1-Zellen nachweislich gehemmt, was zu einer Reduktion der Insulinsynthese und dessen Sekretion führt (Young 2012). Auch *in vivo* konnte an murinem Pankreasgewebe ein Zusammenhang zwischen β -Zellapoptose und verminderter Egr-1-Synthese nachgewiesen werden (Müller et al., 2012).

Egr-1 fördert die Insulinresistenz bei Diabetes mellitus Typ II

Die verminderte Insulinsensitivität bestimmter Gewebe spielt bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ II eine wesentliche Rolle. Auch hier besteht weiterhin ein großer Forschungsbedarf, da die Entstehung dieser Erkrankung nur teilweise geklärt ist und nur begrenzte Therapiemöglichkeiten existieren. Bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ II konnte eine Beteiligung von egr-1 nachgewiesen werden (Abb. 3).

Physiologischerweise kommt es nach Bindung eines Insulinmoleküls an den Rezeptor zu einer Aktivierung des Insulinrezeptorsubstrats (IRS). Dies erfolgt durch eine Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste des IRS und befähigt dieses somit den PI3K-AKT-Signalweg zu induzieren, wodurch eine vermehrte Glukoseaufnahme sowie eine Stimulation der Glykogensynthese bewirkt wird (Wick et al., 2003).

Über eine Phosphorylierung des Ras-Proteins durch den Insulinrezeptor wird neben dem PI3K-AKT-Signalweg gleichzeitig auch der Raf-MEK-ERK-Signalweg rekrutiert. Die Aktivierung des Signalmoleküls ERK1/2 führt zur Phosphorylierung des IRS an spezifischen Serinresten und blockiert damit dessen Signalfunktion (Bard-Chapeau et al., 2005). Zusätzlich stimuliert ERK1/2 die Transkription des egr-1-Gens. Egr-1 bewirkt wiederum durch Stimulation der Geranylgeranyldiphosphatsynthase (GGPPS) eine verstärkte Aktivierbarkeit von Ras durch den Insulinrezeptor (Shen et al., 2011) (Abb. 3).

Bei Patienten mit einer Insulinresistenz wurde eine Überexpression von Egr-1 in pankreatischen β -Zellen nachgewiesen. Experimentell konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* demonstriert werden, dass ein Verlust des egr-1-Gens zu einer Wiederherstellung der Insulinsensitivität führte (Shen et al., 2011).

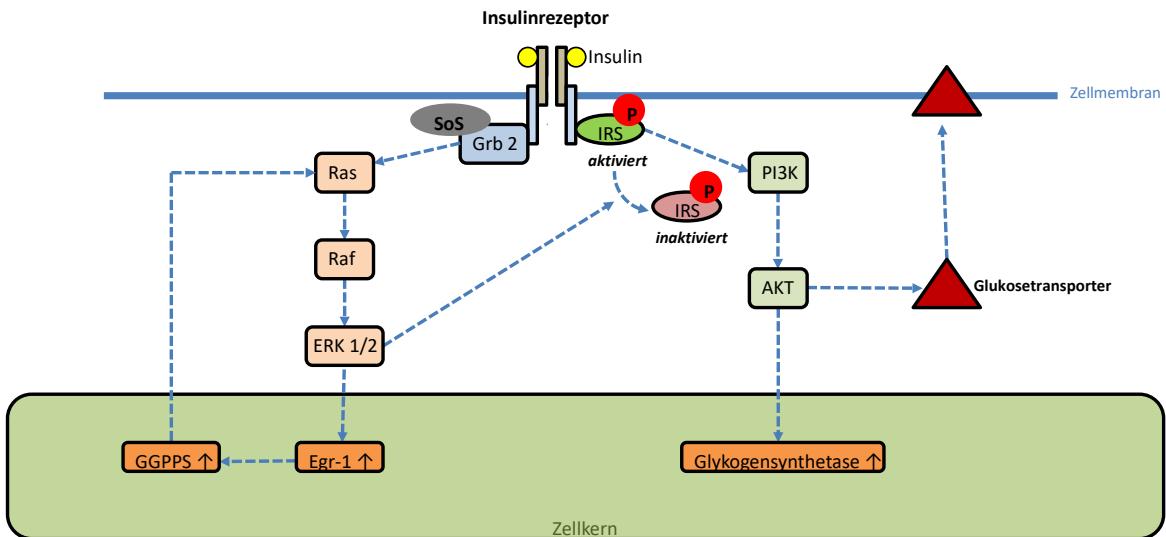


Abb. 3: Egr-1/GGPPS/ERK1/2-Interaktion bei Entstehung der Insulinresistenz (nach Shen et al., 2011)

2.2.5. Egr-1 als Tumorsuppressor

Veränderungen der Egr-1-Expression bzw. -Aktivierung wurden in den vergangenen Jahren auch im Zusammenhang mit der Tumorgenese diskutiert. Sowohl bei Leukämiezellen als auch bei bestimmten Formen des Mammakarzinoms wurde eine Funktion von egr-1 als Tumorsuppressor aufgezeigt (Gibbs et al., 2007).

In Hybridisierungsuntersuchungen leukämisch entarteter Zellen konnten mehrfach Deletionen in einem Bereich des Chromosoms 5q nachgewiesen werden, in dem das egr-1-Gen lokalisiert ist (Fairman et al., 1995, Joslin et al., 2007). Ähnliches gilt auch für bestimmte Formen des Mammakarzinoms. Hier wurde insbesondere in Östrogenrezeptor-negativen Formen eine reduzierte Expression der egr-1-mRNA (Huang et al., 1997) sowie eine Deletion des kurzen Arms von Chromosom 5 (Del 5q) nachgewiesen (Loo et al., 2004). Je niedriger der Differenzierungsgrad der Krebszellen war, desto stärker war auch die Deletion von Chromosom 5q ausgeprägt. Bei den weniger aggressiven Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebsformen hingegen konnte die 5q-Deletion und somit der Verlust von egr-1 nicht nachgewiesen werden (Ronski et al., 2005).

Bei leukämisch entarteten Zellen konnte für mehrere Onkogene eine funktionelle Beteiligung gezeigt werden, dazu gehören E2F-1 und c-myc (Gibbs et al., 2007). Beide Onkogene sind in der Lage, die Differenzierung von leukämischen Zellen an jeweils unterschiedlichen Punkten zu blockieren und eine ungehemmte Zellproliferation auszulösen (Nesbit et al., 1999, Amanullah et al., 2000, Boxer et al., 2001). Eine ektopische Egr-1-Überexpression konnte in leukämischen M1/E2F-1-Zellen, die mit IL-6 behandelt wurden, diese Differenzierungsblockade vollkommen aufheben, sodass die Zellen zu reifen Makrophagen ausdifferenzieren und in einen G0/G1-Arrest übergehen konnten (Gibbs et al., 2007).

Bei M1/MYC-Zellen führte eine ektopische Egr-1-Bildung ebenfalls zu einer Ausdifferenzierung der Makrophagen, nicht jedoch zu einem Stop der erhöhten Proliferationsrate (Shafarenko et al., 2005). Die geschilderten Ergebnisse machen das Potential von egr-1 als Tumorsuppressoren deutlich.

3. Zielsetzung

Der Transkriptionsfaktor Egr-1 wird in menschlichen Geweben ubiquitär exprimiert. Nach Zytokinstimulation kommt es innerhalb weniger Minuten zu einem Anstieg der Egr-1-Konzentration innerhalb des Zellkerns. Egr-1 beeinflusst anschließend die Expression mehrerer Gene und reguliert multiple zelluläre Prozesse. Unter anderem fungiert Egr-1 als Mediator pro- und antiapoptotischer Zellsignale sowie bei der Regulation proliferativer Prozesse und der Zelldifferenzierung. Trotz des schon umfangreichen Wissens über die biologische Funktion des Transkriptionsfaktors sind noch viele Fragen zur Regulation seiner Expression und der dabei beteiligten Signalereignisse offen.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb Struktur und Funktion des egr-1-Promotors der Ratte in Zellen analysiert, die nach EPO-Stimulation mit einer schnellen Expression von Egr-1 reagieren. Darüber hinaus wird das Ziel verfolgt, Egr-1-abhängige Gene in EPO-sensitiven Zellen zu identifizieren.

Folgende Fragen stehen im Vordergrund der Untersuchungen:

- I. Welche potentiell regulatorischen Elemente sind im egr-1-Promotor der Ratte nachweisbar?
- II. Welche Bedeutung haben die entsprechenden Elemente für die Induktion/Repression des Gens?
- III. Welche EPO-Rezeptor-abhängigen Signalwege sind an der Aktivierung oder Inhibition des egr-1-Promotors beteiligt?
- IV. Inwieweit unterliegt die egr-1-Promotoraktivität autoregulativen Prozessen?
- V. Welche Rolle spielt Egr-1 für die Regulation der Kandidatengene TGF- β , PDX-1 und PTEN?

4. Material und Methoden

4.1. Zelllinien

4.1.1. Hämatopoetische Zellen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden Ba/F3-Zellen verwendet. Diese aus dem peripheren Blut von BALB/c-Mäusen isolierte Zelllinie mit Pro-B-Zell-Charakteristik (Palacios et al., 1984) benötigt für ihr Wachstum Interleukin-3. Um EPO-abhängige Veränderungen in dieser hämatopoetischen Zelllinie zu studieren, wurde der murine EPO-Rezeptor in diesen Zellen stabil überexprimiert und ein Subklon etabliert, der nach EPO-Kontakt mit entsprechenden rezeptorspezifischen Signaleignissen reagiert (Ba/F3-EPOR).

4.2. Zellkulturtechniken

4.2.1. Zellkultur

Die oben genannten Zelllinien standen in tiefgefrorenem Zustand (- 150°C) zur Verfügung (Aliquots zu 5 x 10⁶ Zellen). Bei Bedarf wurden Aliquots im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 5ml Aufbaumedium (RPMI1640, 20% FCS) überführt, bei 1000 Umdrehungen/min. abzentrifugiert und in RPMI 1640 Medium (Biochrom) zusammen mit 10% (v/v) FCS sowie rekombinantem murinen IL-3 (20pmol) gehalten. Als Antibiotikum wurde Penicillin (100U/ml, Gibco) und Streptomycin (100µg/ml, Gibco) zugesetzt. Für die Haltung der Zellen wurden diese in einer Dichte von 1,5 x 10⁵ Zellen/ml kultiviert und täglich in frischem Medium verdünnt.

4.2.2. Inhibitoren

Zur Analyse der funktionellen Beteiligung von Signalwegen wurden die Zellen Inhibitoren ausgesetzt, um definierte Signalmoleküle gezielt zu blockieren. Die Inhibitoren H-89 (PKA), Ly294002 (PI3-Kinase), PD98059 (MEK1/2), UO126 (MEK1/2), SB203580 (p38-MAPK) wurden von der Fa. Cell Signaling als Festsubstanz bezogen und mit DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Entsprechende Aliquots wurden vor dem Einsatz in der Zellkultur ebenfalls mit DMSO verdünnt und ein potentieller Einfluss des Lösungsmittels durch Kontrollen mit DMSO ausgeschlossen. Die Inhibitoren wurden eine Stunde vor Stimulation der Zellen zugesetzt.

4.2.3. Zellgewinnung

Für Experimente wurden die Ba/F3-Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und vier Stunden lang ohne Wachstumsfaktoren (Serum, IL-3) in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml kultiviert, um für die Analyse einer nachfolgenden EPO-Stimulation andere Faktoren möglichst auszuschließen.

4.2.4. Zellzählung

Die Zählung der Zellen erfolgte lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer improved). Es wurden zunächst $50\mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $50\mu\text{l}$ Trypanblau gemischt, um die Vitalität der Zellen besser beurteilen zu können. Da die Zellmembran durchlässig ist für Trypanblau, verfärbten sich avitale Zellen blau.. Die Zellen wurden unter das Deckglas auf die Zählkammer pipettiert, bis diese vollständig gefüllt war. Das Volumen einer Zählkammer beträgt $0,1\mu\text{l}$.

Mit einer geringen Vergrößerung wurde zunächst die gleichmäßige Verteilung der Zellen auf alle vier großen Quadrate überprüft, dann wurden die Zellen eines großen Quadrates gezählt. Um die Zellzahl pro ml zu errechnen, wurden die gezählten Zellen mit 10^4 multipliziert.

4.2.5. Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen in 1 bis 2 ml Einfrierlösung (FKS, 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen (2 ml, Greiner) überführt, in Kryoboxen (Nalgene) auf -70°C abgekühlt und bei -150°C aufbewahrt.

4.2.6. Transiente Transfektion (Elektroporation)

Bei der transienten Transfektion wird die DNA in den Zellkern eingeführt, aber nicht in das Chromosom integriert. Die hohe Zahl der in der Zelle vorhandenen Kopien ermöglicht eine starke Expression des jeweiligen Gens. Die Transkription des Gens kann anschließend innerhalb von 4 bis 48 Stunden analysiert werden.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden die Zellen in serumfreiem Medium gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen / 0,8 ml in Elektroporations-Küvetten (0,4 cm Elektrodenabstand, BioRad) überführt. Nach dem Hinzufügen von $15 \mu\text{g}$ der zu transfizierenden cDNA bzw. Reporterplasmid-DNA, folgte eine zehnminütige Vorinkubation dieser Suspension bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen bei 350 V und $960 \mu\text{F}$ einem elektrischen Impuls ausgesetzt (Gene Pulser und Capitance Extender,

BIO-RAD). Im Anschluss an die Elektroporation erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen für 10 min bei Raumtemperatur, wonach sie in Kulturmedium überführt und unter den jeweiligen Kulturbedingungen gehalten wurden.

4.2.7. Reportergenassay

Die in die Zellen eingeschleusten DNA-Konstrukte enthalten Reportergene, die von den zu untersuchenden DNA-Elementen kontrolliert werden. Die Höhe ihrer Expression liefert Aussagen zur Stärke der Promotoren. Das hier verwendete Reportergensystem basiert auf dem Nachweis der Luciferaseaktivität. Die Leuchtkäfer-Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Freisetzung eines Photons:



Bei dem verwendeten System (Promega) bleibt das Lichtsignal für mehrere Minuten konstant und kann mit einem Luminometer quantifiziert werden. Transient transfizierte Zellen (siehe 4.2.5.) wurden für 4 Stunden inkubiert, anschließend durch Zentrifugation pelletiert, in jeweils 50 μ l Lysepuffer (Promega) auf Eis lysiert und sofort bei -20°C eingefroren. Für den Luciferaseassay wurden die Proben kurz auf Eis aufgetaut, eine Minute lang zentrifugiert und 10 μ l des klaren Überstands mit 50 μ l Luciferase-Substratlösung vermischt. Die Messung der Lichtemission erfolgte unmittelbar danach für 20 Sekunden am Luminometer (MiniLumat LB9506, Berthold).

4.3. Nukleinsäure-Isolation/Modifikation/Klonierung

4.3.1. RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen erfolgte mit dem Reagenz Trizol® (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Für eine RNA-Präparation wurden 5×10^6 Zellen in 1 ml Trizol® suspendiert. Nach der Extraktion der RNA wurde diese durch Zugabe von Isopropanol ausgefällt, nach wiederholtem Waschen mit 70%igem Ethanol getrocknet und in RNase-freiem Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit einem Photospektrometer (Ultrospec 2100 pro®Pharmacia Biotec). Aus der oben genannten Zellzahl konnten etwa 100-300 µg RNA isoliert werden.

Für die cDNA-Synthese kamen Chemikalien und Enzyme der Firma Promega® zum Einsatz. Dafür wurden 1µg der präparierten Gesamt-RNA mit 2µl Oligo-dT Primer (50µM) gemischt, mit nucleasefreiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt, 10 min bei 70°C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 4 µl 5x M-MLV Reaction Buffer, 1 µl dNTP Mix (10 mM), 0,5 µl RNase Inhibitor (40U/µl) sowie 1 µl M-MLV-RT (200 U/µl) gemischt, mit dem RNA-Primer-Mix versetzt und 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Synthetisierte cDNAs wurden bei -20°C gelagert.

4.3.2. Isolierung von genomischer DNA

Zur Gewinnung von genomischer DNA wurde frisches, antikoaguliertes Blut aus Ratten gewonnen und mit Hilfe des E.Z.N.A. Blood DNA Kit der Firma Peqlab nach Angaben des Herstellers DNA präpariert. Für eine Präparation kamen 250 µl Blut zum Einsatz. Die DNA wurde photometrisch quantifiziert, durch Agaroseelektrophorese geprüft und bei -20°C gelagert.

4.3.3. Primer

Alle benötigten Primer für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit dem Programm Primer-BLAST (Ye et al., 2012) abgeleitet und bei der Firma Biotez Berlin Buch GmbH in HPLC-reiner Qualität bezogen. Zum Teil erfolgte bereits während der Synthese der Primer das Anfügen von Restriktionsschnittstellen an die zu amplifizierenden Sequenzen, um eine direkte Klonierung in Vektoren zu ermöglichen.

In der folgenden Tabelle sind die für die Klonierung des Promotors bzw. verkürzter Promotorfragmente eingesetzten Primer zusammengefasst.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Funktion
Egr1prom(+)	TCTCCCTTGGGTTGCTCCGAG	Amplifikation gesamter regulatorischer Bereich
Egr1prom(-)	GTTCCTCGGTGCTGCCGGAA	Amplifikation gesamter regulatorischer Bereich
Egr1prom _686(+)	AGGCCACTGCCGCTGTTCCA	Primer (upstream) zur Klonierung Fragment 686bp
Egr1prom _686(-)	TTCCGGCAGCACCGAGGAAC	Primer (downstream) zur Klonierung Fragmente 686, 889 und 1172bp
Egr1prom _889(+)	TCCGGGTTGGAACCAAGGAGG	Primer (upstream) zur Klonierung Fragment 889bp
Egr1prom _1172(+)	GTCAGGGCCCCGCCTCTCC	Primer (upstream) zur Klonierung Fragment 1172bp

Tab. 1: Primer zur Klonierung des *egr-1*-Promotors und verkürzter Promotorfragmente

4.3.4. PCR und RT-PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann in relativ kurzer Zeit ein DNA-Abschnitt gezielt *in vitro* vervielfältigt werden. Der Prozess besteht aus mehreren hintereinander ablaufenden Schritten, bei denen die Optimierung der Reaktionsparameter für die Erzielung optimaler Amplifikationsergebnisse entscheidend ist. Zunächst wird die DNA thermisch in ihre Einzelstränge gespalten (96°C). Danach binden dem Reaktionsansatz zugefügte Primer bei einer von der Sequenz abhängigen Temperatur (ca. 55-60°C) an ihre komplementäre DNA-Sequenz. Als Zielmolekül wird in Abhängigkeit vom Experiment genomische DNA, Plasmid-DNA oder cDNA eingesetzt. Nach Bindung der Primer (Annealing) beginnt eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) an den Primern mit der Synthese des Doppelstrangs mit Hilfe zugesetzter Desoxyribonukleotidtriphosphate.

Bei dem in Tabelle 2 aufgeführten PCR-Zyklus fand die DNA-Synthese bei einer für das Enzym optimalen Temperatur von 72°C statt. Nach Beendigung des Zyklus wurde dieser 35 Mal wiederholt, um eine ausreichende Menge an DNA herzustellen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden PCR-Chemikalien der Firma Promega eingesetzt. Die Produkte der Amplifikation wurden durch Agaroseelektrophorese analysiert.

Dauer	Temperatur	Prozess
2 Minuten	94°C	Denaturierung
30 Sekunden	55-60°C	Annealing
1 Minute	72°C	Polymerisation
3 Minuten	72°C	abschließendes Auffüllen der PCR- Produkte

Tab. 2: Reaktionsbedingungen der PCR-Zyklen

Für die Amplifikation von Sequenzen aus cDNA (Herstellung siehe 4.3.1.) wurde jeweils 1 µl der cDNA-Präparation eingesetzt. Dabei kamen für den Nachweis der untersuchten Ziel-mRNAs die folgenden Primer zum Einsatz:

GAPDH

upstream 5'-CCCTGCATCCACTGGTGCTGCC -3'
downstream 5'-CATTGAGAGCAATGCCAGCCC -3'
PCR-Produkt: 292bp

PDX-1

upstream 5'-TAGTGAGGAGCAGTACTACG-3'
downstream 5'-AGAATTCCCTCTCCAGCTCC-3'
PCR-Produkt: 490bp

egr-1

upstream: 5'-GGGAGAGGCAGGAAAGACATAA-3'
downstream: 5'-TCTGAGATCTTCCATCTGACCTAAGA-3'
PCR-Produkt: 87bp

PTEN

upstream: 5'-GGCACTGCTGTTCACAAAGA-3'
downstream: 5'-GAATAAGGGTTGCCAGACA-3'
PCR-Produkt: 501bp

TGF-β

upstream: 5'-GACTCTCCACCTGCAAGACC-3'
downstream: 5'-AGACAGCCACTCAGGCGTAT-3'
PCR-Produkt: 506bp

4.3.5. Restriktionsanalyse von DNA-Sequenzen

Restriktionsendonukleasen werden zur gezielten Manipulation und Analyse von DNA-Sequenzen eingesetzt. Hier wurden diese bakteriellen Enzyme verwendet, um bei der Herstellung von Reportergenvektoren Teilversequenzen klonierter PCR-Produkte durch Restriktionsschnitte zu präparieren bzw. die Integrität von Vektoren zu analysieren.

In der Regel wurden Restriktionsansätze mit 1 µg DNA und 10 Units sowie dem vom Hersteller empfohlenen Puffer hergestellt, für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit Hilfe von Agarose-Elektrophorese überprüft.

4.3.6. Klonierung von DNA

4.3.6.1. Klonierung von PCR-Produkten

Für eine effektive und schnelle Klonierung von PCR-Fragmenten wurde die Tatsache genutzt, dass die Taq-Polymerase am 3'-Ende der PCR-Produkte durch eine terminale Transferase-Aktivität einen Desoxyadenosinrest anlagert. Um die Effizienz des Verfahrens abzusichern, wurden die gewonnenen PCR-Fragmente vor der Ligation noch einmal mit Taq-Polymerase behandelt.

