

2. Methoden

2.1. Zellkultur

Die Cochlea wurde aus neonatalen Wistarratten (3.-5. postnataler Tag) in Anlehnung an Sobkovicz et al. (1993) und Lowenheim et al. (1999) präpariert. Die Erlaubnis zur Explantation der Cochlea der Ratten erteilte das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGetSi), Berlin (T 0234/00). Nach Ende der Präparation lagen drei separate Segmente vor, die Stria vascularis (SV), das Organ Corti (OC) und der Modiolus (MO). Das OC wurde entsprechend den Windungen in die Segmente apikal, medial und basal unterteilt.

Die Zusammensetzung des Mediums für die organotypische Kultur orientiert sich an Arbeiten von Lowenheim et al. (1999). Als Grundmedium wurde Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 nutrient mixtures (DMEM/F12, Gibco, Karlsruhe, Germany, 1:1) mit 10 % fetalem Kalbsserum (FCS, Biochrom AG seromed, Berlin, Germany), 10 mM HEPES (Boehringer, Mannheim, Germany), 20 nM NaHCO₃, 5 mM L-Glutamin (SERVA, Heidelberg, Germany), 50 U/ml Penicillin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 25 µg/ml Insulin (Sigma), 100 µg/ml Transferrin (SERVA), 60 µg/ml Putresin (SERVA), 0,6 % Glukose genutzt. Für spezifische Fragestellungen wurde die Mediumzusammensetzung modifiziert. Die Segmente wurden in 4-well Platten in 500 µl komplettem Medium in einem mit 5 % CO₂ begasten Inkubator (Revco Scientific, Inc. Asheville, NC, USA) bei 37°C (Standardbedingungen) kultiviert. Wenn notwendig, wurde eine Cochlea des Tieres der normoxischen Kontrollgruppe und die andere Cochlea der Hypoxiegruppe zugeordnet. Nach Waschen, Fixieren und Färben der Cochlealsegmente erfolgte die Zellzählung am Fluoreszenzmikroskop (Leica DMIL, Microsystem Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany, 400fache Vergrößerung). Die Färbung erfolgt mit Phalloidin (Phalloidin-TRITC, 0,1 µg, Sigma, St. Louis, MO, USA, (Winter, 2004). Phalloidin bindet sich an filamentäres Aktin

(F-Aktin) und markiert u. a. die aktinreichen Stereozilien und die Cuticularplatte der Haarzellen. F-Aktin stellt ein aus vielen globulären Aktin-Monomeren (G-Aktin) bestehendes Polymer dar. G-Aktin besteht aus 4 Untereinheiten und hat eine Bindungstasche für Mg^{2+} -komplexiertes ATP, die ähnlich einem Drehscharnier wirkt und durch ATP/Adenosindiphosphat (ADP) stabilisiert wird. Die Polymerisation von Aktin selbst ist nicht ATP-abhängig, wird aber am Plus-Ende des Aktinkeims durch ATP extrem beschleunigt. Da an Nierenzellen unter Hypoxie eine reversible, teilweise Sequestrierung und Umverteilung von F-Aktin aus der Peripherie in den perinukleären Raum beobachtet wurde, hat diese Färbung keine Aussagekraft bei der Differenzierung von letalen und subletalen Haarzellen. Die ÄHZ und IHZ sind unter dem Fluoreszenzmikroskop durch ihre unterschiedliche Lage, Größe und Morphologie gut unterscheidbar. Es wurden die tatsächlich vorhandenen und die fehlenden Haarzellen gezählt. Folgende Zählkriterien wurden festgelegt: 1) Pro Segment werden 3-5 verschiedene Stellen ausgezählt. 2) Die 4 Haarzellenreihen müssen gut erkennbar sein. 3) Mindestens 20 zusammenhängende ÄHZ einer Reihe müssen erkennbar sein. 4) Stellen mit mechanischen Alterationen werden nicht berücksichtigt.