Bezeichnung	Dosis
PCR-Produkt	10µl
Taq-Polymerase-Mastermix(Promega)	10µl
→ Inkubation: 10 Minuten bei 72°C	

Tab. 3: PCR-Produkt/ Taq-Polymerase-Reaktionsansatz

Im hier verwendeten „TOPO TA Cloning-Kit“ (Invitrogen) werden pCR2.1-TOPO-Vektoren eingesetzt, die ihrerseits 3'-Thymidin-Überhänge besitzen und als Komplex mit der TopoisomeraseI vorliegen. Diese bindet an spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA und spaltet die Phosphodiesterbindung in einem Strang nach der Sequenz 5'-CCCTT. Die Energie wird dabei gespeichert, in dem eine kovalente Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Stranges und einem Tyrosinrest der Topoisomerase I ausgebildet wird (Abb. 4). Diese Bindung kann durch das 5'-OH des gespaltenen Stranges attackiert werden, wodurch die Phosphodiesterbindung neu entsteht und die Topoisomerase freigesetzt wird.

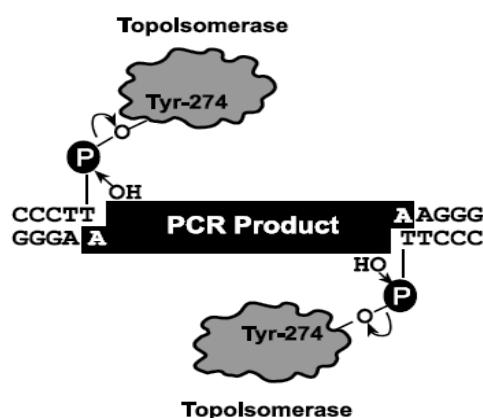


Abb. 4: Prinzip der Klonierung von PCR-Fragmenten mit TOPO-TA-Vektoren

Für den Einbau der PCR-Fragmente wurde nach Angaben des Herstellers folgendermaßen ligiert:

Bezeichnung	Dosis
Ansatz aus PCR-Produkt und Taq-Polymerase	4 μ l
Salzlösung	1 μ l
TOPO-Vektor	1 μ l
→ Inkubation: 5 Minuten	

Tab. 4: Ligationsansatz von PCR-Produkt und TOPO-Vektor

TOPO-TA-Vektoren sind mit Kanamycin- und Ampicillinresistenz-Genen ausgestattet, um eine effektive Selektion zu ermöglichen. Darüber hinaus besitzt der TOPO-Vektor ein β -Lactamase-Gen, welches Bakterien, die einen leeren Vektor aufgenommen haben, unter Zusatz eines Substrats einen blauen Farbstoff bilden lässt. Bakterien, die einen rekombinanten Vektor beinhalten, bilden diesen Farbstoff nicht. Um zu überprüfen, ob der Vektor auch tatsächlich das gewünschte Fragment aufgenommen hat, flankieren EcoRI-Enzymschnittstellen den Einbaubereich der PCR-Produkte. Der Klonierungserfolg wurde durch Agaroseelektrophorese EcoRI-gespaltener Plasmid-DNA überprüft.

4.3.6.2. Klonierung von Restriktionsfragmenten

DNA-Fragmente, die wie in 4.3.5. dargestellt mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen präpariert wurden, können in andere Vektoren mit kompatiblen Schnittstellen ligiert werden. Für die Herstellung von Reportergenvektoren wurde der pGK3-Vektor-Basic (Promega) verwendet. Geeignete Fragmente aus Restriktionsverdau wurden nach Elution aus Agarosegelen in einem molaren Verhältnis von Fragment zu Vektor von etwa 2.5:1 gemischt und mit einer T4-DNA-Ligase (Promega) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Ligationsgemisch wurde anschließend in kompetente E.coli-Zellen transformiert (siehe 4.3.7.).

Der im Folgenden dargestellte Ansatz wurde zur Klonierung der Restriktionsfragmente in den pGK3-Vektor verwendet.

Bezeichnung	Dosis
pGK3-Vektor	1-2 μ l
Restriktionsfragment	1-2 μ l
Rapid Ligation Buffer 2x (Promega)	5 μ l
T4-DNA-Ligase (Promega)	1 μ l

Tab. 5: Ansatz zur Klonierung der Restriktionsfragmente in Reportergenvektor

4.3.7. Transfer von Plasmid-Vektoren in kompetente E.coli-Bakterien

Für den Transfer von Plasmiden in Bakterienzellen wurden kompetente E.coli-Bakterien aus dem „TOP10 One Shot-Kit“ (Invitrogen) verwendet. Aliquots dieser Bakterien wurden bei -80°C gelagert und zunächst auf Eis aufgetaut. Den aufgetauten Bakterien wurden 2µl der Ligationsansätze (siehe 4.3.6) oder bis zu 100 ng Plasmid-DNA hinzugefügt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 42°C 30 Sekunden lang einem Hitzeschock unterzogen, 2 Minuten auf Eis gekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 250µl SOC-Medium. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien auf ampicillinhaltige LB-Agar-Platten ausplattiert (je 125 µl) und über Nacht bis zur Bildung von deutlich sichtbaren Bakterienkolonien bei 37°C inkubiert.

4.3.8. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auf trennung von DNA-Fragmenten mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Die Agarosekonzentration kann in Abhängigkeit von der Größe aufzutrennender Fragmente variiert werden. Große Fragmente werden in Gelen mit niedrigen Agarosekonzentrationen aufgetrennt, kleine Fragmente in entsprechend hoch konzentrierten Gelen. Die Agarose (GIBCO-RBL) wird mit einem Puffer (0,5x TBE) aufgekocht, mit Ethidiumbromid (0,3µg/ml) versetzt, in entsprechende Gelträger gegossen und nach der Polymerisation des Gels in eine mit 0,5xTBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht. DNA-Ansätze werden mit einem 10fach konzentrierten Ladepuffer (Glycerin 40% w/v Sucrose; 0,25% Bromphenolblau) gemischt (Gesamtvolumen 20 µl), auf das Gel aufgetragen und bei ca. 100 mV aufgetrennt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wird zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker aufgebracht. Die DNA wird nach Beendigung der Elektrophorese im UV-Licht (254nm) sichtbar gemacht.

4.3.9. Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die bei der Agarosegelelektrophorese entstehenden Banden können unmittelbar zur Präparation der DNA-Fragmente genutzt werden. Dazu werden die Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und anschließend mit Hilfe eines Gelextraktions-Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die DNA-Fragmente wurden in 50µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Zur Abschätzung der Menge bzw. Überprüfung der Integrität der Fragmente wurde ein Aliquot der präparierten DNA erneut einer Elektrophorese unterzogen.

4.3.10. Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen

4.3.10.1. Mini-Präparation

Die auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten gewachsenen E.coli-Bakterienkolonien wurden unter sterilen Bedingungen in je 2ml LB-Flüssigkultur (Ampicillin) überführt und für 6 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienkultur wurde anschließend in ein 1,5ml Eppendorfröhrchen überführt und 1 Minute bei 14.000 U/min abzentrifugiert. Die Präparation der Plasmide aus dem Bakterienpellet erfolgte unter Einsatz des Invisorb Spin Plasmid Mini Kit (Invitek) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmide wurden in je 50µl Elutionspuffer eluiert und bei -20°C gelagert.

4.3.10.2. Plasmid-Maxi-Präparation

Um größere Mengen von Plasmiden mit hoher Reinheit und Qualität für Transfektionsexperimente zu präparieren, wurden Bakterienkulturen mit höheren Volumina eingesetzt und entsprechend erhöhte Mengen Plasmid-DNA hergestellt.

Hierfür wurden jeweils 400ml LB-Flüssigmedium verwendet und auf einem Thermoschüttler für 12 bis 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Pelletierung der Bakterienzellen durch 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 6000 x g. Die weitere Präparation wurde mit dem NucleoBond® Xtra Maxi Plus EF-Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in ca. 500µl nucleasefreiem Wasser oder TE-Puffer resuspendiert und photometrisch quantifiziert.

4.3.11. Sequenzanalyse

Alle hergestellten Konstrukte wurden durch Sequenzierung auf Basis der Didesoxy-Methode verifiziert. Hierbei werden 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) verwendet, die nach Einbau aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe sofort zum Abbruch der Polymerisation in der jeweiligen Reaktion führen.

Für die Sequenzierreaktion wurden ca. 100 ng des jeweiligen Plasmids eingesetzt. Zur Durchführung der Kettenabbruch-Synthese kam der Genome Lab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter) bei folgenden Reaktionsbedingungen zum Einsatz:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Bedeutung
1	96°C	1 min	Initiale Denaturierung
25	96°C	20 s	Denaturierung
	55°C	20 s	Annealing
	60°C	3 min	Elongation
1	4°C	∞	Aufbewahrung

Tab. 6: Zyklische Reaktionsfolge im Thermocycler

Anschließend erfolgte die Aufreinigung der synthetisierten DNA-Fragmente unter Verwendung paramagnetischer Beads (CleanSEQ), die aufgrund einer speziellen Beschichtung in Gegenwart von Salzen und Ethanol eine hohe Affinität zur DNA besitzen. Nach Abtrennung von Verunreinigungen wurden die gebundenen DNA-Fragmente von den Beads eluiert, ausgefällt und mit 40 µl Sample Loading Solution vermischt. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mit dem Genome Lab GeXP-Sequencer (Beckman Coulter).

4.4. Chromatin-Präzipitationsassay (ChIP)

Der Chromatin-Präzipitationsassay wird zur Analyse von DNA/Protein-Interaktionen eingesetzt (Kuo & Allis et al., 1999). Im Gegensatz zu anderen Verfahren wird hier die Interaktion *in vivo* untersucht, vor allem die tatsächlich existierende Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA-Elemente in lebenden Zellen. Dazu wird diese Bindung durch Fixierung mit Formaldehyd in lebenden Zellen konserviert und das Chromatin nach Zellyse durch enzymatischen Verdau fragmentiert.

Danach werden Antikörper gegen das gesuchte DNA-bindende Protein benutzt, um die entsprechenden Chromatinfragmente zu isolieren und ihre Identität durch spezifische PCR-Amplifikation abzuklären. Alternativ ist es möglich, durch den Einsatz von Antikörpern gegen posttranslational modifiziertes Histon Aussagen zum Aktivitätsstatus bestimmter DNA-Abschnitte zu gewinnen.

Für die hier durchgeführten Experimente wurden Ba/F3-EPOR-Zellen für 4 Stunden ohne IL-3 gehalten und dann je 5×10^6 Zellen mit 5 Units/ml EPO für 10 Minuten stimuliert oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Die Quervernetzung (DNA/Protein) erfolgte für weitere 10 Minuten mit Formaldehyd (37% Formaldehyd; 1% Endkonzentration im Zellkulturmedium ohne Serum), die Reaktion wurde mit 250mM Glycin beendet. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH7.4) wurden die Zellen in Eppendorfgefäßten durch Zentrifugation pelletiert (700 x g, 5 min.), in 1ml

Lysepuffer [5mM PIPES (KOH) pH8.0; 85mM KCl; 0.5% NP40] 10 min. auf Eis lysiert und 5 min. bei 8000 x g abzentrifugiert. Das entstehende Pellet enthält die Zellkerne, die anschließend durch Zugabe von 400 μ l Kernlysepuffer (50mM Tris pH8.1; 10mM EDTA; 1% SDS) für 10 min. bei 4°C lysiert wurden. Danach wurde das freigesetzte Chromatin durch Zugabe einer Nuclease (Micrococcal Nuclease, NEB) und Calciumchlorid (5mM) für 20 min. bei 37°C verdaut und die Reaktion mit 100 μ l 0.5 M EDTA beendet. Durch eine nachfolgende Zentrifugation bei 16.000 x g wurden Bestandteile der Kernhülle und große Chromatinfragmente abgetrennt. Der erhaltene Überstand wurde mit ChIP-Puffer 1:5 verdünnt, mit 80 μ l ProteinA-Sepharose versetzt und für 30 min. bei 4°C zur Vorreinigung der DNA-Fragmente geschüttelt. Aus dem nach Zentrifugation entstehenden Überstand wurden 3 gleich große Fraktionen gebildet, von denen eine Fraktion als Positivkontrolle für spätere PCR-Experimente verwendet wurde. Die beiden anderen Fraktionen wurden mit bzw. ohne Antikörper (2 μ g) über Nacht bei 4°C geschüttelt. Die nachfolgende Präzipitation mit ProteinA-Sepharose (80 μ l) wurde mit allen drei Fraktionen ausgeführt. Nach einstündiger Inkubation (Raumtemperatur) wurden die Komplexe pelletiert und jeweils für 5 min. mit Niedrig-Salz-Puffer (0.1% SDS; 20 mM Tris pH8.1; 1% Triton X100; 150mM NaCl, 2mM EDTA), Hoch-Salz-Puffer (0.1% SDS; 20 mM Tris pH8.1; 1% Triton X100; 500mM NaCl, 2mM EDTA), Lithiumchlorid-Waschpuffer (0.25 M LiCl, 1mM EDTA, 1% NP40, 10mM Tris pH 8.0, 1% Desoxycholat) und TE-Puffer (10mM Tris pH8.0; 1mM EDTA) gewaschen. Zur Ablösung der Immunkomplexe wurden die ProteinA-Sepharose-Pellets zweimal für je 15 min. mit 250 μ l Elutionspuffer (1% SDS, 0.1M NaHCO3) geschüttelt und die durch Zentrifugation gewonnenen Überstände vereinigt. In den Überständen wurde anschließend eine RNase-Behandlung [1 μ l RNaseA (10mg/ml), 20 μ l 5M NaCl, 4h 56 °C] durchgeführt und danach die DNA-Fragmente mit 400 μ l Isopropanol bei -20 °C über Nacht ausgefällt. Abschließend wurde die DNA nach einer Waschung mit 70%igem Ethanol in 200 μ l TE-Puffer (pH6.5) aufgenommen, mit 5 μ l Proteinase K (20mg/ml) versetzt und 1 Stunde lang zur Ablösung der Proteine von der DNA bei 45°C inkubiert. Die Reinigung der erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte dann mit dem Qiaquick PCR Purification Kit nach Vorschrift des Herstellers. Die Fragmente wurden in 50 μ l nukleasefreiem Wasser aufgenommen und in nachfolgenden PCR-Experimenten zum Nachweis spezifischer Gensequenzen eingesetzt. Dazu kamen abgeleitete Primersequenzen zum Einsatz, die flankierend zu den Egr-1-Bindungsstellen in regulatorischen Bereichen potentieller Egr-1-Zielgene liegen. Folgende Primer wurden eingesetzt:

PDX-1

upstream 5'-CTTAGCTGGTCAGTGACAGA-3'
downstream 5'-GGTTAACAAACATCAGGCTGA-3'
PCR-Produkt: 183bp

egr-1

upstream: 5'-TAGAACCCCGGCCTGACTC-3'
downstream: 5'-CCTCCTTGGTCCCAACCC-3'
PCR-Produkt: 178bp

PTEN

upstream: 5'-CCCAGCCTGTTGTACCTTG-3'
downstream: 5'-AAGAGTCCCGCCACATCAC-3'
PCR-Produkt: 272bp

TGF- β

upstream: 5'-GCCCACGCTAAGATGAAGAC-3'
downstream: 5'-CCTGGCTGTCTGGAGGAT-3'
PCR-Produkt: 195bp

4.5. Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Daten wurden statistische Verfahren eingesetzt und bei Bedarf entsprechende Signifikanzberechnungen angeschlossen. Prinzipiell wurden die Experimente mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt und Mittelwerte bzw. Standardabweichungen berechnet. Zur statistischen Beurteilung wurden mit Hilfe des gepaarten t-Tests Mittelwerte verglichen und gegebenenfalls das Signifikanzniveau in den Abbildungen angegeben.

5. Ergebnisse

5.1. EPO-abhängige Induktion des egr-1-Gens

Die schnelle Aktivierung des egr-1-Gens durch EPO-Rezeptor-abhängige Signale wurde in der Arbeitsgruppe an Ba/F3-Zellen mit ektop exprimiertem EGF/EPO-Hybridrezeptor bereits nachgewiesen (Schulze et al., 2008). Für die in dieser Arbeit vorgesehenen Experimente wurden Zellen mit einer stabilen Überexpression des Erythropoietin-Rezeptors (Ba/F3-EPOR) verwendet. Expressionsveränderungen des egr-1-Gens wurden nach Stimulation der Zellen mit Erythropoietin durch Isolierung der Gesamt-RNA und anschließende RT-PCR-Analyse untersucht (Abb. 5). In den Zellen kommt es zu einer schnellen, transienten Hochregulation der egr-1-mRNA. Als Kontrolle dient die Amplifikation eines GAPDH-Fragmentes bzw. Reaktionen ohne Reverse-Transkriptase. Diese Daten machen eine Funktion als „immediate early“-Gen im EPO-abhängigen Signaltransfer wahrscheinlich.

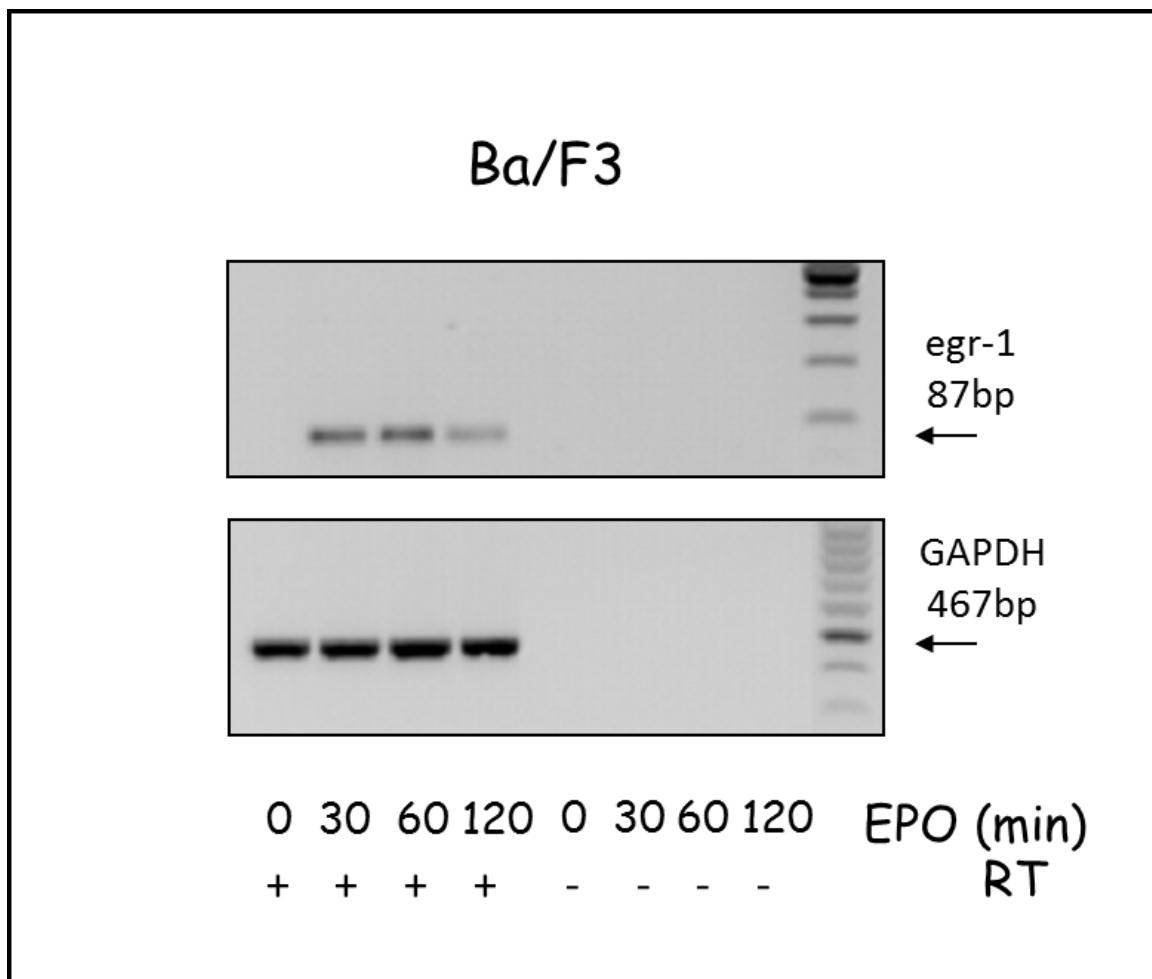


Abb. 5: Induktion des egr-1-Gens durch EPO

5.2. Klonierung des egr-1-Promotors aus genomischer DNA der Ratte

5.2.1. Amplifikation der egr-1-Promotor-Sequenz und Klonierung des PCR-Produktes

Im Abschnitt 5.1. wurde gezeigt, dass die Exposition von hämatopoetischen Zellen mit EPO zu einer schnellen Induktion des egr-1-Gens führt. Zur näheren Analyse des molekularen Hintergrunds dieses Phänomens wurde die Klonierung regulatorischer Regionen des Gens im 5'-Bereich der kodierenden Sequenz aus genomischer DNA der Ratte durchgeführt. Für die Amplifikation der entsprechenden Sequenzen wurde zunächst DNA aus dem Blut adulter Ratten isoliert und anschließend als Zielmolekül für PCR-Versuche eingesetzt.

In Abb. 6 sind die Positionen der verwendeten PCR-Primer **egr-1prom(+)** im regulatorischen Bereich des egr-1-Gens und **egr-1prom (-)** im 5'-Bereich des für Egr-1 kodierenden Gens angegeben. Darüber hinaus wird die Klonierung des PCR-Produktes beschrieben.

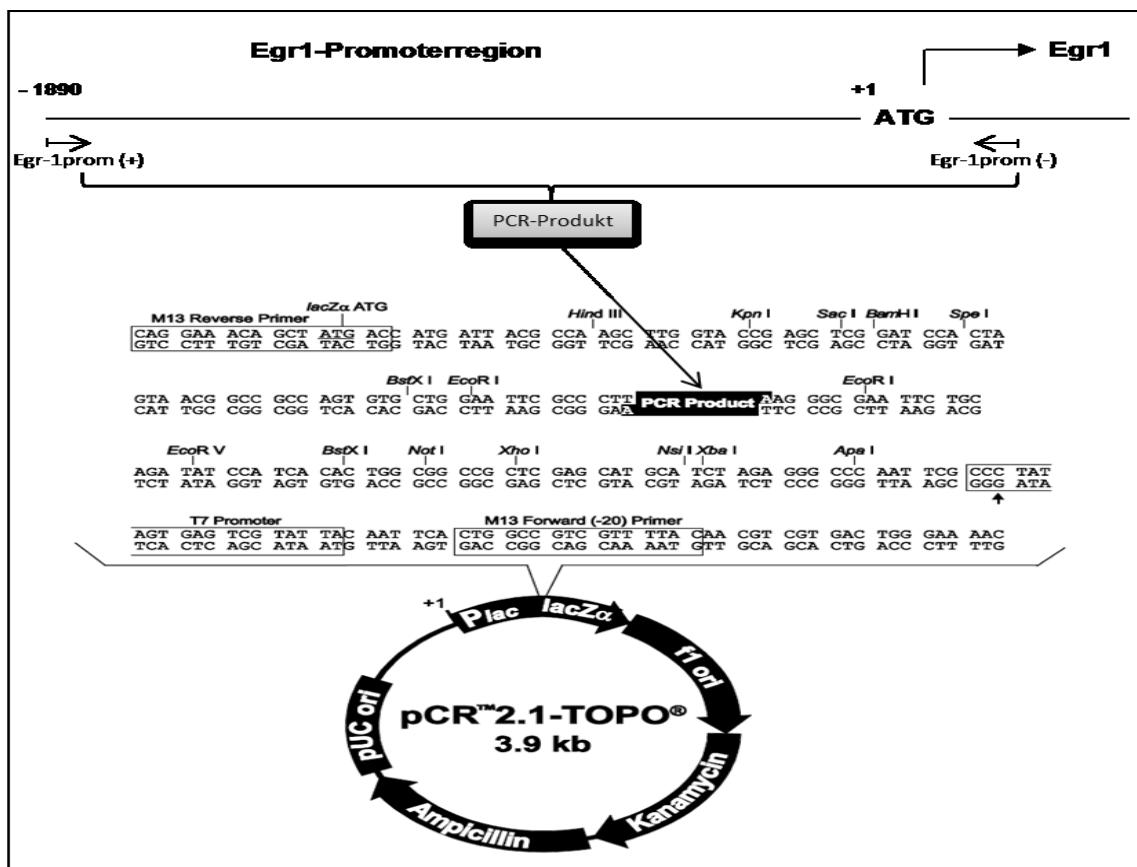


Abb. 6: Amplifikation der Promotorregion des egr-1-Gens und Klonierung des PCR-Produktes

Um den Promotorbereich zu amplifizieren, wurden mit dem Programm „Primerblast“ auf der Basis von Sequenzdaten genomicscher Ratten-DNA verschiedene PCR-Primer abgeleitet, die einerseits im kodierenden 5'-Bereich des Grid1-Gens nahe dem Startcodon positioniert wurden und andererseits die unbekannte Sequenz im regulatorischen Bereich flankierten. Ausgangspunkt war dabei die Sequenz aus der **Rat Genome Database 2012** mit der **ID 2544**. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von 1965 Basenpaaren und enthält neben einem 1890bp-Fragment zusätzlich 75 Basenpaare aus dem 5'-Bereich der für das Egr-1-Protein codierenden Sequenz. Die Identität und Integrität aller hier und später erhaltenen Konstrukte wurde durch beidseitige Sequenzierung überprüft. Dabei wurden im Vergleich mit der in Datenbanken abgelegten Sequenz der genomicschen DNA mehrere Variationen festgestellt, die in der Folge dokumentiert werden.

5.2.2. Sequenzanalyse des klonierten 5'-Bereiches des egr-1-Gens der Ratte und Lokalisation putativer regulatorischer Sequenzen

Der klonierte Abschnitt des egr-1-Gens wurde mehrfach sequenziert und mit der aus der Datenbank (Rat Genome database) bekannten Sequenz verglichen. Die hier ermittelte Sequenz weicht in vier Positionen von den publizierten Daten ab:

Position -152	Austausch Adenin für Guanin
Position -404	Austausch Thymin für Cytosin
Position -1379	Austausch Adenin für Guanin
Position -1644	Austausch Thymin für Cytosin

Tab. 7: Basenabweichungen innerhalb des klonierten egr-1-Abschnitts

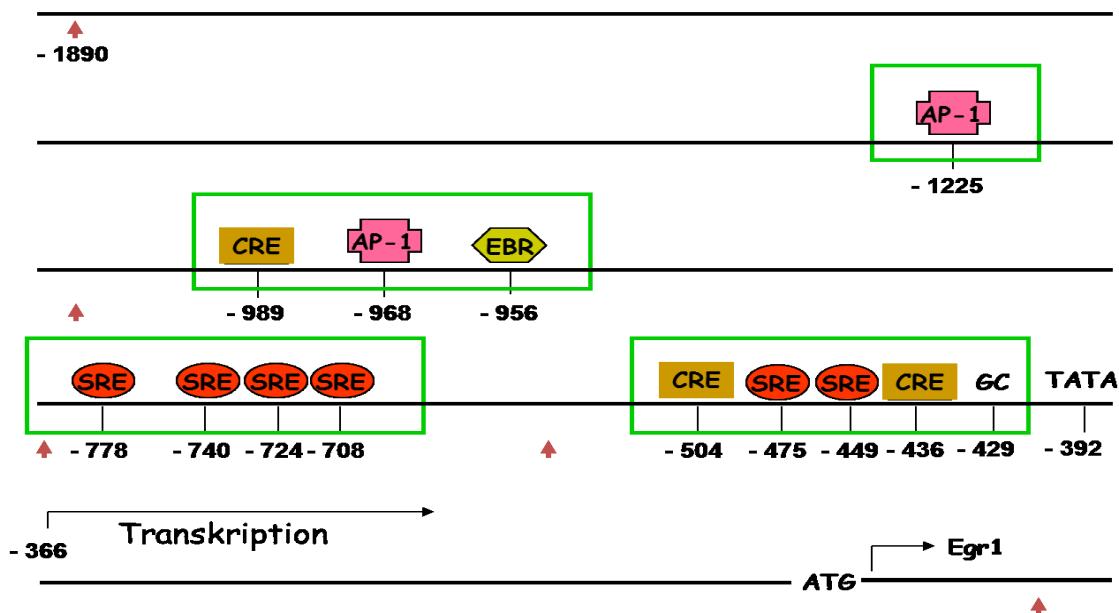
Keine dieser Abweichungen betrifft allerdings die in der Folge beschriebenen potentiellen regulatorischen Elemente im 5'-Bereich des egr-1-Gens. Die ermittelte Sequenz wurde mit dem Programm **Transfac** auf die Existenz von Bindungsstellen regulatorischer Proteine untersucht. Dabei konnten folgende potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen identifiziert werden:

Regulatorisches Element	Basensequenz	Position innerhalb des egr-1-Promotors der Ratte
TATA	...AAATA...	-392 bis -388
GC-BOX	...CGCGGGAGGCAGGGCCC...	-429 bis -412
AP-1 (1)	...CTGACTCG...	-968 bis -960
AP-1 (2)	...CTGACTGG...	-1225 bis -1218

CRE (1)	...TGTACGTCA...	-436 bis -430
CRE (2)	...TCACGTCA...	-504 bis -497
CRE (3)	...TGACGGCT...	-989 bis -982
SRE (1)	...CCATATATGG...	-449 bis -440
SRE (2)	...TCCTTCCATATTAGGGCTTC...	-475 bis -456
SRE (3)	...GTGGCCCAATATGGCCCTG...	-708 bis -690
SRE (4)	...CAGCGCCTTATATGGAGTGG...	-724 bis -705
SRE (5)	...ACAGACCTTATTGGGGCAGC...	-740 bis -721
SRE (6)	...AACGCCATATAAGGAGCAG...	778 bis -759
EBS	...CGCCCCCGC...	-956 bis -948

Tab. 8: Regulatorische Bereiche innerhalb des *egr-1*-Promotors (Ratte)

In Abb. 7 ist die Anordnung dieser Bindungsstellen im regulatorischen Bereich des Gens schematisch dargestellt. Es wurden mehrere Cluster von potentiell regulatorischen Elementen (grüne Boxen) identifiziert, deren Existenz später die Grundlage für die Herstellung von Reportergenkonstrukten mit unterschiedlichen Anteilen der Promotorsequenz waren. Die dafür benutzten Positionen sind in der Sequenz durch Pfeile markiert.

Abb. 7: Lokalisation potentiell regulatorischer Sequenzen im *egr-1*-Promotor (*AP-1* activator protein 1; *CRE* cAMP-responsive element; *SRE* serum response element; *EBR* *Egr-1* binding region)

5.2.3. Herstellung von Reportergenvektoren

Zur Analyse des regulatorischen Potentials der klonierten Sequenzen erfolgte die Herstellung von Reportergenkonstrukten. Dazu wurde zunächst das PCR-Produkt aus dem im vorigen Abschnitt hergestellten Vektor isoliert und in den Reportervektor pGL3-basic subkloniert. Zu diesem Zweck wurden Restriktionsschnittstellen verwendet, die sowohl im PCR2.1-TOPO-Vektor als auch im Reportervektor pGL3-basic vorliegen (KpnI bzw. XhoI; Abb. 8).

In diesem Vektor wird die Expression des Luciferasegens ausschließlich durch das Potential des inserierten Promotorfragments reguliert, es enthält selbst keine eukaryotischen Promotor- oder Enhancer-Sequenzen.

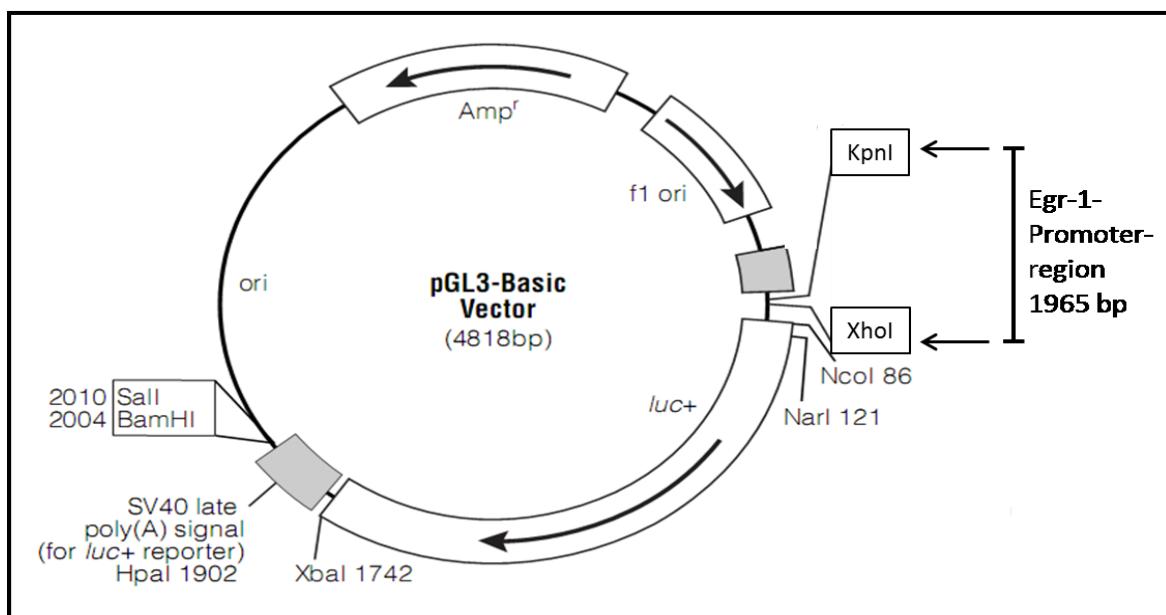


Abb. 8: Herstellung eines Reportergenkonstruktes mit der putativen regulatorischen Sequenz des *egr-1*-Promotors

5.2.4. Herstellung von Reportergenkonstrukten mit verkürzten Promotorabschnitten

Für die weitergehende Untersuchung einzelner Abschnitte der regulatorischen Region und die Identifizierung relevanter Sequenzen wurden unter Einbeziehung der in Abschnitt 5.2.2. gezeigten Ergebnisse der Sequenzanalyse Konstrukte mit verkürzten Promotoranteilen hergestellt (Abb. 9).

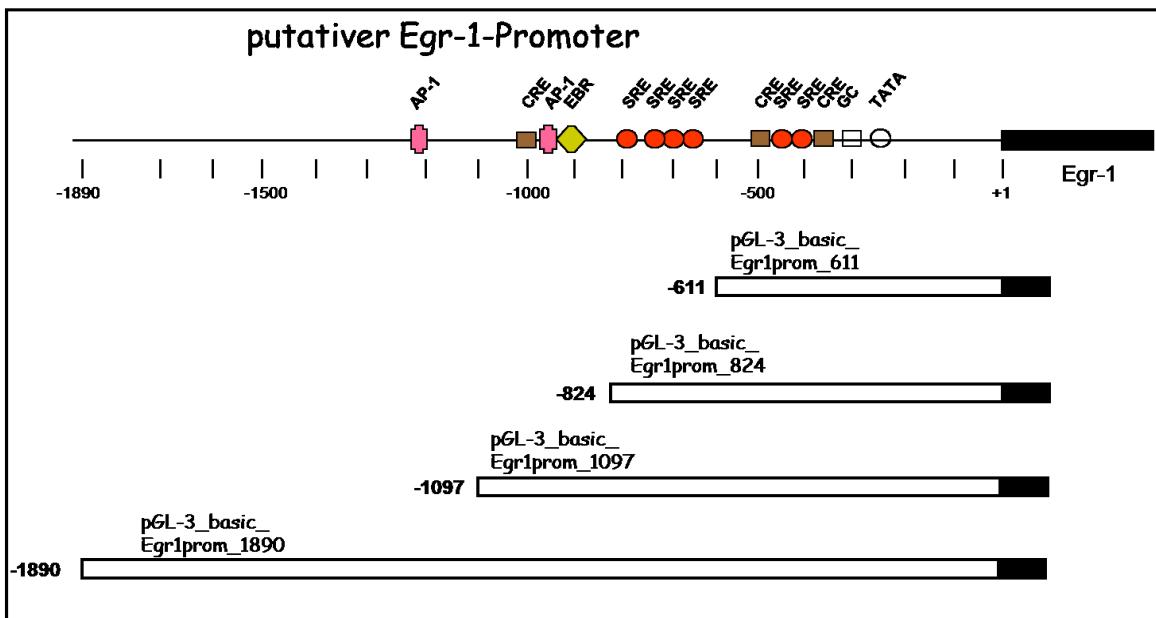


Abb. 9: Herstellung verkürzter *egr-1*-Promotor-Konstrukte

Dabei wurde eine identische Klonierungsstrategie verwendet, sodass sich die Konstrukte ausschließlich in der Länge der jeweils enthaltenen Promotorsequenz unterscheiden. Die Integrität der Konstrukte wurde durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung überprüft. In Abb. 10 ist das Ergebnis einer Restriktionsspaltung gezeigt, mit deren Hilfe die jeweils klonierten Promotorfragmente sichtbar werden.

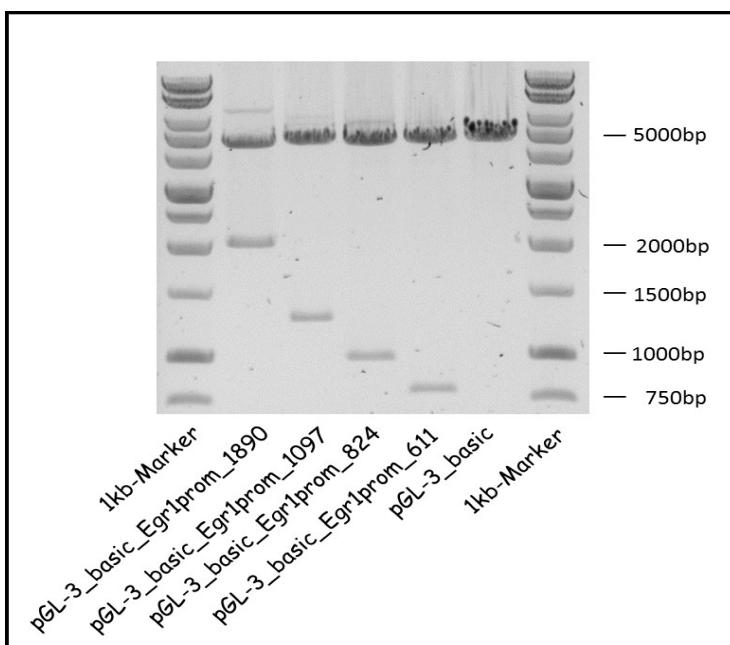


Abb. 10: Analyse verkürzter *egr-1*-Promotor-Konstrukte durch Restriktionsspaltung (Die hergestellten Vektoren bzw. als Kontrolle der leere Vektor wurden mit *Kpn*I/*Xho*I behandelt. Die Größe der erhaltenen Fragmente entspricht den Erwartungen.)

5.3. Analyse des egr-1-Promotors unter Epo-Stimulation

5.3.1. Untersuchung des egr-1-Promotors nach transienter Transfektion von Reportergenkonstrukten in hämatopoetische Zellen und EPO-Stimulation

Die hergestellten Konstrukte wurden in hämatopoetische Zellen (Ba/F3-EPOR) transient transfiziert und nach Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Dosen Erythropoietin auf Expression des Reportergens Luciferase untersucht (Abb. 11). Dabei wurde deutlich, dass alle Konstrukte, die Anteile der Promotorsequenz enthalten, dosisabhängig durch das Zytokin induziert werden. Die höchste Induktion findet sich bei dem Konstrukt, das 824 der klonierten 1890 Basenpaare des Egr1-Promotors enthält, bei längeren Konstrukten zeigt sich eher eine Tendenz zur Abnahme der Reportergenaktivierung, möglicherweise durch in diesen Sequenzen enthaltene negativ regulierende Bereiche. Bei weiterer Verkürzung der Promotorsequenz auf 611 Basenpaare fällt die Induktion um fast die Hälfte ab. Insgesamt lässt sich aus diesen Daten schließen, dass sich regulatorische Sequenzen sowohl innerhalb der ersten 611 Basenpaare umfassenden Sequenz proximal zum Startcodon des Egr1-Gens befinden, aber auch innerhalb der nächsten 213 Basenpaare, die den Unterschied zum Konstrukt pGl3-basic_Egr1prom_824 ausmachen, weitere Elemente mit hohem regulatorischen Potential lokalisiert sind.

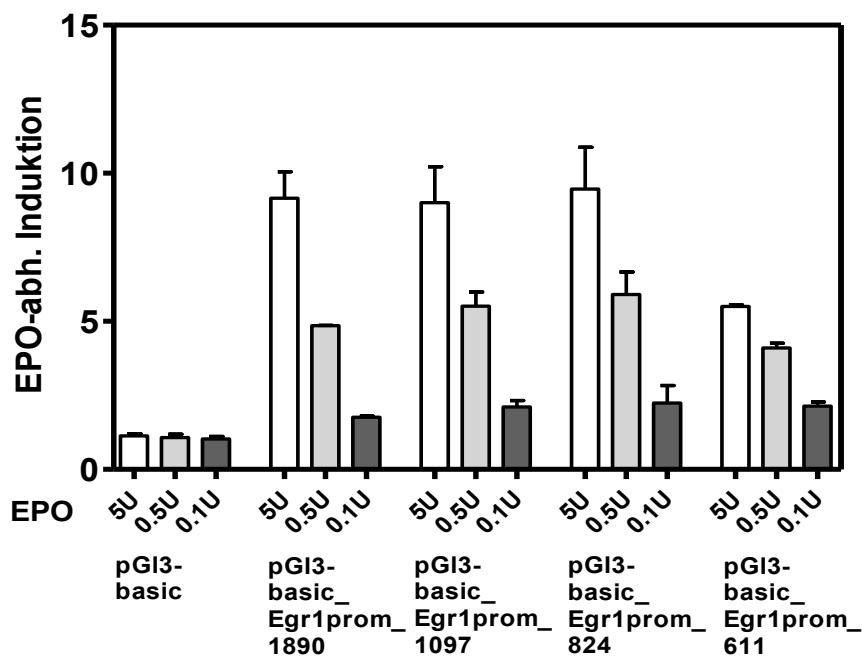


Abb. 11: Dosisabhängige Induktion von Reportergenkonstrukten mit unterschiedlichen Anteilen der putativen egr-1-Promotor-Sequenz durch EPO

5.3.2. Analyse zur Rolle von EPO-abhängigen Signalwegen für die Promotor-Induktion

5.3.2.1. Signalwegspezifische Inhibitoren

In weiterführenden Experimenten sollte zunächst untersucht werden, inwieweit diskrete Signalwege zur EPO-abhängigen Aktivierung des Egr1-Promotors beitragen. Dazu wurde das bereits beschriebene Konstrukt mit der kompletten klonierten Sequenz (pGI3-basic_Egr1prom_1890) transient transfiziert und durch den Einsatz signalwegspezifischer Inhibitoren die jeweilige Reduktion der EPO-induzierten Luciferaseaktivität ermittelt. Zunächst wurden Inhibitoren eingesetzt, die spezifisch die Aktivierung der inaktiven MEK1/2 (PD98059) hemmen bzw. die aktive und inaktive MEK1/2 (UO126) blockieren. In beiden Fällen wird deutlich, dass die EPO-abhängige Aktivierung des Promotors massiv und dosisabhängig gehemmt wird (Abb. 12 a, b). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Raf-MEK-ERK-Signalweg signifikant an der Regulation der egr-1-Promotoraktivität beteiligt ist.

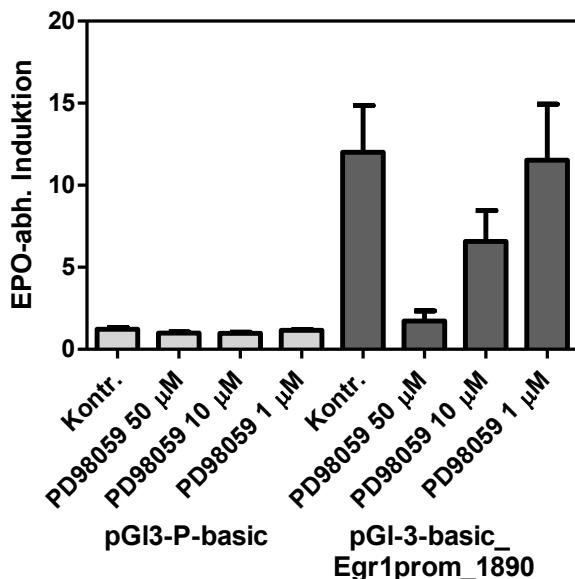


Abb. 12 a: Dosisabhängige Hemmung der egr-1-Promotoraktivierung durch den MEK1/2-Inhibitor PD98059

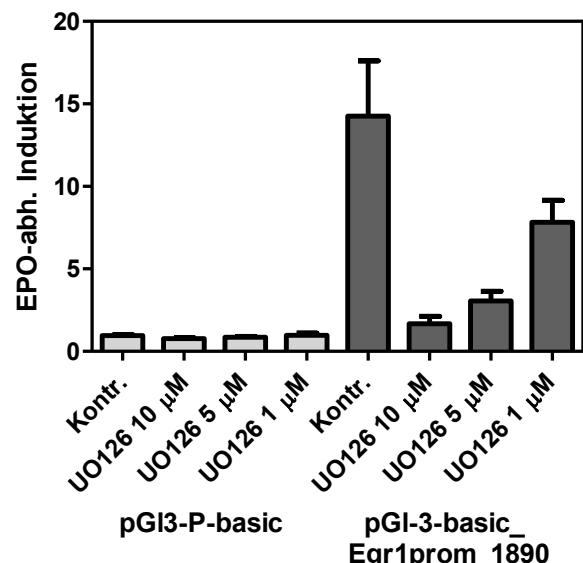


Abb. 12 b: Dosisabhängige Hemmung der egr-1-Promotoraktivierung durch den MEK1/2-Inhibitor PD98059

Desweiteren kam ein Inhibitor des PI3-Kinase-Signalwegs zum Einsatz. Die PI3-Kinase wird während der Aktivierung des EPO-Rezeptors an den Tyrosinrest 479 rekrutiert (Klingmüller et al., 1997) und aktiviert in der Folge die Proteinkinase B. Der eingesetzte Inhibitor Ly294002 hemmt die PI3-Kinase reversibel und spezifisch, ohne dabei in den hier verwendeten Zellen Apoptose zu induzieren. In Abb. 13 wird deutlich, dass auch dieser Inhibitor die EPO-induzierte Promotoraktivierung blockiert.