2.2. Hypoxie und Ischämie

Sauerstoffmangel wird *in vitro* am einfachsten durch Sauerstoffentzug simuliert. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Cochleakultur mit einem Gasgemisch in einer Billups-Rothenburg-Kammer (Del Mar, CA, USA) begast (5 % CO_2 und 95 % N_2 , 15 min, AGA Gas GmbH, Bottrop, Germany), in welchem der Sauerstoff durch den Stickstoff ersetzt wurde. Man erreicht durch den im Kulturmedium gelösten Sauerstoff keine Anoxie, sondern eine Hypoxie mit einem pO_2 von 10-20 mmHg (Gao et al., 1999). Da dies für Haarzellen eine relativ geringe Hypoxie darstellt, wurden für die Experimente zum Teil lange Inkubationszeiträume gewählt. Nach der Begasung wurde die Kammer hermetisch

verschlossen und mit dem OC der Hypoxiegruppe für den Zeitraum der Hypoxie, die entsprechend dem Versuchsansatz variierte, in einen Inkubator bei 37°C gestellt.

Für die Erzeugung einer Ischämie wurde das komplette Medium durch eine reine Elektrolytlösung ohne Glukose oder andere Zusätze ersetzt und die Hypoxie eingeleitet.

Kontrollversuche wurden unter normoxischen Bedingungen über den entsprechenden Zeitraum durchgeführt.

2.3. Apoptose und Nekrose

Für diese Untersuchungen wurde ebenfalls die organotypische Kultur eingesetzt. Am ersten Tag wurde die Cochlea präpariert und in ein apikales, mediales und basales Segment getrennt. Als Medium wurde für diesen Versuch das Neurobasal Medium mit N1 Supplement (Gibco, Karlsruhe, Germany) und 100 U/ml Penizillin (Sigma, St. Louis, MO, USA) eingesetzt. Fetales Kalbsserum wurde nicht eingesetzt, da in dieser Untersuchungsserie zugleich der Einfluss von Wachstumsfaktoren getestet wurde. Es ist bekannt, dass im fetalen Kalbsserum eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren enthalten ist. Es wurden drei Gruppen von Kulturen untersucht: Kontrolle, Ischämie und Ischämie mit Wachstumsfaktoren. Die Ischämie betrug 3 h, 3,5 h und 4 h. Um den präventiven Einfluss von Wachstumsfaktoren auf den Ischämie bedingten Haarzellschaden zu untersuchen, wurden dem Medium die Wachstumsfaktoren „Recombinant human insulin-like growth factor“ (rhIGF-1, 100 ng/ml = 15 nM, R&D, Minneapolis, MN, USA), „Recombinant human epithelial growth factor“ (rhEGF, 200 ng/ml = 30 nM, R&D) oder „Recombinant human erythropoetin“ (rhEPO, 5,2 ng/ml = 0,3 nM, Roche, Basel, Schweiz) zugesetzt. Verschiedene Techniken wurden kombiniert, um apoptotische und nekrotische Zellen im OC zu identifizieren.

- 1) Die Präparate wurden mit Propidiumjodid (PI, 1 µg/ml, Molecular Probes, Göttingen, Germany) im Medium gefärbt. PI lagert sich an die DNA und

zeigt im Falle von Nekrose deutlich gefärbte Zellkerne. Es wird davon ausgegangen, dass PI die DNA nur erreichen kann, wenn die Zellmembranpermeabilität gestört ist. Die Lokalisation der nekrotischen Kerne im OC wurde über Phasenkontrastmikroskopie gewährleistet.

- 2) Die Kulturen wurden danach mit „Buffered Saline Glucose“/BSG (27,2 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 6,1 mM KH_2PO_4 ; 2 g Glukose, Aqua dest.) gewaschen und in Paraformaldehyd (20 g mit 5 ml 1 n NaOH in 225 ml Aqua dest., bei 60°C gelöst, auf pH 6,8 eingestellt, mit 250 ml Phosphatpuffer aufgefüllt) fixiert. Die Anfärbung der Haarzellen erfolgte mit Phalloidin-TRITC (0,1 μM , Sigma, St. Louis, MO, USA). Nicht Phalloidin-gefärbte Haarzellen wurden als untergegangene oder tote Haarzellen bewertet. Die Anzahl der IHZ und ÄHZ wurde gezählt und pro 100 μm ausgewertet.
- 3) Apoptotische Kerne wurden in demselben Segment über die DNA-Fragmentierung im Zellkern mit ApopTag® Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, Temecula, CA, USA) entsprechend dem Protokoll identifiziert. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass die freie OH-Gruppe am 3'DNA-Ende mit chemisch veränderten Nukleotiden markiert wird. Die Nukleotide werden enzymatisch mit Hilfe der „Terminalen Deoxynucleotidyl Transferase“/TdT gebunden. Es werden die 3'DNA-Enden von Doppel- und Einzelsträngen markiert. Die Nukleotide sind mit Digoxigenin markiert, das mit Digoxigenin-Antikörpern nachgewiesen werden kann.