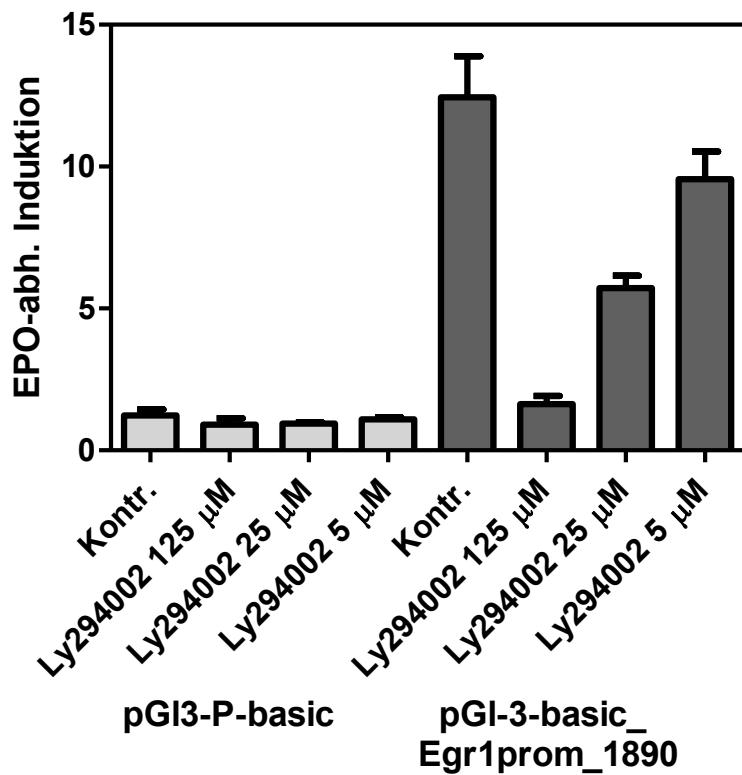


Abb. 13: Dosisabhängige Hemmung der egr-1-Promotoraktivierung durch den PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002

Zusätzlich wurde der Inhibitor SB203580 (Cell Signalling Technol.) getestet. Dieser Inhibitor hemmt spezifisch die Aktivierung der MAPKAPK-2 (MAP kinase-activated protein kinase 2) durch die p38-MAPKinase, die auch zu den mitogenaktivierten Proteinkinasen gehört und ihrerseits durch diverse Stressfaktoren sowie Zytokine aktiviert wird. Die in Abb. 14 gezeigten Daten weisen aufgrund der dosisabhängigen Hemmung der Promotorinduktion auf eine Beteiligung des p38-MAPK-Signalwegs hin.

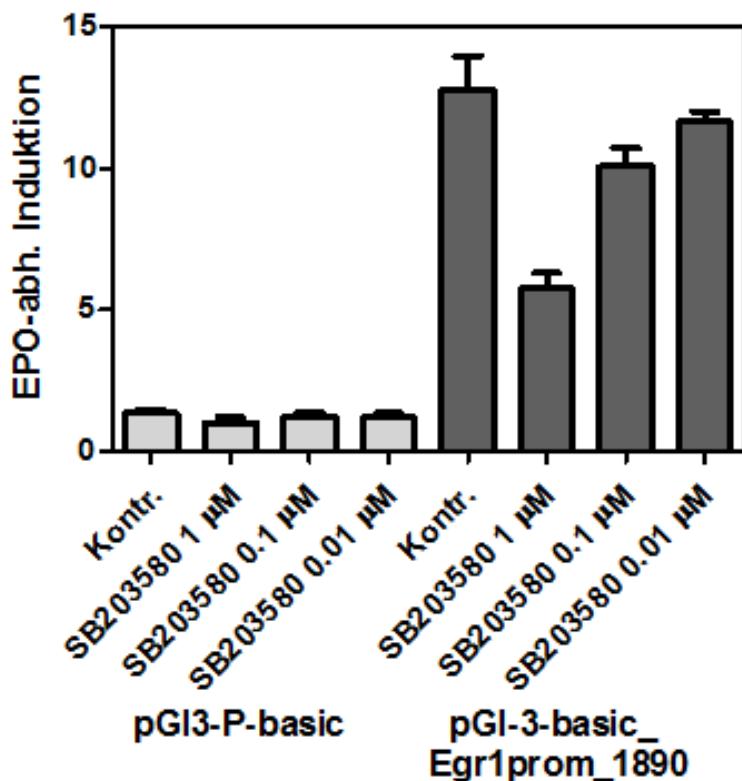


Abb. 14: Dosisabhängige Hemmung der *egr-1*-Promotoraktivierung durch den p38-MAPKinase-Inhibitor SB203580

Um der in Abschnitt 5.2.2. nachgewiesenen Existenz von cAMP-abhängigen regulatorischen Elementen Rechnung zu tragen, wurde abschließend auch ein Inhibitor der Proteinkinase A, eingesetzt (Abb. 15). Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Aktivierung des Promoters durch eine Blockade cAMP-gesteuerter Prozesse unterbunden wird. Das Ausmaß der Inhibition ist allerdings nicht so stark wie bei anderen eingesetzten Hemmstoffen.

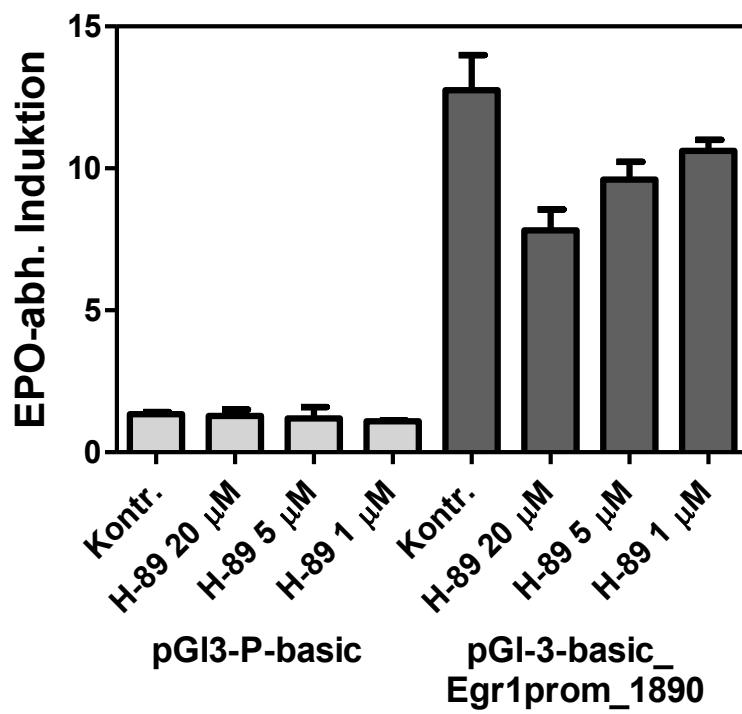


Abb. 15: Dosisabhängige Hemmung der *egr-1*-Promotoraktivierung durch den PKA-Inhibitor H-89

5.3.2.2. Überexpression von Tyrosinkinasen

Für die weitere Vertiefung der gezeigten Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren wurden Cotransfektionsexperimente durchgeführt, in denen cDNAs für im EPO-Signaltransfer beteiligte Tyrosinkinasen zusammen mit den Reportergenkonstrukten transfiziert wurden. Man geht hierbei von der Erwartung aus, dass die Überexpression von Signalmolekülen zu einer Verstärkung derjenigen Signaleignisse führt, an denen sie im jeweiligen Modell beteiligt sind.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die rezeptorassoziierten Tyrosinkinasen JAK2 und Lyn für die im EPO-Rezeptor-Komplex ablaufende Tyrosinphosphorylierung diverser Signalmoleküle verantwortlich sind (Bittorf et al., 1997; Tilbrook et al., 2001). Beide Tyrosinkinasen wurden jeweils als Wildtyp-cDNAs oder als dominant negativ wirkende Konstrukte eingesetzt, bei denen die Tyrosinkinasedomäne durch Deletionsmutagenese inaktiviert wurde. Die Ergebnisse der Transfektionen sind in den Abb. 16 a und 16 b dargestellt. Es wird deutlich, dass die Überexpression des Wildtyps beider Kinasen zu einer signifikanten Verstärkung der Induktion führt, wohingegen die verstärkte Expression dominant negativer Konstrukte die Induktion verringert. Damit ist sehr wahrscheinlich, dass der egr-1-Promotor durch Signalwege reguliert wird, die am Rezeptor durch die Kinasen JAK2 und Lyn vermittelt werden.

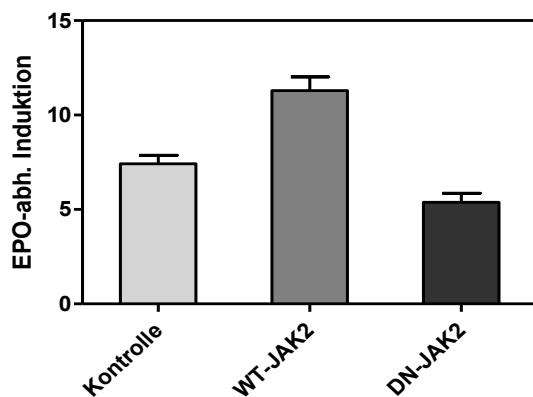


Abb. 16 a: Einfluss der Überexpression der Tyrosinkinase JAK2 bzw. eines dominant negativen JAK2-Konstrukts auf die Promotorinduktion

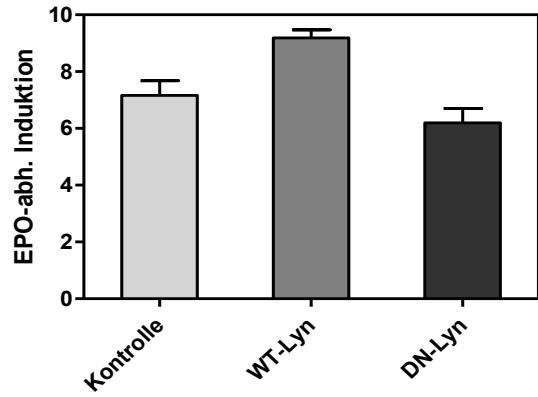


Abb. 16 b: Einfluss der Überexpression der Tyrosinkinase JAK2 bzw. eines dominant negativen JAK2-Konstrukts auf die Promotorinduktion

5.3.2.3. Einfluss der Überexpression von egr-1

Ausgehend von der Tatsache, dass bei der Analyse der klonierten egr-1-Promotorsequenz (Abb. 7) eine Egr-1-Bindungsstelle identifiziert werden konnte, wurden Cotransfektionsexperimente mit der egr-1-cDNA durchgeführt. Dazu wurde die egr-1-cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert und zusammen mit dem Promotorkonstrukt transfiziert. Im Ergebnis dieser Experimente lässt sich feststellen, dass durch die Überexpression von Egr-1 eher eine Reduktion der Promotoraktivierung hervorgerufen wird (Abb. 17). Daraus lässt sich schließen, dass die Egr-1-Bindungsstelle sehr wahrscheinlich die Promotoraktivität negativ reguliert.

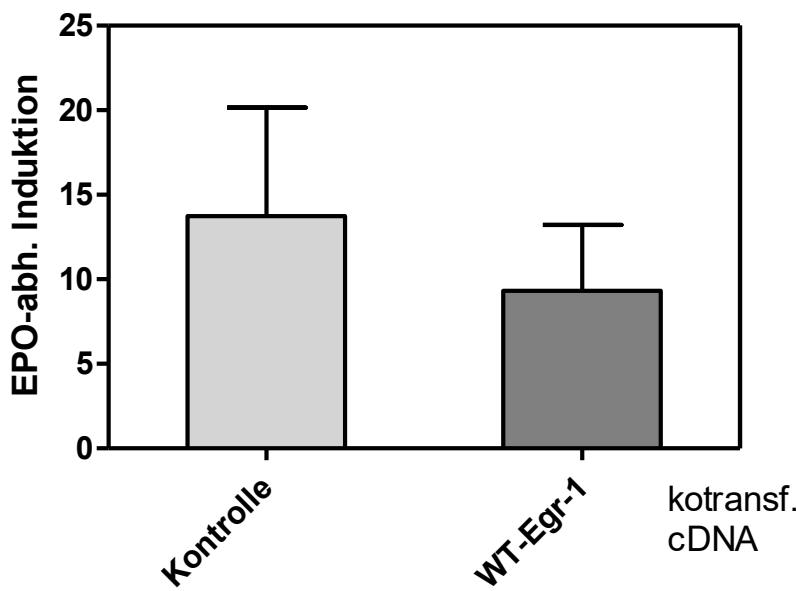


Abb. 17: Einfluss der Überexpression der egr-1-cDNA auf die Promotorinduktion

5.3.2.4. Analyse verkürzter Promotorkonstrukte

5.3.2.4.1. Einfluss von signalwegspezifischen Inhibitoren auf die Aktivität verkürzter Promotorkonstrukte

Für eine nähere Analyse der Promotorregulation wurden die hergestellten verkürzten Promotorvarianten parallel transfiziert und der Einfluss der oben bereits verwendeten Inhibitoren vergleichend untersucht. In Abb. 18 sind die Daten für alle Konstrukte und Inhibitoren dargestellt. Es ist offensichtlich, dass die Hemmung des Raf-MEK-ERK-Signalwegs (UO126, PD98059) sowie PI3-Kinase-abhängiger Signale (Ly 294002) vor allem über Elemente vermittelt wird, die proximal zum egr-1-Gen liegen. Schon beim kürzesten Promotorkonstrukt ist hier eine starke Hemmung der Promotoraktivität feststellbar, die bei den längeren Konstrukten nicht weiter zunimmt. Im Gegensatz dazu ist

die durch den p38-Kinase-Inhibitor (SB203580) hervorgerufene Hemmung bei längeren Promotorkonstrukten deutlich weniger ausgeprägt.

Die Wirkung des PKA-Inhibitors (H-89) scheint nur die beiden im kürzesten Promotorfragment lokalisierten cAMP-responsiven Elementen zu betreffen, das weiter distal gelegene Element (Pos.-989 bis -982) beeinflusst die Promotorinduktion offensichtlich nicht.

Die Daten sprechen in jedem Falle für eine funktionelle Bedeutung PKA-abhängiger Signale bei der Promotoraktivierung.

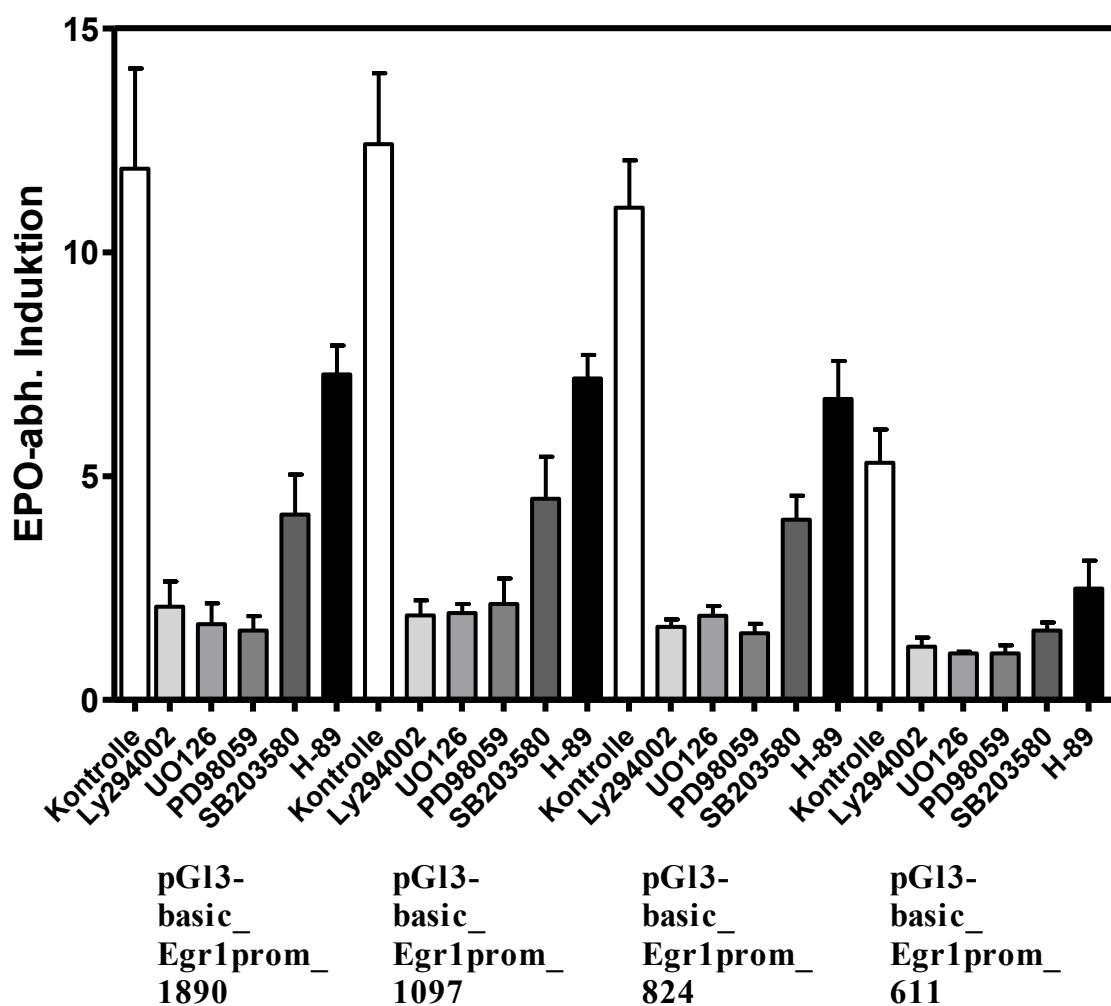


Abb. 18: Einfluss signalwegspezifischer Inhibitoren auf die EPO-abhängige Aktivierung verkürzter Promotorkonstrukte

5.3.2.4.2. Einfluss der Überexpression von Egr-1 auf die Aktivität verkürzter Promotorkonstrukte

Wie bereits unter 5.3.2.3. gezeigt, führt die durch Coexpression einer klonierten egr-1-cDNA verursachte Überexpression des Proteins zu einer Reduktion der Promotoraktivität

des Gesamtfragmentes. Um die in diesem Zusammenhang postulierte Rolle einer im Promotor identifizierten Egr-1-Bindungsstelle näher zu beschreiben, wurden weitere Cotransfektionsexperimente mit verkürzten Promotorfragmenten durchgeführt. Die in Position -956 bis -948 oberhalb des egr-1-Gens lokalisierte Bindungsstelle ist demzufolge nur in den beiden längeren Promotorfragmenten enthalten. In Abb. 19 sind die Ergebnisse entsprechender Transfektionsexperimente zusammengefasst. Es wird deutlich, dass bei den beiden stark verkürzten Promotorkonstrukten ohne Egr-1-Bindungsstelle kein Einfluss einer Egr-1-Überexpression nachweisbar ist, während in den längeren Konstrukten eine offensichtliche Reduktion der Promotoraktivität durch Egr-1-Überexpression vorliegt. Diese Ergebnisse machen eine Kontrolle des egr-1-Promotors durch Egr-1-Bindung wahrscheinlich.

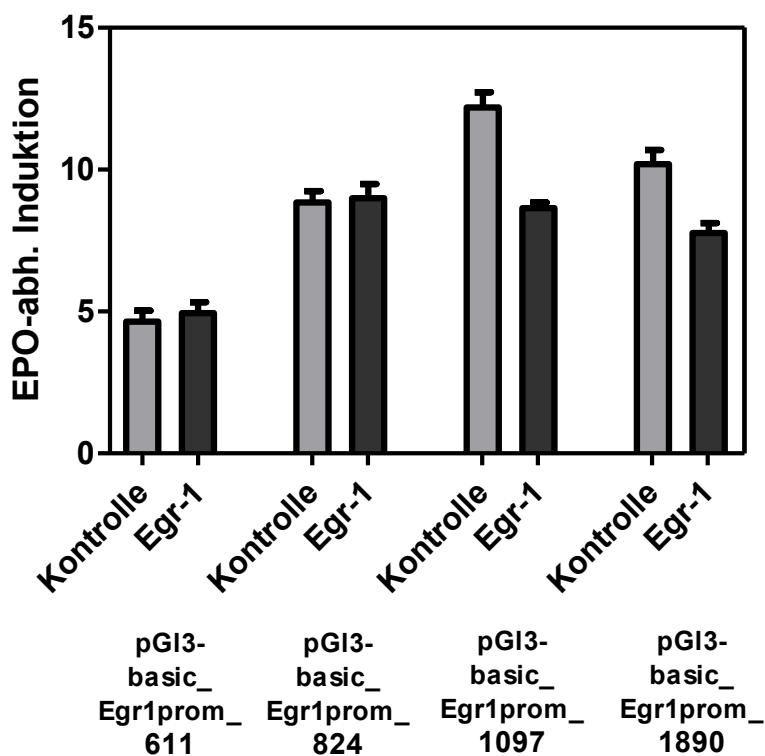


Abb. 19: Einfluss der Überexpression von *egr-1*-cDNA auf die EPO-abhängige Aktivierung verkürzter Promotorkonstrukte

5.4. Analyse Egr-1-abhängiger Zielgene

Um die Rolle von Egr-1 für die Regulation EPO-abhängiger Gene weiter aufzuklären, wurden mehrere Gene, für deren Regulation eine Beteiligung von Egr-1 postuliert wurde, zunächst daraufhin untersucht, ob nach Stimulation EPO-sensitiver Zellen eine Induktion der mRNA feststellbar ist. Dazu wurden die bereits unter 5.1. beschriebenen Ba/F3-EPOR-

Zellen für 30 Minuten mit EPO stimuliert und anschließend RNA isoliert. Die daraus präparierte cDNA diente als Ausgangsmaterial für die Amplifikation genspezifischer PCR-Fragmente.

5.4.1. Induktion potentieller Egr-1-Zielgene durch EPO

In Abb. 20 wird deutlich, dass neben der bereits beschriebenen, vorübergehenden Zunahme der egr-1-mRNA auch das TGF- β und das PDX-1-Gen verstärkt transkribiert werden. Während bei TGF- β die Induktion über zwei Stunden kontinuierlich zunimmt, ist beim PDX-1- sowie beim PTEN-Gen ein transienter Anstieg zu verzeichnen. Die Expression des als Kontrolle eingesetzten house-keeping-Gens GAPDH ist konstant.

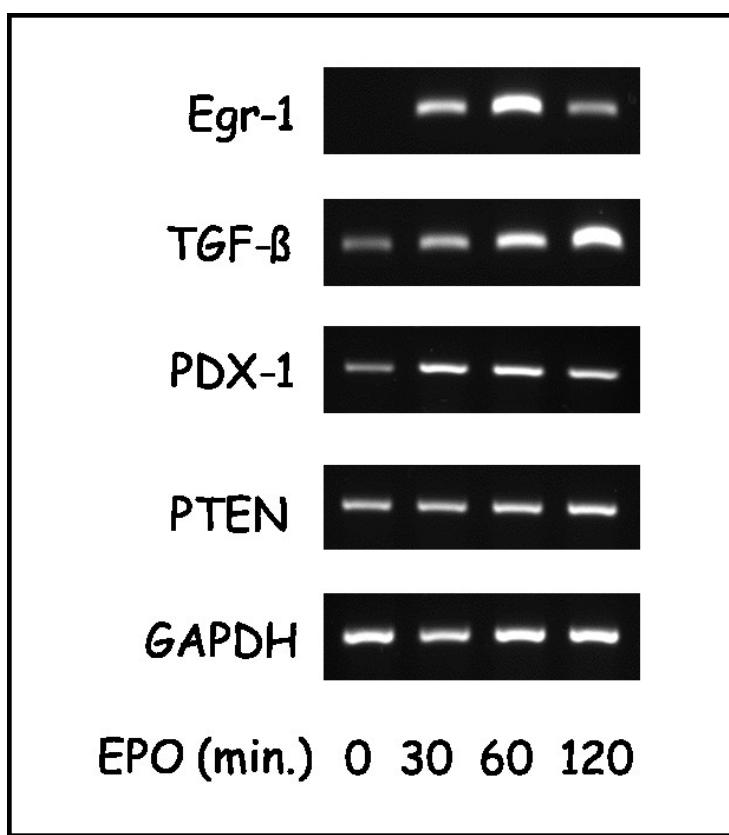


Abb. 20: Induktion von egr-1 und potentiellen egr-1-Zielgenen in EPO-stimulierten Ba/F3-EPOR-Zellen

5.4.2. Epigenetische Konfiguration und Egr-1-Bindung an EPO-abhängige Zielgene

Für die im vorhergehenden Abschnitt untersuchten Gene wurden Egr-1-Bindungsstellen im regulatorischen Bereich identifiziert. In den nachfolgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob diese Gene unter den hier verwendeten Bedingungen nach EPO-Stimulation aktiv sind und eine physische Bindung von Egr-1 an die genannten regulatorischen Elemente nachweisbar ist. Dazu wurde zunächst die Histonmethylierung mit

histonmodifikationsspezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 21). Da die Methylierung bestimmter Lysinreste im Histon3 zur Auflockerung der Chromatinstruktur, die Modifikation anderer Reste jedoch zur Verdichtung des Chromatins führt, kann durch Verwendung von Antikörpern gegen entsprechende Motive mit Lysinresten der Aktivierungszustand der betreffenden DNA-Abschnitte beurteilt werden. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde ein Antikörper gegen das trimethylierte Lysin 4 im Histon 3 (H3K4) als Aktivierungsmarker sowie ein Antikörper gegen dimethyliertes Lysin 9 (H3K9) als Inaktivierungsmarker verwendet. Die in Abb. 21 gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass außer dem offensichtlich inaktiven PTEN-Gen sowohl das egr-1-Gen als auch die Gene für TGF- β und PDX-1 unter den gegebenen Umständen aktiv sind.

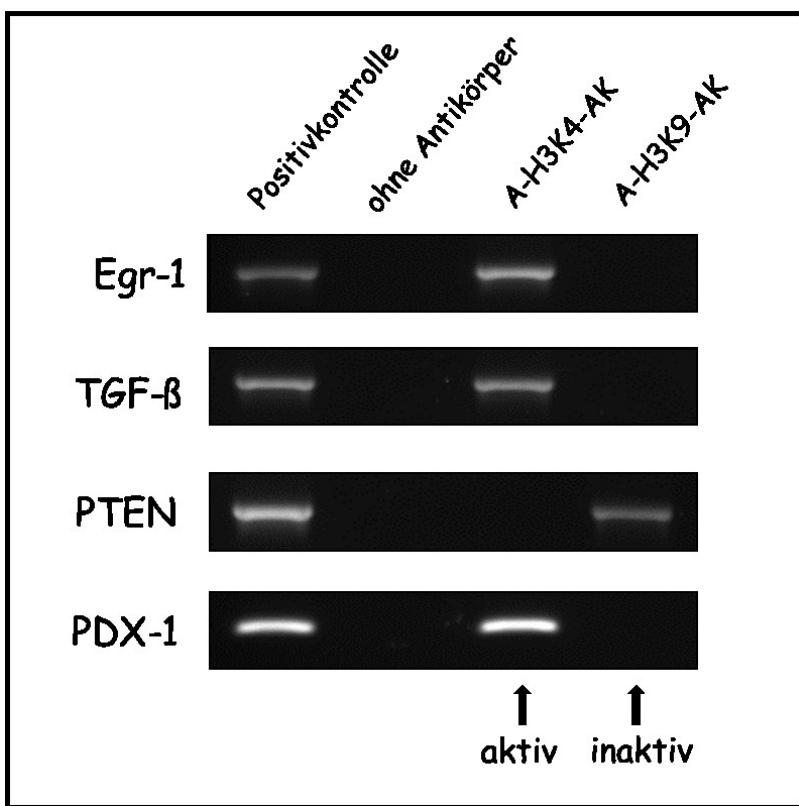


Abb. 21: Induktion von egr-1 und potentiellen Egr-1-Zielgenen in EPO-stimulierten Ba/F3-EPOR-Zellen

Entscheidend für die Aufklärung der Rolle von Egr-1 als EPO-reguliertem Transkriptionsfaktor ist der Nachweis der Bindung an regulatorische Sequenzen von potentiellen Zielgenen. Zu diesem Zweck wurden Chromatinfragmente mit Egr-1-spezifischen Antikörpern präzipitiert und anschließend durch PCR mit genspezifischen Primern amplifiziert, um einen direkten Zusammenhang zwischen Egr-1-Bindung und konkreten Gensequenzen herzustellen. In Abb. 22 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Egr-1 bindet im regulatorischen Bereich des eigenen Gens, die Bindung wird

dabei in EPO-stimulierten Zellen deutlich verstärkt. Auch für das PDX-1-Gen und das TGF- β -Gen ist in EPO-behandelten Zellen eine Interaktion mit Egr-1 nachweisbar, während das PTEN-Gen offensichtlich nicht Egr-1-abhängig reguliert wird.

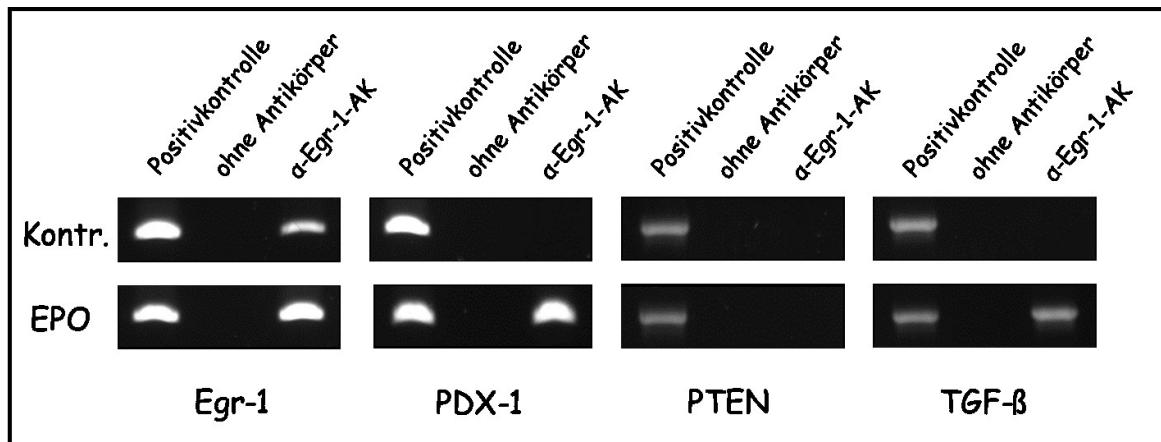


Abb. 22: Bindung von Egr-1 an regulatorische Sequenzen von Zielgenen in EPO-stimulierten Ba/F3-EPOR-Zellen

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Egr-1 in EPO-stimulierten Zellen sowohl die Regulation der eigenen Expression als auch die des PDX-1 und TGF- β -Gens steuert.

6. Diskussion

Die aktuelle medizinische Forschung wird zu einem großen Teil durch die molekularbiologische Analyse physiologischer und pathologischer Abläufe im Organismus geprägt. Hierbei ist es einerseits wichtig, Funktionen einzelner Genprodukte und deren Regulation, aber auch die Interaktion verschiedener Gene und deren Kontrolle durch extrazelluläre Signale zu verstehen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt vor allem auf der Untersuchung der EPO-abhängigen Stimulation des egr-1-Promotors. Das durch das egr-1-Gen kodierte Protein wurde bereits Ende der achtziger Jahre in Fibroblasten entdeckt (Sukhatme et al., 1988) und mittlerweile in unterschiedlichsten Zelltypen nachgewiesen. Egr-1 gehört zu den sogenannten „immediate response“-Genen, welche nach entsprechender Stimulation sehr rasch exprimiert werden. Das Egr-1-Protein fungiert als Transkriptionsfaktor und ist je nach Zelltyp für die Regulation unterschiedlicher zellulärer Aktivitäten verantwortlich.

Diese Arbeit basiert auf der Klonierung des regulatorischen Bereichs des egr-1-Gens aus dem Genom der Ratte. Nach Analyse der Sequenz und Herstellung unterschiedlich langer Promotorkonstrukte wurde deren jeweiliges Potential zur Induktion von Reportergenen analysiert. Mit Hilfe von signalwegspezifischen Inhibitoren konnte anschließend der Zusammenhang zwischen identifizierten regulatorischen DNA-Elementen und den für ihre Aktivierung verantwortlichen Signalereignissen aufgeklärt werden.

Darüber hinaus wurde durch den direkten Nachweis einer physischen Bindung von Egr-1 an regulatorische Elemente weiterer Strukturgene die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Egr-1 weitergehend charakterisiert.

Charakterisierung des egr-1-Promotors

Struktur des egr-1-Promotors der Ratte

Die von uns klonierte egr-1-Promotor-Sequenz der Ratte besteht aus 1890 Bp und enthält mehrere Bereiche, die für die Regulation der Egr-1-Expression von Bedeutung sind. Die Sequenz wurde mit einer bereits in einer DNA-Datenbank (Rat Genome Database) abgelegten Sequenz mit Hilfe von **Bioedit** abgeglichen. Hierbei konnte bei mehreren unabhängig klonierten Sequenzen konstant Abweichungen bei vier Basenpaaren festgestellt werden, die allerdings keine regulatorisch bedeutsamen Bereiche des egr-1-Promotors betreffen und deshalb bei der weiteren Analyse nicht einbezogen wurden. Mit Hilfe des Programmes **Transfac** konnten in der putativen regulatorischen Region –

entsprechend dem egr-1-Promotor der Maus (Ouelette et al., 1990, Xi et al., 2003) - sechs SRE (serum response elements) identifiziert werden, die sich in ein proximales und distales Cluster unterteilen (Abb. 23).

Das proximale Cluster setzt sich aus 2 SRE zusammen, während das distale Cluster aus vier SRE gebildet wird. Auf dem humanen egr-1-Promotor befinden sich vergleichsweise lediglich 5 SRE (Sakamoto et al., 1991; Schwachtgen et al., 2000; Thiel et al., 2014).

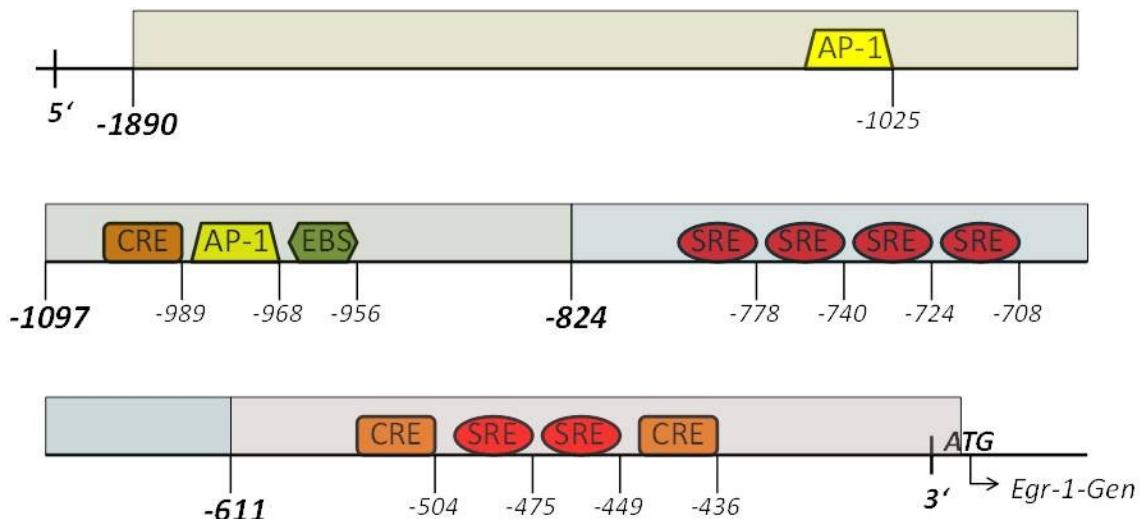


Abb. 23: Schematische Darstellung des egr-1-Promotors und seiner regulatorischen Elemente

SRE-Elemente dominieren die Regulation des egr-1-Promotors

Watanabe und Mitarbeiter konnten 1997 im murinen System nachweisen, dass nach IL-3 Stimulation in Ba/F3-Zellen sowohl das proximale als auch das distale Cluster eine aktivierende Funktion auf die egr-1-Induktion ausüben. Der Raf-MEK-ERK-Signalweg ist eine Kaskade, welche zur Phosphorylierung der ERK1/2 (MAPK) führt, die nach Translokation in den Zellkern den TCF (ternary complex factor) Elk-1 aktiviert, der wiederum gemeinsam mit SRF (serum response factor) am SRE einen aktivierenden Komplex ausbildet (Pagel et al., 2011). Murine embryonale SRF-negative Stammzellen sind in ihrer Fähigkeit zur Egr-1-Synthese unter TPA-Stimulation stark beeinträchtigt (Schratt et al., 2001). Versuche mit murinen B-Zellen (Sukhatme et al., 1988) und humanen Fibroblasten (Aicher et al., 1999) zeigen ebenfalls, dass SRE die dominierenden Stimulatoren im egr-1-Promotor sind. Auch die Aktivierung des egr-1-Promotors in pankreatischen β -Zellen der Ratte ist zu einem großen Teil von der Aktivierung seiner SRE abhängig (Bernal-Mizrachi et al., 2000). In humanen Prostatakrebszellen konnte nach EGF-Stimulation eine Raf-MEK-ERK-vermittelte egr-1-Promotoraktivierung durch das proximale SRE-Cluster beschrieben werden (Gregg et al., 2011).

Die Abhängigkeit der Induktion des egr-1-Gens der Ratte durch den Raf-MEK-ERK-Signalweg über SRE konnte durch die hier beschriebenen Versuche bestätigt werden. Durch EPO-Stimulation ließ sich im kürzesten Promotorfragment (611 bp), auf dem sich das proximale SRE-Cluster befand, bereits eine deutliche Zunahme der Reporteraktivität im Vergleich zur Kontrolle demonstrieren. Die höchste egr-1-Promotoraktivierung konnte bei EPO-Stimulation durch das 824 bp-Fragment, auf dem sich zusätzlich das distale SRE-Cluster befindet, nachgewiesen werden. Eine weitere Steigerung der egr-1-Induktion ließ sich bei den längeren Fragmenten (1097bp und 1890bp), die keine zusätzlichen SRE besitzen, nicht zeigen. Stattdessen kam es sogar zu einer leichten Reduktion der Luciferaseaktivität, welche wahrscheinlich durch andere regulatorische Elemente im distalen Bereich des egr-1-Promotors, wie die inhibierende EBS, zu erklären ist. Bei Hemmung des Raf-MEK-ERK-Signalwegs durch spezifische MEK1/2(MAPKK)-Inhibitoren (UO126, PD89059) konnte bei den Promotorkonstrukten mit 611bp und 824bp eine starke Reduktion der Promotoraktivierung nachgewiesen werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die proximalen und distalen SRE-Cluster jeweils eine ausgeprägte stimulierende Funktion auf die MEK1/2-vermittelte Egr-1-Expression ausüben und beide Regionen für eine maximale Aktivierung notwendig sind.

Egr-1 reguliert seine eigene Expression

In Position -948 bis -956 des murinen egr-1-Promotors befindet sich eine Egr-1-Bindungsstelle (EBS) (Abb. 23), die 1991 auch auf dem humanen egr-1-Promotor beschrieben wurde (Sakamoto et al.). Das Egr-1-Protein ist dementsprechend in der Lage, an seinen eigenen Promotor zu binden und die Synthese des Genprodukts zu beeinflussen. Mit Hilfe von Cotransfektionsexperimenten ließ sich durch Überexpression von Egr-1 in Ba/F3-Zellen eine Abnahme der egr-1-Promotoraktivierung nachweisen. Bei diesen Cotransfektionsexperimenten wurden auch Reportergenkonstrukte mit unterschiedlich langen egr-1-Promotorfragmenten eingesetzt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass nur bei Transfektion von Promotorkonstrukten mit Egr-1-Bindungsstellen eine Egr-1-Überexpression zur Abnahme der Egr-1-Synthese führte. Transfizierte Ba/F3-Zellen, deren Promotorkonstrukte jedoch keine Egr-1-Bindungsstellen aufwiesen, zeigten keine derartige Abnahme der Egr-1-Synthese. In Versuchen, in denen wir Chromatinfragmente mit Egr-1-spezifischen Antikörpern präzipitierten, konnten wir darüber hinaus eine direkte physische Bindung von Egr-1 an der EBS nachweisen. Eine negativ regulierende Eigenschaft der EBS am murinen und humanen egr-1-Promotor wird schon in früheren Publikationen

vermutet (Cao et al., 1993). Unsere Ergebnisse bestätigen in jedem Fall die Interaktion des Egr-1-Proteins mit seinem eigenen Promotor und legen einen negativ regulierenden Effekt dieser Interaktion auf die Egr-1-Expression nahe.

CRE-Elemente sind an der Regulation beteiligt

Als weitere potentiell wichtige regulatorische Elemente des egr-1-Promotors der Ratte konnten wir drei CRE-Sequenzen identifizieren, während auf dem humanen egr-1-Promotor lediglich zwei CRE existieren (Sakamoto et al., 1991, Schwachtgen et al., 2000). Auch innerhalb des egr-1-Promotors der Ratte wurden bisher nur zwei CRE nachgewiesen (Kang et al., 2007).

Zwei der CRE liegen im proximalen Bereich des Promotors in Position -430 bis -436 und -497 bis -504, weiter distal in Position -982 bis -989 befindet sich ein drittes CRE. Die Aktivierung eines CRE erfolgt durch das Binden eines CREB-Homodimers, welches sich nach Phosphorylierung von CREB am Serinrest 133 ausbildet.

Neben einer PKA-abhängigen Phosphorylierung von CREB am Serinrest 133 ist auch eine Aktivierung von CREB durch den p38-MAPK-Signalweg beschrieben worden (Rolli et al., 1999). Darüber hinaus sind die Serin-/Threoninkinase p90RSK und Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen in der Lage, CREB zu phosphorylieren (Shaywitz et al., 1999).

In aus Ratten isolierten pankreatischen β -Zellen, die mit Glukose stimuliert wurden, konnte mit Hilfe des synthetischen PKA-Inhibitors H89 eine Beteiligung der PKA bei der Aktivierung des egr-1-Promotors nachgewiesen werden (Bernal-Mizrachi et al., 2000). In den gleichen Zellen wurde eine GLP-1(glukagon-like peptide-1) induzierte PKA-abhängige Phosphorylierung von CREB beschrieben, die nachfolgend zur Aktivierung des egr-1-Promotors führte (Kang et al., 2007). In humanen U-87-Gliomzellen konnte durch Forskolin-Stimulation, einem Aktivator der Adenylatcyclase, keine Aktivierung des egr-1-Promotors erzielt werden (Meyer et al., 2002). In diesen Zellen wurde dem distalen CRE eine p38-MAPK-abhängige, stimulierende Funktion auf die basale egr-1-Promotoraktivität zugesprochen, während das proximale CRE einen inhibierenden Einfluss auf die basale egr-1-Aktivität hatte (Meyer et al., 2002). In humanen Jurkat-Zellen wurde nach Anisomycin-Behandlung ebenfalls eine p38-MAPK-abhängige Phosphorylierung von CREB beschrieben, die zur aktivierenden Bindung von CREB und ATF-1 (activating transcription factor-1) am distalen CRE des egr-1-Promotors führte (Rolli et al., 1999).