2.4. Isolation und Quantifizierung von Gesamt-RNA

Die totale RNA wurde isoliert entsprechend der Vorschrift des Handbuches RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Dieses Verfahren beruht auf der selektiven

Bindung von Silica-Gel-Membranen und RNA bei spezifischen Inkubationsbedingungen.

Das Verfahren beinhaltet folgende Schritte:

- Aufnahme des Gewebes in Lysis-Puffer und Einfrieren bei -80°C bis zur Aufarbeitung, Zerkleinerung des Gewebes, Zugabe von Ethanol, Zentrifugation für die Absorption von RNA an die Membran; Entfernung von Proteinen und Verunreinigung mittels Waschpuffer und Zentrifugation, Elution der RNA mit Elutionspuffer; Quantifizierung der totalen RNA mittels Spektrophotometrie (Tecan Ultra 384, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) oder RiboGreen-Methode (Molecular Probes, Göttingen, Germany).

Die RNA wurde bei -80°C in H_2O , dem Diethylpyrocarbonat (DEPC) als RNAase-Inhibitor zugesetzt wurde, aufbewahrt.

Die RNA wurde über zwei Verfahren quantifiziert:

- a. Bei ausreichend hoher RNA-Konzentration mittels Spektrophotometer bei 260-280 nm. Die A260/A280-Ratio betrug bei unseren Präparationen 1,7-2,1. Für die quantitative RT-PCR wurde die RNA-Konzentration auf einen Gehalt von $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ eingestellt und in Aliquotes bis zur Bestimmung aufbewahrt.
- b. Bei geringer RNA-Konzentration wurde die fluorometrische RiboGreen-Methode eingesetzt. Die Quantifizierung mit RiboGreen erfolgte entsprechend der Vorschrift von Molecular Probes (Göttingen, Germany). Diese Art der RNA-Quantifizierung ist eine sehr sensitive fluorometrische Methode. RiboGreen zeigt nach Bindung von Nukleinsäuren eine starke Fluoreszenz. Die Sensitivität der RiboGreen-Methode ist etwa 200fach höher als die mit Ethidiumbromid und etwa 1000fach höher als die Spektrophotometrie. In der vorliegenden Arbeit wurde die RiboGreen-

Methode vor allem bei der Bestimmung von RNA aus Segmenten der Cochlea eingesetzt. Das RiboGreen-Reagenz ist nicht selektiv für die RNA. Es reagiert auch mit DNA. Daher wurden alle Proben mit DNAase vorbehandelt. Je nach Gewebemenge und RNA-Gehalt wurden die entsprechenden Messbereiche ausgewählt (0-1,0 µg/ml; 0-50 µg/ml).

2.5. Quantifizierung der mRNA

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte in dieser Arbeit über zwei Verfahren: kompetitive RT-PCR mit einem internen Standard oder mit der Real-Time (RT)-PCR.

Die Methode der quantitativen RT-PCR ist beschrieben im Allgemeinen von Berndt et al. (1998) und für Prestin von Gross et al. (2005). Der benutzte interne Standard hat die Besonderheit, dass er von derselben Länge und Frequenz wie die Ziel-RNA ist, außer einer Restriktionsschnittstelle für die Restriktions-Endonuklease *Bam*H1 in der Mitte des Oligonukleotides. Dadurch wird erreicht, dass interner Standard und Ziel-RNA mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden. Die quantitative RT-PCR umfasst folgende Schritte:

- Die RT-PCR-Reaktion wurde optimiert mit dem PCR Optimizer Kit (Invitrogen).
- Reverse Transkription einer konstanten Menge RNA (100 ng) zusammen mit verschiedenen Mengen internen Standards ($10^2 - 10^6$ ag). Die Konzentration des internen Standards wird jeweils an den Gehalt der entsprechenden totalen RNA angepasst.
- Die RT-PCR-Reaktion beinhaltet folgende Schritte:
 1. Linearisierung der RNA und reverse Transkription bei 70°C und rasche Abkühlung bei 4°C.
 2. Synthese des zweiten RNA-Stranges.