Auch in humanen TF-1-Zellen wurde nach GM-CSF-Stimulation eine PKA-unabhängige Phosphorylierung von CREB nachgewiesen, die zu einer Aktivierung des egr-1-Promotors führte (Wong et al., 1995).

In INS-1-Zellen, eine β -Zelllinie aus Ratten, die mit Exendin-4, einem GLP-1-Agonisten, stimuliert wurden, zeigte sich bei Verwendung der Inhibitoren H89 und PD98059 eine Dominanz der PKA bei der Aktivierung des egr-1-Promotors gegenüber dem MEK1/2-Signalwegs. Hierfür schien vor allem eine Aktivierung des proximalen CRE von Bedeutung zu sein (Kang et al., 2006).

In unseren Versuchen wurde deutlich, dass die Inkubation der Ba/F3-Zellen mit H-89 unter EPO-Stimulation zu einer signifikanten Reduktion der egr-1-Promotoraktivität führte. Eine parallele Transfektion der Ba/F3-Zellen mit unterschiedlich langen Promotorfragmenten zeigte, dass vor allem die beiden proximal gelegenen CRE nach EPO-Stimulation einen stimulierenden Einfluss auf den egr-1-Promotor ausüben könnten. Da der PKA-Signalweg jedoch sowohl eine regulatorische Funktion auf den Raf-MEK-ERK-Signalweg ausübt (Boer et al., 2003) als auch eine direkte SRE-Aktivierung vermitteln kann (Chang et al., 2012), ist der Anteil einer CRE-abhängigen egr-1-Induktion durch EPO noch nicht genau gesichert. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, bei der Promotorkonstrukte verwendet werden, die eine strikte Unterscheidung CRE- und SRE-abhängiger Promotoraktivierung erlauben.

Tyrosinkinasen vermitteln EPOR-generierte Signale zur Regulation der egr-1-Promotoraktivität

Die Spezifität der im EPO-Rezeptorkomplex entstehenden Signale wird über aus dem Zytosol rekrutierte Tyrosinkinasen, insbesondere durch die mit einer membranproximalen Sequenz assoziierte JAK2, vermittelt (Bittorf et al., 1997). Darüber hinaus wurde auch für die Kinase Lyn eine Beteiligung an EPOR-abhängigen Aktivitäten nachgewiesen (Tilbrook et al., 2001). In unseren Experimenten nutzten wir Cotransfektionsversuche, in denen wir einerseits Wildtyp-cDNAs transient überexprimierten, andererseits aber auch dominant negative Konstrukte für beide Kinasen zusammen mit den Promotor-Reportergen-Konstrukten zur Expression brachten.

Bei Verwendung dominant negativer Rezeptormutanten von JAK2 und Lyn kam es zu einer verminderten Induktion des egr-1-Gens, während die Überexpression der Wildtyp-cDNA von JAK2 und Lyn die egr-1-Induktion verstärkte. Diese Resultate sprechen für eine funktionelle Beteiligung beider Tyrosinkinasen an Signalwegen, die an der Steuerung

des egr-1-Promotors mitwirken. Eine Funktion von JAK2 bei der EPO-vermittelten Aktivierung der Egr-1-Synthese wurde bereits in der Literatur durch die Analyse von Rezeptormutanten postuliert (Schulze et al., 2008). Demnach ist die Existenz einer intakten JAK2-Bindungsstelle im Rezeptor eine strukturelle Voraussetzung für die egr-1-Induktion nach EPO-Stimulation. Im gleichen Zusammenhang wird auch die Beteiligung von STAT5 beschrieben, das als Bestandteil des JAK2/STAT5-Signalwegs direkt durch JAK2 reguliert wird.

Eine Beteiligung von Lyn an der EPO-abhängigen Regulation eines Zielgens über konkrete Promotorstrukturen ist bisher nicht nachgewiesen worden. Lyn ist eine Tyrosinkinase der Src-Familie, die mit ihrer SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosinreste (hauptsächlich Y479) des EPOR bindet und ebenso wie JAK2 in der Lage ist, den Transkriptionsfaktor STAT5 zu phosphorylieren. Ihre Aktivität ist dabei essentiell für die EPO-abhängige Zelldifferenzierung (Tilbrook et al., 1997, Chin et al., 1998). Des Weiteren wurde für Lyn ein positiv regulierender Effekt auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB beschrieben (Bittorf et al., 2001), für den zumindest auf dem humanen egr-1-Promotor eine mögliche Bindungsstelle existiert (Aicher et al., 1999). Neue Studien an humanen fetalen erythroiden Leberzellen zeigen, dass Lyn eine regulierende Funktion bei der EPO-abhängigen Zellproliferation durch Interaktion mit dem JAK2/STAT5-, dem Raf-MEK-ERK- und mit dem GAB2/Akt/FoxO3-Signalweg übernimmt (Slavova-Azmanova et al., 2014).

Multiple Signalwege sind an der Regulation des egr-1-Promotors beteiligt

In den vergangenen Jahren konnten mehrere Signalwege identifiziert werden, die das Potential zur Aktivierung des egr-1-Promotors besitzen. Bereits 1997 wurde von Watanabe in IL-3/GM-CSF-stimulierten Ba/F3-Zellen eine aktivierende Funktion des Raf-MEK-ERK-Signalwegs am egr-1-Promotor nachgewiesen. Auch in ELM-I-1-Zellen konnte eindeutig ein Zusammenhang zwischen Raf-MEK-ERK-Aktivierung und einer Zunahme der DNA-Bindungsaktivität von Egr-1 nachgewiesen werden (Schulze et al., 2008).

Zunächst untersuchten wir die dosisabhängige EPO-Stimulation von Reportergenkonstrukten, in die jeweils unterschiedlich lange Fragmente des egr-1-Promotors (611 bp, 824 bp, 1097 bp und 1890 bp) integriert worden waren, um Promotorelemente mit induzierender oder inhibierender Potenz auf die egr-1-Transkription zu lokalisieren. In Ba/F3-Zellen, die mit dem kürzesten Promotorfragment (611 bp) transfiziert waren, zeigte sich eine deutliche Steigerung der Luciferaseaktivität, welche in

Zellen mit dem nächstgrößeren Fragment (824 bp) nochmals signifikant zunahm. Bei Transfektion der beiden längeren Promotorkonstrukte (1097 bp, 1890 bp) in Ba/F3-Zellen kam es zu keiner weiteren Steigerung der EPO-induzierten egr-1-Promotoraktivität. Im Zusammenhang mit bereits vorliegenden Ergebnissen, die eine EPO-abhängige, Raf-MEK-ERK-vermittelte egr-1-Induktion in ELM-I-1-Zellen (Schaefer et al., 2004) und eine Raf-MEK-ERK-abhängige Aktivierung von SRE innerhalb des murinen egr-1-Promotors postulierten (Watanabe et al., 1997), kann angenommen werden, dass sowohl das proximale SRE-Cluster, welches sich auf dem 611 bp-Promotorfragment befindet als auch das distale SRE-Cluster, welches auf dem 824 bp-Fragment liegt, eine aktivierende Funktion bei der EPO-stimulierten Egr-1-Synthese in Ba/F3-Zellen besitzt.

Durch Verwendung der MEK1/2-Inhibitoren PD98059 und UO126 konnten wir eine deutliche, dosisabhängige Reduktion der egr-1-Promotoraktivierung nachweisen. Experimente mit den gleichen Inhibitoren wurden bereits mit EPO-stimulierten ELM-I-1-Zellen durchgeführt und zeigten ebenfalls eine Abnahme der egr-1-Induktion (Schaefer et al., 2004). In Experimenten mit Ba/F3-Zellen, die dominant-negatives Ras exprimierten, wurde eine fehlende Stimulierbarkeit des egr-1-Promotors durch IL-3/GM-CSF beobachtet (Watanabe et al., 1997). Auch in anderen Zellsystemen konnten Studien eine eindeutige Abhängigkeit der egr-1-Promotoraktivierung durch den Raf-MEK-ERK-Signalweg feststellen (Kaufmann et al., 2013). Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit publizierten Daten und bestätigen eine Beteiligung des Raf-MEK-ERK-Signalwegs bei der Aktivierung des egr-1-Promotors. Dieser Signalweg scheint der wichtigste Vermittler der EPO-abhängigen Steuerung des egr-1-Promotors zu sein, da bei Verwendung der Maximaldosis (50 μ M) beider MEK1/2-Inhibitoren jeweils eine fast vollständige Inhibition der EPO-induzierten Luciferaseaktivität feststellbar war.

Zur genaueren Analyse der Promotorregulation wurden wiederum parallele Transfektionen mit unterschiedlich langen Promotorfragmenten (611bp, 824bp, 1097bp und 1890bp) durchgeführt. Durch Verwendung der MEK1/2-Inhibitoren konnte auf diese Weise untersucht werden, in welchem Bereich des egr-1-Promotors sich regulatorische Zielstrukturen des Raf-MEK-ERK-Signalwegs befinden und in welchem Ausmaß diese von der Inhibition dieses Signalwegs betroffen sind. In Ba/F3-Zellen, die mit dem kürzesten Promotorfragment transfiziert wurden, beobachteten wir jeweils unter UO126- und PD98059-Behandlung eine deutliche Hemmung der egr-1-Promotoraktivität, die auch bei den längeren Konstrukten in gleichem Maße bestehen blieb. Sowohl die Aktivierung des proximalen als auch des distalen SRE-Clusters scheint durch UO126 und PD98059 in

ähnlich starkem Maße inhibiert zu werden. Diese Ergebnisse sprechen deutlich für eine Raf-MEK-ERK-abhängige Aktivierung sowohl des proximalen als auch des distalen SRE-Clusters (Abb. 24). Beide Elemente sind etablierte Zielstrukturen des Signalwegs am egr-1-Promotor.

Ebenso wie ERK1/2 gehört auch p38 (SAPK2=stress activated protein kinase 2) zur Gruppe der mitogenaktivierten Proteinkinasen. P38-MAPK kann sowohl durch Zytokine als auch durch Stressfaktoren wie UV-Strahlung (Price et al., 1996) aktiviert werden. In erythroleukämischen murinen SKT-6-Zellen wird der p38-MAPK-Signalweg durch EPO-Stimulation aktiviert (Nagata et al., 1998). Auch in der murinen Zelllinie HCD57 kommt es unter EPO-Stimulation zu einer Phosphorylierung der Proteinkinase p38 (Jacobs-Helber et al., 2000). P38-MAPK phosphoryliert ihrerseits den TCF (ternary complex factor) Elk-1 oder Sap-1 (Whitmarch et al., 1997, Janknecht et al., 1997), der durch Komplexierung mit SRF eine potentielle SRE-Aktivierung am egr-1 Promotor zur Folge hat. Zusätzlich wurde auch eine p38-MAPK-abhängige CREB-Phosphorylierung beschrieben, welche zur Bindung von CREB am egr-1-Promotor führt (Rolli et al., 1999). Auch in IL3-stimulierten humanen TF-1-Zellen identifizierte man den p38-MAPK-Signalweg als Induktor der Egr-1-Synthese (Lim et al., 1998). In ELM-I-1-Zellen kam es durch den Einsatz von SB203580, einem selektiven Inhibitor der p38-MAPK-abhängigen Phosphorylierung der MAPKAPK2, zu einer Inhibition der Egr-1 Synthese (Nagata et al., 1998). In glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten konnte eine durch Osteopontin vermittelte egr-1-Induktion durch SB203580 ebenfalls inhibiert werden (Yu et al., 2010). In humanen alveolären Epithelzellen Typ 2 wurde unter Silikat-Inkubation, einem starken Induktor pulmonaler Fibrose, eine egr-1-Induktion sowohl durch Aktivierung der ERK1/2 als auch der p38-MAPK demonstriert (Chu et al., 2013). Des Weiteren wurde in Anisomycin-stimulierten Jurkat-Zellen durch SB203580-Behandlung die Egr-1-Synthese vollständig inhibiert (Rolli et al., 1999). Interessanterweise konnte aber auch eine gesteigerte Egr-1-Expression in SB203580 behandelten ELM-I-1-Zellen beobachtet werden, was möglicherweise durch eine zusätzliche hemmende Funktion des p38-MAPK-Signalwegs auf andere egr-1-aktivierende Signalwege, wie den Raf-MEK-ERK-Signalweg, bedingt ist (Schaefer et al., 2004). In diesem Zusammenhang kam es zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der MEK1/2-Phosphorylierung durch SB203580 (Schaefer et al., 2004). Auch andere Autoren beschrieben bereits eine negative Korrelation zwischen der p38-MAPK und der Phosphorylierung von MEK1/2 (Westermanck et al., 2001, Meyer et al., 2002).

In unseren Versuchen kam es bei Verwendung von SB203580 in EPO-stimulierten Ba/F3-Zellen zu einer deutlichen Abnahme der egr-1-Promotoraktivität, was auf eine Induktion von egr-1 durch den p38-MAPK-Signalweg schließen lässt.

Zur genaueren Lokalisation des inhibierenden Effekts einer SB203580-Behandlung auf die egr-1-Induktion wurden Ba/F3-Zellen untersucht, die parallel mit unterschiedlich langen Promotorkonstrukten transfiziert worden waren. Beim kürzesten Promotorfragment (611 bp) wurde eine deutliche Reduktion der Reportergenaktivität beobachtet, während bei den längeren Promotorkonstrukten unter SB203580-Behandlung nur eine leichte Reduktion der Luciferasesynthese beobachtet wurde. Da der p38-MAPK-Signalweg hauptsächlich über SRE den egr-1-Promotor aktiviert (Lim et al., 1998), sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass vor allem das proximale SRE-Cluster in Position -440 bis -475 über den p38-MAPK-Signalweg angesteuert wird. Scheinbar werden weiter distal liegende Promotorelemente durch den p38-MAPK-Signalweg nicht aktiviert oder sogar inhibiert, sodass die Verwendung von SB203580 an den längeren Konstrukten zu einer abgeschwächten Hemmung der egr-1-Promotoraktivität führt. Eine Inhibition des Raf-MEK-ERK-Signalwegs durch eine p38-MAPK-abhängige MEK1/2-Hemmung (Schaefer et al., 2004), welche vor allem das distale SRE-Cluster auf den drei längeren Promotorkonstrukten betrifft, wäre hierfür eine mögliche Erklärung. Zusätzlich aktiviert der p38-MAPK-Signalweg über CREB-Phosphorylierung auch CRE des egr-1-Promotors (Rolli et al., 1999), von denen zwei im proximalen Promotorbereich lokalisiert sind, was ebenfalls für den ausgeprägten inhibitorischen Effekt von SB203580 auf die egr-1-Aktivität des kürzesten Promotorfragments spricht.

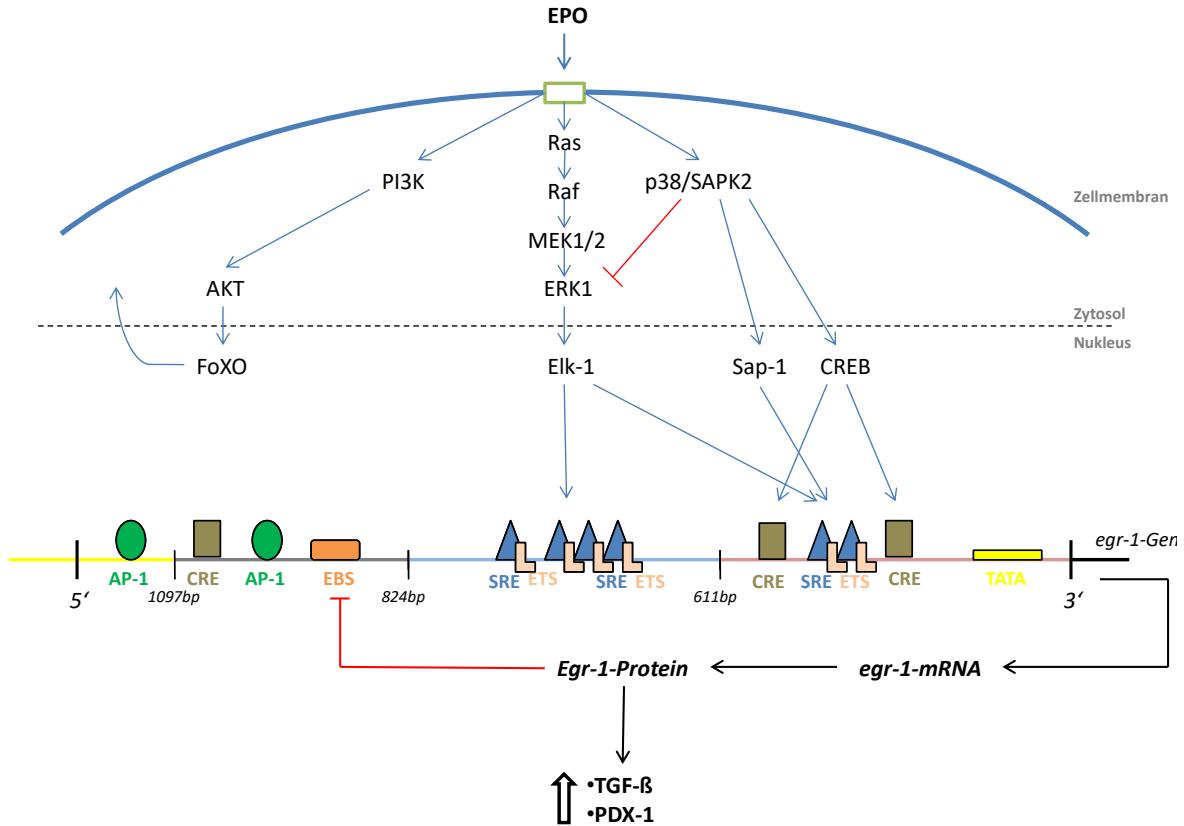


Abb. 24: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Epo-abhängigen Signalwege bei der *egr-1*-Regulation

Die Phosphatidolinol-3-Kinase (PI3K) ist in der Lage, durch Phosphorylierung von Phosphatidylinsitolen die Aktivierung der Proteinkinase B (=AKT) zu fördern und spielt eine Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung. So wird die EPO-abhängige Differenzierung erythroider Zellen durch den PI3K/AKT-Signalweg reguliert (Myklebust et al., 2002). Versuche mit konstitutiv aktiver AKT zeigten eine deutliche Zunahme der EPO-induzierten Zelldifferenzierung (Sivertsen et al., 2006). Die PI3K wird hauptsächlich durch den Tyrosinrest Y479, der sich an der zytosolischen Domäne des EPOR befindet und eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der EPO-abhängigen Steigerung der DNA-Bindungsaktivität von Egr-1 spielt, aktiviert (Schulze et al., 2008). In Epithelzellen erfolgt eine PI3K/AKT-abhängige *egr-1*-Induktion durch Aktivierung des EGFR. Durch Einsatz des PI3K-Inhibitors Ly294002 kann dieser Vorgang gehemmt werden (Cabodi et al., 2008, Cheng et al., 2013). Der Prozess der PI3K/AKT-abhängigen *egr-1*-Induktion beruht auf einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FoxO1, die zur Ausschleusung von FoxO1 aus dem Zellkern und zu dessen Ubiquitinierung führt. FoxO1 übt innerhalb des Zellkerns eine Funktion als Repressor der *egr-1*-Transkription aus (Cabodi et al., 2008). Für eine negativ regulierende Funktion der Transkription ist keine DNA-Bindung von

FoXO notwendig (Bouchard et al., 2004), weshalb sich auch keine Bindungsstelle für diesen Transkriptionsfaktor innerhalb des egr-1-Promotors befindet.

Interessanterweise konnte in murinen Adipozyten eine Egr-1-abhängige Rekrutierung von PTEN mit nachfolgender negativer Regulation des PI3K/AKT-Signalwegs nachgewiesen werden (Yu et al., 2011), was auf eine negative egr-1-Autoregulation in diesen Zellen schließen lässt. Eine PI3K-abhängige, durch den EPOR vermittelte egr-1-Induktion in erythroiden Zellen, wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe gezeigt (Schulze et al., 2008). Durch den Einsatz des PI3K-Inhibitors Ly294002 ließ sich in unseren Experimenten eine deutliche dosisabhängige Reduktion der Luciferaseaktivität nachweisen. Insgesamt lässt sich demzufolge der Schluss ziehen, dass PI3K-vermittelte Signale an der EPO-abhängigen Regulation der Egr-1-Synthese beteiligt sind.

Die Proteinkinase A (PKA) ist eine cAMP-abhängige Serin-Threoninkinase. In erythroiden Zelllinien scheint die PKA das dominierende Ziel von cAMP zu sein, da cAMP-abhängige Ionenkanäle oder EPAC (exchange factor directly activated by cAMP) in erythroiden Zellsystemen vermutlich nicht exprimiert werden (Boer et al., 2003). Nach ihrer Aktivierung transloziert die PKA in den Nukleus, wo Transkriptionsfaktoren wie CREB, SP-1(specifity protein-1) und AP-1 (activator protein-1) durch die PKA phosphoryliert werden (Parker et al., 1996, Rohlff et al., 1997, Garcia et al., 1999). CREB wird durch die PKA am Serinrest 133 phosphoryliert, wodurch Homodimere entstehen, co-aktivierende Proteine wie CBP/p300 rekrutiert werden und eine Bindung dieses Komplexes am CRE des jeweiligen Promotors ermöglicht wird (Kasper et al., 2010). Die PKA-Aktivität kann durch den PKI (protein kinase inhibitor) regulatorisch beeinflusst werden (Boer et al., 2003).

In Gefäßmuskelzellen von Ratten konnte eine durch PKA- und EPAC-vermittelte Reduktion der Egr-1-Expression beobachtet werden, welche eine Hemmung der Zellproliferation zur Folge hatte (Kimura et al., 2014). Diese cAMP-abhängige egr-1-Repression wurde in diesem Fall jedoch nicht über CRE, sondern über SRE innerhalb des egr-1-Promotors vermittelt. Durch Aktivierung von PKA und EPAC kam es hierbei zu einer Veränderung des Zytoskeletts, die wahrscheinlich die nukleäre Translokation von ERK1/2 verhinderte und somit den Raf-MEK-ERK-Signalweg inhibierte (Kimura et al., 2014). In Endothelzellen von Ratten wurde hingegen eine cAMP-abhängige Induktion von egr-1 beobachtet (Kimura et al., 2014).

Die Stimulation von INS-1-Zellen mit Quercetin führte zu einer starken PKA-abhängigen, aber CRE-unabhängigen Aktivierung des egr-1-Promotors. Dabei kam es zu einer direkten

SRF-vermittelten SRE-Aktivierung, die ohne Bindung eines TCF ablief (Chang et al., 2012).

Die regulatorische Funktion von cAMP-abhängigen Signalen, wie der PKA, auf die Egr-1-Synthese ist demzufolge sehr stark vom Zelltyp abhängig.

cAMP-abhängigen Signalen wird eine Bedeutung bei der Entwicklung erythroider Zellen zugesprochen. Vor allem der Übergang von Zellproliferation zu Zelldifferenzierung scheint zumindest teilweise durch cAMP-vermittelte Signale reguliert zu werden (Boer et al., 2003). Die PKA ist in der Lage - in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad - den Raf-MEK-ERK-Signalweg in erythroiden Zellen zu regulieren (Boer et al., 2003). Jedoch zeigten ausführliche Analysen, dass EPO nicht in der Lage ist, cAMP direkt zu generieren. Der Mechanismus einer EPO-abhängigen PKA-Aktivierung ist also unklar (Boer et al., 2003).

Wir konnten in unseren Versuchen durch Anwendung des PKA-Inhibitors H-89 eine deutliche Abnahme der Promotoraktivierung feststellen, was eindeutig auf eine Abhängigkeit der egr-1-Induktion von PKA-abhängigen Prozessen in Ba/F3-Zellen schließen lässt. Bei der Untersuchung des Einflusses von H-89 auf unterschiedliche Promotorvarianten zeigte sich eine ausgeprägte Inhibition der egr-1-Promotoraktivität beim kürzesten Fragment. In diesem Bereich liegen zwei CRE sowie das proximale SRE-Cluster, die potentiell alle eine PKA-vermittelte egr-1-Induktion bewirken können. Bei längeren Promotorfragmenten zeigte sich der inhibitorische Effekt von H-89 im Verhältnis deutlich abgeschwächt, was darauf schließen lässt, dass sich im distalen Promotorbereich keine PKA-abhängigen Elemente mit egr-1-induzierender Funktion befinden. Weiterhin unklar bleibt jedoch, über welchen Mechanismus EPO die Aktivierung der PKA realisiert. Des Weiteren ist derzeit nicht geklärt, wie stark der direkte Einfluss der PKA auf die Egr-1-Synthese durch CREB und SRF ist und inwieweit PKA eine regulierende Funktion auf den Raf-MEK-ERK-Signalweg ausübt und somit Einfluss auf die egr-1-Regulation hat.

Funktionen von Egr-1 als Transkriptionsfaktor

Um die Rolle von Egr-1 als EPO-abhängigem Transkriptionsfaktor verstehen zu können, fehlen bisher insbesondere Informationen über die Regulation konkreter Zielgene. Hinweise zu potentiellen Genen gibt es aus anderen Systemen. Basierend auf entsprechenden Literaturdaten wurden Gene für die Analyse ausgewählt, die in ihrem regulatorischen Bereich Egr-1-Bindungsstellen aufweisen. In unseren Versuchen konnten wir in Ba/F3-EPOR-Zellen mit TGF- β , PDX-1 und PTEN mehrere Gene identifizieren, von denen bisher eine Zunahme der mRNA-Synthese nach EPO-Stimulation nicht bekannt war.

Eine schnelle und vorübergehende Induktion von *egr-1* ist unter anderem essentiell zur Heilung von Gewebefekten, bei denen es über Egr-1 zu einer TGF- β -vermittelten Steigerung der Kollagensynthese kommt (Khachigian 2006). In einer Studie über die Entwicklung der systemischen Sklerodermie, bei der die Synthese von TGF- β in humanen Fibroblasten von Lungenbiopsaten untersucht wurde, konnte eine persistierende hohe Egr-1-Synthese beobachtet werden (Bhattacharyya et al., 2011). In unseren Versuchen konnten wir nach 30-minütiger EPO-Stimulation über einen Zeitraum von zwei Stunden eine kontinuierlich zunehmende TGF- β -Expression feststellen. Unter diesen Umständen zeigte sich bei Experimenten mit spezifischen Antikörpern eine verstärkte DNA-Bindung von Egr-1 am TGF- β -Promotor. Unsere Daten sprechen daher im Zusammenhang mit bereits publizierten Ergebnissen für eine transaktivierende Funktion von Egr-1 am TGF- β -Promotor.

Untersuchungen an murinen pankreatischen β -Zellen sowie an Insulinomzellen der Ratte (INS-1) machten deutlich, dass Egr-1 an proximale und distale Bereiche der regulatorischen Domäne von PDX-1 (*pancreas duodenum homeobox-1*) bindet (Eto et al., 2007, Mayer et al., 2011). Dabei wurden im PDX-1-Promotor der Maus mehrere Konsensussequenzen, die für die Bindung von Egr-1 verantwortlich sind, identifiziert (Eto et al., 2007). Die Regulation der Egr-1-Synthese in pankreatischen β -Zellen wird durch den extrazellulären Glukosespiegel gesteuert (Eto et al., 2007). Egr-1 ist als Transkriptionsfaktor verantwortlich für die Induktion von PDX-1, einem Regulator der Entwicklung pankreatischer β -Zellen (Eto et al., 2007) sowie einem Hauptinduktor der Insulinproduktion (Thiel et al., 2014). Eine defizitäre PDX-1-Expression resultiert in Insulinmangel, Hyperglykämie und einer beschleunigten β -Zell-Apoptose (Eto et al., 2007). Bei Abnahme der Transkription von *egr-1* konnte dementsprechend eine reduzierte Synthese von PDX-1 und Insulin beobachtet werden (Müller et al., 2012). Unter EPO-

Stimulation verzeichneten wir in unseren Versuchen in Ba/F3-Zellen eine transiente Zunahme der PDX-1-mRNA sowie eine deutliche Zunahme der Bindungsaktivität von Egr-1 am PDX-1-Promotor. Unsere Resultate reihen sich somit schlüssig in publizierte Daten ein und zeigen, dass die Regulation des PDX-1-Gens durch Egr-1 nicht auf Zellen des Pankreas beschränkt ist. Unklar bleibt allerdings, welche Funktion PDX-1 in der EPO-abhängigen Regulation spielt.

PTEN (phosphatase and tensing homolog) ist ein proapoptotisches Tumorsuppressorgen, dessen Fehlregulation mit der Entstehung humaner Krebszellen in Verbindung gebracht wird (Virolle et al., 2001). Bei Mäusen, die gegenüber UV-Licht exponiert wurden, zeigte sich *in vivo* eine Expressionssteigerung des Egr-1-Proteins sowie dessen Bindung am PTEN-Promotor mit nachfolgender PTEN-Induktion und Zellapoptose (Virolle et al., 2001). Am PTEN-Promotor wurde dementsprechend die Sequenz GC GG CG GG CG, eine potentielle Egr-1-Bindungsstelle, identifiziert (Virolle et al., 2001). Auch in humanen Plattenepithelkarzinomzellen, die mit Caliculin A, einem bekannten Induktor der Zellapoptose, behandelt wurden, konnte eine Zunahme der egr-1-Phosphorylierung mit folgender PTEN-Induktion sowie eine Bindung von Egr-1 am PTEN-Promotor nachgewiesen werden (Okamura et al., 2004). Ein enger Zusammenhang zwischen vermehrter Egr-1-Expression und dadurch bedingter PTEN-Induktion existiert ebenso in murinen Kolonkarzinomzellen (Kim et al., 2014). PTEN agiert hierbei als negativer Regulator des PI3K/AKT-Signalwegs, welcher eine Rolle bei der Invasion von Tumorzellen zu spielen scheint. Humane Synovialsarkomzellen gehen unter HDAC-Inhibitor-Behandlung in Apoptose. Die Egr-1-abhängige Aktivierung von PTEN führt hierbei zu einer Inhibition der überlebenswichtigen Funktion von AKT (Su et al., 2010). Auch in murinen Adipozyten konnte eine Egr-1-abhängige Rekrutierung von PTEN mit nachfolgender negativer Regulation des PI3K/AKT-Signalwegs nachgewiesen werden (Yu et al., 2011).

Umgekehrt resultiert eine Egr-1-Herabregulation zu einer verminderten PTEN-Synthese, was in ovariellen Karzinomzellen zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs führt (Lau et al., 2011).

Wir konnten feststellen, dass es in EPO-stimulierten Ba/F3-Zellen neben einem Anstieg der egr-1-mRNA simultan zu einem geringen Anstieg der PTEN-mRNA-Konzentration kam, eine Bindung von Egr-1 am PTEN-Promotor ließ sich hier jedoch nicht nachweisen.

Ausblick

In dieser Arbeit konnte die bereits in früheren Untersuchungen postulierte EPO-abhängige Induktion des egr-1-Gens in murinen Ba/F3-Zellen bestätigt werden. Hierbei kristallisierte sich der Raf-MEK-ERK-Signalweg als dominierende Signalkaskade heraus, die sowohl das proximal als auch das distal gelegene SRE-Cluster zur maximalen Aktivierung des egr-1-Promotors benötigt.

Des Weiteren konnte in unseren Untersuchungen in Ba/F3-Zellen eine physische Bindung des Transkriptionsfaktors Egr-1 am Promotor von TGF- β und von PDX-1 sowie eine simultane Zunahme der jeweiligen mRNA unter EPO-Stimulation nachgewiesen werden. Auch die mRNA-Synthese von PTEN wurde durch EPO stimuliert.

In folgenden Arbeiten muss nun untersucht werden, welche Aufgaben die Genprodukte von TGF- β , PDX-1 und PTEN im erythroiden Zellsystem übernehmen. Zusätzlich bedarf es der Identifizierung weiterer Egr-1-Zielgene, um die Funktionen des Transkriptionsfaktors Egr-1 sowohl in erythroiden als auch in nichteryroiden EPO-sensitiven Zellen vollständig verstehen zu können.

7. Zusammenfassung

Das ubiquitär exprimierte Protein Egr-1 übt in tierischen Organismen eine Funktion als Transkriptionsfaktor aus und kann proliferierende, differenzierende sowie pro- und antiapoptotische Prozesse innerhalb unterschiedlicher Zellen beeinflussen. Aus vorhergehenden Arbeiten ist bekannt, dass die Expression des Egr-1-Proteins unter anderem durch das Zytokin Erythropoetin induziert wird.

Unter Berücksichtigung von in der Literatur bereits vorliegenden Resultaten, wurde in dieser Arbeit analysiert, welche Bereiche des egr-1-Promotors der Ratte nach EPO-Stimulation an der Regulation der egr-1-Transkription beteiligt sind und welche intrazellulären Signalwege hierfür rekrutiert werden. Des Weiteren wurde untersucht, in welchem Maße die Promotoren der Gene TGF- β , PDX-1 und PTEN direkt durch Egr-1 beeinflusst werden.

Die in unseren Versuchen verwendeten Ba/F3-EPOR-Zellen sind murine pro-B-Zellen, die den EPO-Rezeptor stabil überexprimieren und somit für die Analyse EPO-abhängiger intrazellulärer Prozesse geeignet sind. Durch transiente Transfektion eines Reportergenvektors mit Luciferaseaktivität in die oben genannte Zelllinie, in den zuvor unterschiedliche egr-1-Promotorvarianten kloniert worden waren, konnte das Ausmaß einer EPO-abhängigen Aktivierung des egr-1-Promotors beurteilt werden.

Durch Verwendung signalwegspezifischer Inhibitoren konnte die Beteiligung konkreter Signalwege bzw. DNA-Elemente an der EPO-stimulierten egr-1-Regulation aufgeklärt werden. Der Raf-MEK-ERK-Signalweg vermittelt seine promotoraktivierende Funktion über ein proximales und distales SRE-Cluster, während der p38-MAPK-Signalweg nur das proximale SRE-Cluster zur Promotoraktivierung benötigt. Eine bereits postulierte PI3K-vermittelte Aktivierung des Raf-MEK-ERK-Signalwegs durch EPO-Stimulation konnten wir in unserer Arbeit bestätigen. Die PKA aktiviert den egr-1-Promotor über proximal lokalisierte regulatorische Elemente, wobei in folgenden Arbeiten eine genauere Differenzierung zwischen CRE- und SRE-abhängiger Promotoraktivierung durch die PKA erfolgen muss.

Unsere Untersuchungen von Ba/F3-EPOR-Zellen, die JAK2 und Lyn überexprimierten, sowie die Verwendung dominant-negativer Konstrukte dieser im EPOR-Komplex lokalisierten Tyrosinkinasen, beweisen eine Beteiligung dieser Enzyme an der Regulation des egr-1-Gens.

Für Egr-1 selbst konnte sowohl die physische Interaktion mit der Egr-1-Bindungsstelle im Promotor als auch eine inhibierende Funktion dieses Elements für die Promotoraktivität

gezeigt werden. Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, dass Egr-1 in EPO-stimulierten Zellen an die Promotoren der Gene für TGF- β und PDX-1 bindet und eine Zunahme der mRNA-Synthese zu beobachten ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Regulation des egr-1-Promotors der Ratte zeigen deutliche Parallelen zu den Verhältnissen im murinen und humanen System. Unklar bleibt die Frage, welche Bedeutung die durch EPO induzierte, Egr-1-vermittelte Expressionssteigerung der oben genannten Zielgene in vivo hat. Zukünftige Untersuchungen sollten sich deshalb insbesondere mit diesem Zusammenhang auseinandersetzen.

8. Literaturverzeichnis

Aicher WK, Sakamoto KM, Hack A, Eibel H (1999) Analysis of functional elements in the human egr-1 gene promotor. *Rheumatol Int.* 1999;18(5-6):207-14

Amanullah A, Hoffman B, Liebermann DA (2000) Deregulated E2F-1 blocks terminal differentiation and loss of leukemogenicity of M1 myeloblastic leukemia cells without abrogating induction of p15INK4B and p16INK4A. *Blood* 96: 475-482

Barber DL, Corless CN, Xia K, Roberts TM, D'Andrea AD (1997) Erythropoietin activates Raf1 by an Shc-independent pathway in CTLL-EPO-R cells. *Blood*. 1997 Jan 1;89(1):55-64

Bard-Chapeau EA, Hevener AL, Long S, Zhang EE, Olefsky JM, Feng GS (2005) Deletion of Gab1 in the liver leads to enhanced glucose tolerance and improved hepatic insulin action. *Nat Med.* 2005 May;11(5):567-71

Bauer I, Hohl M, Al-Sarraj A, Vinson C, Thiel G (2005) Transcriptional activation of the egr-1 gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate and extracellular signal-regulated protein kinase. *Arch Biochem Biophys.* 2005 Jun 1;438(1):36-52

Beckmann AM, Wilce PA (1992) Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int* 31:477-510

Bernal-Mizrachi E, Wice B, Inoue H, Permutt MA (2000) Activation of serum response factor in the depolarization induction of egr-1 transcription in pancreatic islet beta-cells. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25681-9

Bhattacharyya S, Wu M, Fang F, Tourtellotte W, Feghali-Bostwick C, Varga J (2011) Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biol.* 2011 May;30(4):235-42

Bittorf T, Jaster R, Lüdtke B, Kamper B, Brock J (1997) Requirement for JAK2 in Erythropoietin- induced signalling pathways. *Cellular Signalling* 9, 1997 Jan;9(1):85-89

Bittorf T, Büchse T, Sasse T, Jaster R, Brock J (2001) Activation of the transcription factor NF-kappaB by the erythropoietin receptor: structural requirements and biological significance. *Cell Signal.* 2001 Sep;13(9):673-81

Boer AK, Drayer AL, Vellenga E (2003) cAMP/PKA-mediated regulation of erythropoiesis. *Leuk Lymphoma. 2003 Nov;44(11):1893-901*

Bouchard C, Marquardt J, Brás A, Medema RH, Eilers M (2004) Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J. 2004 Jul 21;23(14):2830-40*

Bouscary D, Pene F, Claessens YE, Muller O, Chretien S, Fontenay-Roupie M (2003) Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood 2003;101:3436-43*

Boxer LM, Dang CV (2001) Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene. 2001 Sep 10;20(40):5595-610*

Brines M, Cerami A (2006) Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney Int. 2006 Jul;70(2):246-50*

Broxmeyer HE (2013) Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. *J Exp Med. 2013 Feb 11;210(2):205-8*

Cabodi S, Morello V, Masi A, Cicchi R, Broggio C, Distefano P, Brunelli E, Silengo L, Pavone F, Arcangeli A, Turco E, Tarone G, Moro L, Defilippi P (2008) Convergence of integrins and EGF receptor signaling via PI3K/Akt/FoxO pathway in early gene egr-1 expression. *J Cell Physiol. 2009 Feb;218(2):294-303*

Cao X, Mahendran R, Guy GR, Tan YH (1993) Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J Biol Chem. 1993 Aug 15;268(23):16949-57*

Chang SY, Cho JM, Kim DB, Jang HJ, Ko SH, Jo YH, Kim MJ (2012) Molecular mechanisms of early growth response protein-1 (EGR-1) expression by quercetin in INS-1 beta-cells. *J Cell Biochem. 2012 May;113(5):1559-68*

Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M (2011) Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochem Pharmacol. 2011 Nov 15;82(10):1291-303*

Cheng JC, Chang HM, Leung PC (2013) Egr-1 mediates epidermal growth factor-induced downregulation of E-cadherin expression via Slug in human ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2013 Feb 21;32(8):1041-9

Chin H, Arai A, Wakao H, Kamiyama R, Miyasaka N, Miura O (1998) Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3734-45

Christy BA, Lau LF, Nathans D (1988) A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with “zinc finger” sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7857-7861

Christy B, Nathans D (1989) Functional serum response elements upstream of the growth factor-inducible gene zif268. *Mol Cell Biol*. 1989 Nov;9(11):4889-95

Chu L, Wang T, Hu Y, Gu Y, Su Z, Jiang H (2013) Activation of egr-1 in human lung epithelial cells exposed to silica through MAPKs signaling pathways. *PLoS One*. 2013 Jul 18;8(7):e68943

Cibelli G, Policastro V, Rössler OG, Thiel G (2002) Nitric oxide-induced programmed cell death in human neuroblastoma cells is accompanied by the synthesis of egr-1, a zinc finger transcription factor. *J Neurosci Res*. 2002 Feb 15;67(4):450-60

Digicaylioglu M, Lipton SA (2001) Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*. 2001 Aug 9;412(6847):641-7

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA (2001) C.elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001;107(1):43-54

Erslev AJ (1997) Clinical erythrokinetics: a critical review. *Blood Rev*. 1997 Sep;11(3):160-7

Eto K, Kaur V, Thomas MK (2006) Regulation of Insulin Gene Transcription by the Immediate-Early Growth Response Gene egr-1. *Endocrinology* 147(6):2923-2935

Eto K, Kaur V, Thomas MK (2007) Regulation of pancreas duodenum homeobox-1 expression by early growth response-1. *J Biol Chem*. 2007 Mar 2;282(9):5973-83

Fairman J, Chumakov I, Chinault AC, Nowell PC, Nagarajan L (1995) Physical mapping of the minimal region of loss in 5q- chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA. 1995 Aug 1;92(16):7406-10.*

Frank SJ (2002) Receptor dimerization in GH and erythropoietin action—it takes two to tango, but how? *Endocrinology 2002;143:2-10*

García MA, Campillos M, Marina A, Valdivieso F, Vázquez J (1999) Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *FEBS Lett. 1999 Feb 5;444(1):27-31*

Gashler AL, Swaminathan S, Sukhatme VP (1993) A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor egr-1, *Mol Cell Biol. 1993 Aug;13(8):4556-71*

Gashler A, Sukhatme V P (1995) Early growth response protein 1 (egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 50, 191*

Gibbs JD, Liebermann DA, Hoffman B (2007) Egr-1 abrogates the E2F-1 block in terminal myeloid differentiation and suppresses leukemia, *Oncogene. 2008 Jan 3;27(1):98-106*

Gong LB, He L, Liu Y, Chen XQ, Jiang B (2005) Expression of early growth response factor-1 in rats with cerulein-induced acute pancreatitis and its significance, *World J Gastroenterol. 2005 Aug 28;11(32):5022-4*

Gregg J, Fraizer G (2011) Transcriptional Regulation of EGR1 by EGF and the ERK Signaling Pathway in Prostate Cancer Cells. *Genes Cancer. 2011 Sep;2(9):900-9*

Grunnet LG, Aikin R, Tonnesen MF, Paraskevas S, Blaabjerg L, Størling J, Rosenberg L, Billestrup N, Maysinger D, Mandrup-Poulsen T (2009) Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells. *Diabetes. 2009 Aug;58(8):1807-15*

Hand CC, Brines M (2011) Promises and pitfalls in erythropoietin-mediated tissue protection: are nonerythropoietic derivatives a way forward? *J Investig Med. 2011 Oct;59(7):1073-82*

Haq R, Halupa A, Beattie BK, Mason JM, Zanke BW, Barber DL (2002) Regulation of erythropoietin-induced STAT serine phosphorylation by distinct mitogenactivated

protein kinases. *J Biol Chem* 2002;277:17359–66

Hoffmann E, Ashouri J, Wolter S, Doerrie A, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Wagner EF, Troppmair J, Mackman N, Kracht M (2008) Transcriptional regulation of EGR-1 by the interleukin-1-JNK-MKK7-c-Jun pathway. *J Biol Chem.* 2008 May 2;283(18):12120-8

Huang R P, Fan Y, de Belle I, Niemeyer C, Gottardis MM, Mercola D, Adamson E D (1997) Decreased egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int. J. Cancer* 72, 102–109

Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin.. *Nature* 1985;313:806–10

Jacobs-Helber SM, Ryan JJ, Sawyer ST (2000) JNK and p38 are activated by erythropoietin (EPO) but are not induced in apoptosis following EPO withdrawal in EPO-dependent HCD57 cells. *Blood.* 2000 Aug 1;96(3):933-40

Janknecht R, Hunter T (1997) Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J.* 1997 Apr 1;16(7):1620-7

Jegalian AG, Wu H (2002) Differential roles of SOCS family members in EpoR signal transduction. *J Interferon Cytokine Res.* 2002; 22(8):853–860

Joslin M, Fernald AA, Tenant TR, Davis E, Scott CK, Anastasi J, Crispino JD, LeBeau MM (2007) Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood.* Jul 15, 2007; 110(2): 719–726

Josefsen K, Sørensen LR, Buschard K, Birkenbach M (1999) Glucose induces early growth response gene (egr-1) expression in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 42:195–203

Kacheva S, Lenzen S, Gurgul-Convey E (2011) Differential effects of proinflammatory cytokines on cell death and ER stress in insulin-secreting INS1E cells and the involvement of nitric oxide. *Cytokine.* 2011 Aug;55(2):195-201