3. Synthese der DNA (Denaturierung, Annealing und Synthese).

Um die methodische Varianz zu bestimmen, wurde im Fall von Prestin mRNA ein RNA-Präparat unverdünnt, 1:10 bzw. 1:100 verdünnt bestimmt. Es wurde ein serieller Variationskoeffizient (VK) von 25 % bestimmt ($n = 7$) (Gross et al., 2005)).

Die Realtime-PCR wurde mit dem LightCycler (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt. Das Prinzip der Realtime-PCR besteht darin, dass eine simultane Messung des PCR-Produktes während der Amplifikationsreaktion erfolgt. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des internen Standards und der Erstellung einer Eichkurve. Der RNA-Gehalt einer unbekannt Probe wird anhand der Eichkurve berechnet.

2.6. Microarray-Untersuchung

2.6.1. Versuchsaufbau

Mit einem Affymetrix Microarray-Chip wurden 3 Serien untersucht, jeweils OC, MOD und SV. Bei Serie 1 wurden 2 Proben des OC eingesetzt, um die Reproduzierbarkeit der Microarray-Untersuchung zu kontrollieren. Die Präparate der Serie 2 und 3 stammen von zwei unabhängigen Untersuchungsreihen, um die Variation von zwei unabhängigen Serien testen zu können. Damit gelangten folgende RNA-Proben zur Untersuchung und Auswertung: a) OC, MOD und SV vom 4. Tag nach Geburt, b) OC, MOD und SV vom 4. Tag nach Geburt, einschließlich einer 24-stündigen Entwicklung in der Kultur, c) OC, MOD und SV vom 4. Tag nach Geburt, wobei die organotypische Kultur während der Kultivierung einer Hypoxie von 5 h ausgesetzt war (Abb. 1). Insgesamt resultieren daraus 16 Microarray-Untersuchungen. Jede einzelne Probe stellt einen Pool aus den jeweiligen Segmenten von 6 Tieren dar, um eine ausreichende RNA-Menge für die Microarray-Untersuchungen bereitzustellen.