Kang JH, Kim MJ, Ko SH, Jeong IK, Koh KH, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ, Kim MS, Jo YH (2006) Upregulation of rat Ccnd1 gene by exendin-4 in pancreatic beta cell line INS-1: interaction of early growth response-1 with cis-regulatory element. *Diabetologia.* 2006 May;49(5):969-79

Kang JH, Kim MJ, Jang HI, Koh KH, Yum KS, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ, Kim MS, Jo YH (2007) Proximal cyclic AMP response element is essential for exendin-4 induction of rat EGR-1 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Jan;292(1):E215-22

Kasper LH, Lerach S, Wang J, Wu S, Jeevan T, Brindle PK (2010) CBP/p300 double null cells reveal effect of coactivator level and diversity on CREB transactivation. *EMBO J.* 2010 Nov 3;29(21):3660-72

Kaufmann A, Keim A, Thiel G (2013) Regulation of immediate-early gene transcription following activation of G α (q)-coupled designer receptors. *J Cell Biochem.* 2013 Mar;114(3):681-96

Kertesz N, Wu J, Chen TH, Sucov HM, Wu H (2004) The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol.* 2004 Dec 1;276(1):101-10

Khachigian LM, Williams AJ, Collins T (1995) Interplay of Sp1 and egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promotor in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem;* 270: 27679-86

Khachigian LM (2006) Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circ Res.* 2006 Feb 3;98(2):186-91

Kim J, Kang HS, Lee YJ, Lee HJ, Yun J, Shin JH, Lee CW, Kwon BM, Hong SH (2014) EGR1-dependent PTEN upregulation by 2-benzoyloxy cinnamaldehyde attenuates cell invasion and EMT in colon cancer. *Cancer Lett.* 2014 Jul 10;349(1):35-44

Kimura TE, Duggirala A, Hindmarch CC, Hewer RC, Cui MZ, Newby AC, Bond M (2014) Inhibition of Egr1 expression underlies the anti-mitogenic effects of cAMP in vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Jul;72:9-19

Klingmueller U, Wu H, Hsiao J G, Toker A, Duckworth B C, Cantley L C, Lodish H F (1997) Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(1997), 3016-3021

- Kolonics A, Apáti A, Jánossy J, Brózik A, Gáti R, Schaefer A, Magócsi M (2001)** Activation of Raf/ERK1/2 MAP kinase pathway is involved in GM-CSF-induced proliferation and survival but not in erythropoietin-induced differentiation of TF-1 cells. *Cell Signal.* 2001 Oct;13(10):743-54
- Kuo M, Allis, C (1999)** In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods*, 19(1999), 425-433
- Krishnaraju K, Nguyen HQ, Liebermann D A, Hoffman B (1995)** The zinc finger transcription factor egr-1 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5499–5507
- Krishnaraju K, Hoffman B, Liebermann DA (2001)** Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages. *Blood.* 2001 Mar 1;97(5):1298-305
- Krosl J, Damen JE, Krystal G, Humphries RK (1996)** Interleukin-3 (IL-3) inhibits erythropoietin-induced differentiation in Ba/F3 cells via the IL-3 receptor alpha subunit. *J Biol Chem.* 1996 Nov 1;271(44):27432-7
- Lacombe C, J L Da Silva, P Bruneval, J G Fournier, F Wendling, N Casadevall, J P Camilleri, J Bariety, B Varet, and P Tambourin (1988)** Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest.* 1988 Feb; 81(2): 620–623
- Lau MT, Klausen C, Leung PC (2011)** E-cadherin inhibits tumor cell growth by suppressing PI3K/Akt signaling via β -catenin-Egr1-mediated PTEN expression. *Oncogene.* 2011 Jun 16;30(24):2753-66
- Lei H, Quelle FW (2009)** FoXO transcription factors enforce cell cycle checkpoints and promote survival of hematopoietic cells after DNA damage. *Mol Cancer Res* 2009;7:1294–303
- Lemaire P, Vesque C, Schmitt J, Stunnenberg H, Frank R, Charnay P (1990)** The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3456–3467
- Lim CP, Jane N, Cao X (1998)** Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1. *Oncogene* 16, 2915-2926

- Lo LW, Cheng JJ, Chiu JJ, Wung BS, Liu YC, Wang DL (2001)** Endothelial exposure to hypoxia induces egr-1 expression involving PKCalpha-mediated Ras/Raf-1/ERK1/2 pathway. *J Cell Physiol. 2001 Sep;188(3):304-12*
- Loo LW, Grove DI, Williams EM (2004)** Array comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in breast cancer subtypes. *Cancer Res.;64:8541-8549*
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001)** Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J. 2001;20(18):5197-5206*
- Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R (1994)** A novel site of erythropoietin production: oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J. Biol. Chem. 269 19488-19493*
- Maxwell PH, Ferguson DJ, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Doe BG, Johnson MH, Ratcliffe PJ (1994)** Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood. 1994 Sep 15;84(6):1823-30*
- Mayer SI (2009)** Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Egr-1 : Signaltransduktion, Zielgene und Funktion. <http://scidok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2009/2043>
- Mayer SI, Müller I, Mannebach S, Endo T, Thiel G (2011)** Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: activation of egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors. *J Biol Chem. 2011 Mar 25;286(12):10084-96*
- Mello CV, Vicario DS, Clayton DF (1992)** Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Aug 1;89(15):6818-22*
- Melloul D (2004)** Transcription factors in islet development and physiology: role of PDX-1 in β -cell function. *Ann NY Acad Sci 1014:28-37*
- Mellström B, Pipaón C, Naranjo JR, Perez-Castillo A, Santos A (1994)** Differential effect of thyroid hormone on NGFI-A gene expression in developing rat brain. *Endocrinology 135, 583-588*

Meyer RG, Küpper JH, Kandolf R, Rodemann HP (2002) Early growth response-1 gene (egr-1) promotor induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells in vitro. *Eur J Biochem.* 2002 Jan;269(1):337-46

Milbrandt J (1987) A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science.* 1987 Nov 6;238(4828):797-9

Minoo P, Zadeh MM, Rottapel R, Lebrun JJ, Ali S (2004) A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling. *Blood.* 2004;103(4):1398-1407

Müller I, Rössler OG, Wittig C, Menger MD, Thiel G (2012) Critical role of Egr transcription factors in regulating insulin biosynthesis, blood glucose homeostasis, and islet size. *Endocrinology.* 2012 Jul;153(7):3040-53

Myklebust JH, Blomhoff HK, Rusten LS, Stokke T, Smeland EB (2002) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* 2002 Sep;30(9):990-1000

Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ, Todokoro K (1998) Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood.* 1998 Sep 15;92(6):1859-69

Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV (1999) MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999 May 13;18(19):3004-16

Nguyen HQ, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA (1993) The zinc finger transcription factor egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell.* 1993 Jan 29;72(2):197-209

Okamura H, Yoshida K, Morimoto H, Haneji T (2004) PTEN expression elicited by EGR-1 transcription factor in calyculin A-induced apoptotic cells. *J Cell Biochem.* 2005 Jan 1;94(1):117-25

Ouellette AJ, Malt RA, Sukhatme VP, Bonventre JV (1990) Expression of two "immediate early" genes, egr-1 and c-fos, in response to renal ischemia and during compensatory renal hypertrophy in mice. *J Clin Invest.* 1990 Mar;85(3):766-71

Pagel JI, Deindl E (2011) Early growth response 1--a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades. *Indian J Biochem Biophys. 2011 Aug;48(4):226-35*

Palacios R, Henson G, Steinmetz M, McKearn J.P (1984) Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature 309(1984),126-131*

Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, Hoeger C, Montminy MR (1996) Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol. 1996 Feb;16(2):694-703*

Pavletich NP, Pabo CO (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science. 1991 May 10;252(5007):809-17*

Price MA, Cruzalegui FH, Treisman R (1996) The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *EMBO J. 1996 Dec 2; 15(23): 6552-6563*

Rizzo JD, Brouwers M, Hurley P, Seidenfeld J, Arcasoy MO, Spivak JL, Bennett CL, Bohlius J, Evanchuk D, Goode MJ, Jakubowski AA, Regan DH, Somerfield MR; American Society of Hematology and the American Society of Clinical Oncology Practice Guideline Update Committee (2010) American Society of Hematology/American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on the use of epoetin and darbepoetin in adult patients with cancer. *Blood. 116:4045-4059*

Rohlf C, Ahmad S, Borellini F, Lei J, Glazer RI (1997) Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem. 1997 Aug 22;272(34):21137-41*

Rolli M, Kotlyarov A, Sakamoto KM, Gaestel M, Neininger A (1999) Stress-induced stimulation of early growth response gene-1 by p38/stress-activated protein kinase 2 is mediated by a cAMP-responsive promotor element in a MAPKAP kinase 2-independent manner. *J Biol Chem. 1999 Jul 9;274(28):19559-64*

Ronski K, Sanders M, Burleson JA, Moyo V, Benn P, Fang M (2005) Early growth response gene 1 is deleted in estrogen receptor-negative human breast carcinoma. *Cancer. 2005 Sep 1;104(5):925-30*

Russo MW, Sevetson BR, Milbrandt J (1995) Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jul 18;92(15):6873-7*

Sakamoto KM, Bardeleben C, Yates KE, Raines MA, Golde DW, Gasson JC (1991) 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, EGR-1/TIS8. *Oncogene. 1991 May;6(5):867-71*

Sakamoto KM, Fraser JK, Lee HJ, Lehman E, Gasson JC (1994) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 signaling pathways converge on the CREB-binding site in the human egr-1 promotor. *Mol Cell Biol. 1994 Sep;14(9):5975-85*

Schaefer A, Kósa F, Bittorf T, Magósci M, Rosche A, Ramirez-Chávez Y, Marotzki S, Marquardt H (2004) Opposite effects of inhibitors of mitogen-activated protein kinase pathways on the *egr-1* and β -globin expression in erythropoietin-responsive murine erythroleukemia cells. *Cell. Signalling 2004 Feb, 223-234*

Schratt G, Weinhold B, Lundberg AS, Schuck S, Berger J, Schwarz H, Weinberg RA, Rüther U, Nordheim A (2001) Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol. 2001 Apr;21(8):2933-43*

Schulze C, Büchse T, Mikkat S, Bittorf T (2008) Erythropoietin receptor-mediated egr-1 activation: structural requirements and functional implications. *Cell Signal. 2008 Oct;20(10):1848-54*

Schwachtgen JL, Campbell CJ, Braddock M (2000) Full promotor sequence of human early growth response factor-1 (egr-1): demonstration of a fifth functional serum response element. *DNA Seq. 2000;10(6):429-32*

Shafarenko M, Liebermann DA, Hoffman B (2005) egr-1 abrogates the block imparted by c-Myc on terminal M1 myeloid differentiation. *Blood. 2005 Aug 1;106(3):871-878*

Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem. 1999;68:821-61*

Shen N, Yu X, Pan FY, Gao X, Xue B, Li CJ (2011) An Early Response Transcription Factor, egr-1, Enhances Insulin Resistance in Type 2 Diabetes with Chronic Hyperinsulinism. *The Journal of biological chemistry Vol. 286, No. 16, pp. 14508–14515, April 22, 2011*

Shimizu N, Ohta M, Fujiwara C, Sagara J, Mochizuki N, Oda T, Utiyama H (1992) A gene coding for a zinc finger protein is induced during 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated HL-60 cell differentiation. *J Biochem. 1992 Feb;111(2):272-7*

Sivertsen EA, Hystad ME, Gutzkow KB, Døsen G, Smeland EB, Blomhoff HK, Myklebust JH (2006) PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. *Br J Haematol. 2006 Oct;135(1):117-28*

Slavova-Azmanova NS, Kucera N, Louw A, Satiaputra J, Handoko A, Singer P, Stone L, McCarthy DJ, Klinken SP, Hibbs ML, Ingle E (2014) Lyn kinase plays important roles in erythroid expansion, maturation and erythropoietin receptor signalling by regulating inhibitory signalling pathways that control survival. *Biochem J. 2014 May 1;459(3):455-66*

Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF (2001) Ineffective erythropoiesis in Stat5a(−/−)5b(−/−) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood 2001;98:3261–73*

Spivak JL (2005) The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nat Rev Cancer 2005;5:543–55*

Størling J, Binzer J, Andersson AK, Züllig RA, Tonnesen M, Lehmann R, Spinias GA, Sandler S, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T (2005) Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt. *Diabetologia. 2005 Oct;48(10):2039-50*

Su L, Cheng H, Sampaio AV, Nielsen TO, Underhill TM (2010) EGR1 reactivation by histone deacetylase inhibitors promotes synovial sarcoma cell death through the PTEN tumor suppressor. *Oncogene. 2010 Jul 29;29(30):4352-61*

Sukhatme VP, Cao X, Chang LC, Tsai-Morris C, Stamenkovich D, Ferreira PCP, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Currant T, et al (1988) A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell. 1988 Apr 8;53(1):37-43*

Svaren J, Sevetson BR, Apel ED, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J (1996) NAB2, a corepressor of NGFI-A (egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol. 1996 Jul;16(7):3545-53*

Tai TC, Morita K, Wong DL (2001) Role of egr-1 in cAMP-dependent protein kinase regulation of the phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *J Neurochem. 2001 Mar;76(6):1851-9*

Tan Q, Kerestes H, Percy MJ, Pietrofesa R, Chen L, Khurana TS, Christofidou-Solomidou M, Lappin TR, Lee FS (2013) Erythrocytosis and pulmonary hypertension in a mouse model of human HIF2A gain of function mutation, *J Biol Chem. 2013 Jun 14;288(24):17134-44*

Thiel G, Kaufmann K, Magin A, Lietz M, Bach K, Cramer M (2000) The human transcriptional repressor protein NAB1: expression and biological activity. *Biochim Biophys Acta. 2000 Oct 2;1493(3):289-301*

Thiel G and Cibelli G (2002) Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor EGR-1. *J. Cell Physiol. 193, 287-292*

Thiel G, Müller I, Rössler OG (2014) Expression, signaling and function of Egr transcription factors in pancreatic β -cells and insulin-responsive tissues. *Mol Cell Endocrinol. 2014 May 5;388(1-2):10-9*

Tilbrook PA, Ingle E, Williams JH, Hibbs ML, Klinken SP (1997) Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells. *EMBO J. 1997 Apr 1;16(7):1610-9*

Tilbrook PA, Palmer GA, Bittorf T, Sarna M, Linnekin D, Cull V, Williams JH, Ingle E, Krystal G, Klinken SP (2001) Maturation of erythroid cells and erythroleukemia development are affected by the kinase activity of Lyn. *Cancer Research 61 (2001), 2453-2458*

Tsai JC, Liu L, Zhang J, Spokes KC, Topper JN, Aird WC (2001) Epidermal growth factor induces egr-1 promotor activity in hepatocytes in vitro and in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001 Nov;281(5):G1271-8*

Verdier F, Walrafen P, Hubert N (2000) Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18375–18381

Virolle T, Adamson ED, Baron V, Birle D, Mercola D, Mustelin T, de Belle I (2001) The egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol.* 2001 Dec;3(12):1124-8

Watanabe S, Kubota H, Sakamoto KM, Arai K (1997) Characterization of cis-acting sequences and trans-acting signals regulating early growth response 1 and c-fos promotores through the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor in BA/F3 cells. *Blood.* 1997 Feb 15;89(4):1197-206

Watson MA, Milbrandt J (1990) Expression of the nerve growth factor-regulated NGFI-A and NGFI-B genes in the developing rat. *Development.* 1990 Sep;110(1):173-83

Westermark J, Li SP, Kallunki T, Han J, Kähäri VM (2001) P38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol Cell Biol.* 2001 Apr;21(7):2373-83

Wick KR, Werner ED, Langlais P, Ramos FJ, Dong LQ, Shoelson SE, Liu F (2003) Grb10 inhibits insulin-stimulated insulin receptor substrate (IRS)-phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by disrupting the association of IRS-1/IRS-2 with the insulin receptor. *J Biol Chem.* 278, 8460–8467

Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ (1995) Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science.* 1995 Jul 21;269(5222):403-7

Whitmarsh AJ, Yang SH, Su MS, Sharrocks AD, Davis RJ (1997) Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol.* 1997 May;17(5):2360-71

Wojchowski DM, Sathyanarayana P, Dev A (2010) Erythropoietin receptor response circuits. *Curr Opin Hematol.* 2010 May;17(3):169-76

Wong A, Sakamoto KM (1995) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the transcriptional activation of egr-1 through a protein kinase A-independent signaling pathway. *J Biol Chem.* 1995 Dec 22;270(51):30271-3

Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO (2004) Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* 2004 Jun;18(9):1031-3

Wu SQ, Minami T, Donovan DJ, Aird WC (2002) The proximal serum response element in the egr-1 promotor mediates response to thrombin in primary human endothelial cells. *Blood.* 2002 Dec 15;100(13):4454-61

Wu H, Lu W, Mahato RI (2011) Mesenchymal stem cells as a gene delivery vehicle for successful islet transplantation. *Pharm Res.* 2011 Sep;28(9):2098-109

Xi H, Kersh GJ (2003) Induction of the early growth response gene 1 promoter by TCR agonists and partial antagonists: ligand potency is related to sustained phosphorylation of extracellular signal-related kinase substrates. *J Immunol.* 2003 Jan 1;170(1):315-24

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012 Jun 18;13:134

Young A (2012) IL-1 β Amplification of Nitric Oxide Production and Its Inhibitory Effects on Glucose Induced Early Growth Response-1 Expression in INS-1 Cells. *Electronic Theses and Dissertations. Paper 1463*

Yu HW, Liu QF, Liu GN (2010) Positive regulation of the egr-1/osteopontin positive feedback loop in rat vascular smooth muscle cells by TGF-beta, ERK, JNK, and p38 MAPK signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 May 28;396(2):451-6

Yu X, Shen N, Zhang ML, Pan FY, Wang C, Jia WP, Liu C, Gao Q, Gao X, Xue B, Li CJ (2011) Egr-1 decreases adipocyte insulin sensitivity by tilting PI3K/Akt and MAPK signal balance in mice. *EMBO J.* 2011 Aug 9;30(18):3754-65

Zhang S, Klessig DF (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 2001 Nov;6(11):520-7

Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S (2006) Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood* 2006;107:907–15

9. Thesen

1. Der durch Erythropoetin in hämatopoetischen Zellen induzierte schnelle, transiente Anstieg der egr-1-mRNA. impliziert eine Funktion von Egr-1 als „immediate early“-Gen bei der Vermittlung EPO-spezifischer Signale.
2. Zur Analyse der Regulation der egr-1-mRNA wurde ein ca. 2000 Basenpaare langes Fragment des egr-1-Gens aus genomischer DNA kloniert und anhand der Sequenz die Existenz diverser regulatorischer Elemente postuliert.
3. Auf Basis der unter 2. genannten Daten wurden Reportergenkonstrukte mit unterschiedlich langen Promotorfragmenten hergestellt und ihr jeweiliges transaktivierendes Potential im Zusammenhang mit rezeptoraktivierten Signalwegen untersucht.
4. Kotransfektionsexperimente mit Wildtyp bzw. dominant-negativen cDNA-Konstrukten zeigen, dass die Tyrosinkinasen JAK2 und Lyn für die Signalvermittlung vom EPO-Rezeptor zum egr-1-Gen essentiell sind.
5. Im Promotorbereich konnte eine Egr-1-Bindungsstelle identifiziert und eine verstärkte Bindung des Egr-1-Proteins nach EPO-Stimulation nachgewiesen werden. Überexpressionsexperimente bestätigen diesen Zusammenhang und sprechen zusammen mit den genannten Daten für eine autoregulatorische Funktion von Egr-1.
6. Durch den Einsatz von signalwegspezifischen Inhibitoren in Reportergenassays mit Promotorkonstrukten wurde die Beteiligung EPO-induzierter Signale an der Promotoraktivierung systematisch aufgeklärt.
7. Bei Verwendung der MEK1/2-Inhibitoren PD98959 und UO126 kann eine dosisabhängige Hemmung der egr-1-Promotoraktivität beobachtet werden, die sowohl über distale als auch proximale SRE-Elemente vermittelt wird und die Beteiligung des Raf-MEK-ERK-Signalwegs bei der EPO-abhängigen Egr-1-Expression unterstreicht.

8. Analog zum Raf-MEK-ERK-Signalweg steuern sowohl PI3-Kinase-abhängige als auch über den p38-MAPK-Signalweg vermittelte Signale membranproximale Elemente des Promotors.
9. Durch den Einsatz eines PKA-Inhibitors und verschiedener Promotorkonstrukte konnten wir zeigen, dass von den drei von uns identifizierten CRE-Elementen nur die beiden proximal gelegenen Bindungsstellen für die cAMP-abhängige Regulation des Promotors von Bedeutung sind.
10. Mit dem Transforming-growth-factor- β (TGF- β) - Gen, dem Pancreas duodenum homeobox-1 (PDX-1)-Gen und Phosphatase and tensin homolog (PTEN)-Gen konnten drei bisher für EPO unbekannte Zielgene identifiziert werden.
11. Untersuchungen zur Interaktion von Egr-1 mit den regulatorischen Bereichen der unter 10. genannten Gene beweisen, dass der Transkriptionsfaktor nach EPO-Stimulation direkt an DNA-Elemente der Promotoren von PDX-1 und TGF- β bindet.

10. Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. Thomas Bittorf, wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts für medizinische Biochemie und Molekularbiologie, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit zu verfassen. Neben der Themastellung, danke ich ihm für die Betreuung meiner Arbeit, die vom Erlernen spezieller Labortechniken, über Diskussionen wissenschaftlicher Themen bis hin zu den motivierenden Worten, die halfen diese Arbeit kurz nach Beendigung meines Medizinstudiums fertig zu stellen, reichten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts, die mir bei Fragen immer hilfreich zur Seite standen.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Karoline, die mir während der gesamten Zeit der Promotion unterstützend zur Seite stand. Auch unserem Sohn Bjarne danke ich, der das letzte Jahr zu einem ganz Besonderen für uns gemacht hat und der mich ohne Worte darin bestärkte diese Arbeit zielstrebig zu beenden.

Zu guter Letzt gilt ein großer Dank meiner gesamten Familie, allen voran meiner Mutter, die immer an mich geglaubt und mich immer unterstützt hat.

11. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Dissertation „Analyse funktioneller Elemente des egr-1-Promotors in EPO-sensitiven Zellen“ selbstständig verfasst habe. Die Verwendung von Zitaten und Abbildungen anderer Autoren wurde mit entsprechender Quellenangabe kenntlich gemacht.

Rostock, den 01. Juni 2017

Dominik Wurm