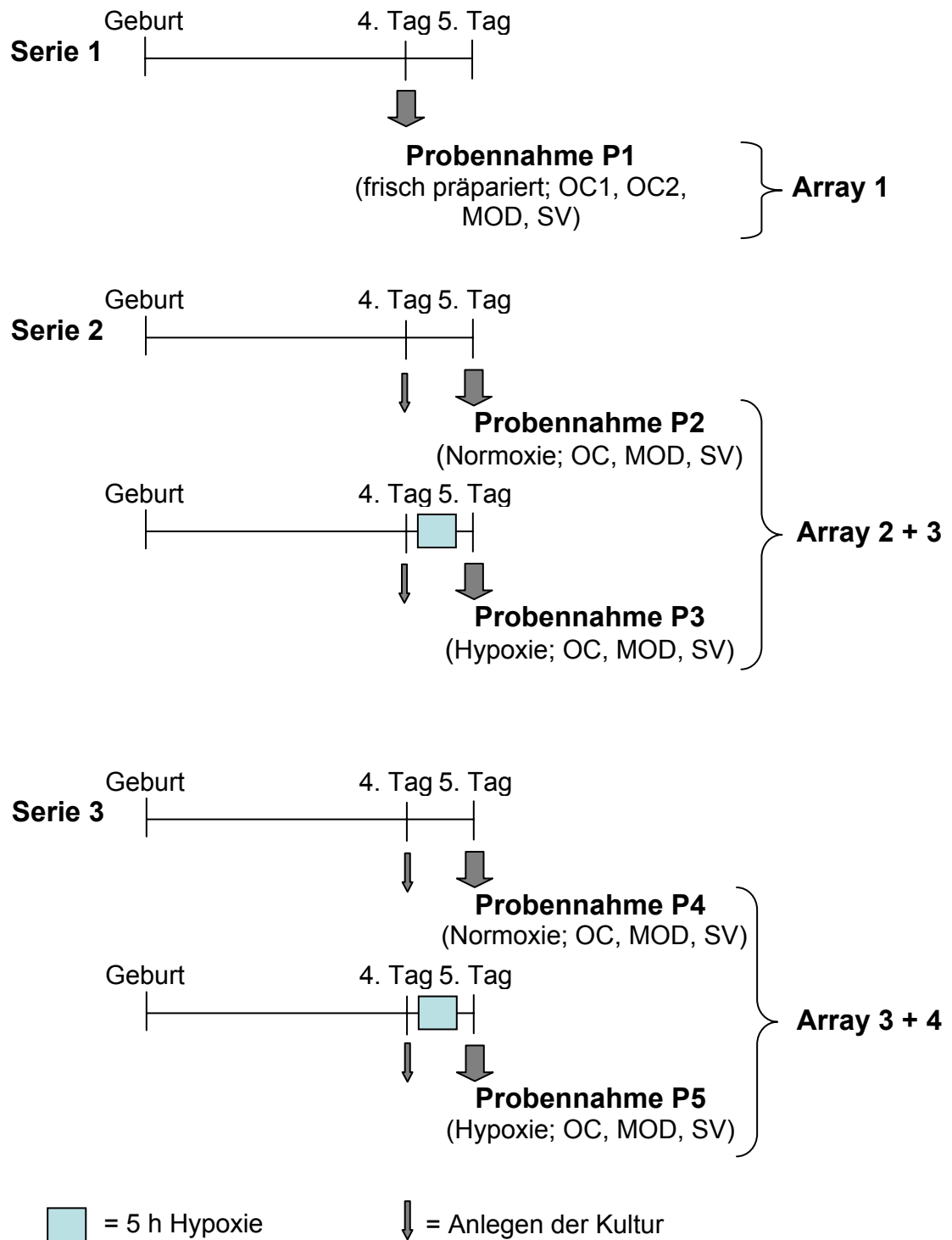


Abb. 1 Schematischer Versuchsaufbau der Microarray-Untersuchungen der Cochlea der Serien 1, 2 und 3.

2.6.2. RNA-Präparation für die Microarray-Untersuchungen

Das Gewebe wurde in Lysis-Puffer aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Die totale RNA wurde aus gefrorenem Gewebe unter Einsatz des RNA easy Kits (Qiagen, Hilden, Germany) isoliert. Die einzelnen Schritte der RNA-Extraktion erfolgten analog dem Qiagen-Protokoll, wobei die Elimination möglicher DNA-Reste über einen DNAsen-Verdau vorgenommen wurde. Für die Quantifizierung der isolierten mRNA wurde die RiboGreen-Methode (Molecular Probes, Göttingen, Germany) eingesetzt. Totale RNA von OC, MOD und SV von je 6 neugeborenen Wistarratten wurde präpariert und gepoolt. Die Qualität der mRNA wurde mit dem BioAnalyser Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) überprüft (Labor für Genomforschung, Charité-Universitätsmedizin Berlin). Es wurden 5 µg mRNA für die Microarray-Untersuchungen bereitgestellt.

2.6.3. Microarray-Untersuchung

Für die Microarray-Untersuchung wurde der RNU 34-Chip von Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) verwendet.

Die Microarray-Untersuchungen nach Affymetrix wurden von Dr. U. Ungethüm, Labor für Genomforschung, Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt und basieren auf folgenden Einzelschritten (Abb. 2).

- Die mRNA wird in cDNA umgeschrieben.
- Unter Einsatz der doppelsträngigen cDNA wird eine Biotin-markierte cRNA synthetisiert.
- Danach erfolgt die Hybridisierung auf dem Array. Die Arrays von Affymetrix sind so aufgebaut, dass jedes Gen durch bis zu 16 verschiedene Oligonukleotide der codierenden Regionen repräsentiert wird.

- Nach dem Waschen und Färben wird der Array mit einem Argon-Laser-Instrument gescannt.
- Die Auswertung erfolgt mit der Software Microarray Suite 5.0. Der quantitative Expressionsgehalt für jedes Gen wird berechnet aus der Differenz, die sich aus der perfekten Paarung und Fehlpaarung spezifischer Sonden (matched und mismatched) ergibt. Die Arrays werden über einen Scaling Faktor normalisiert.
- Die Ratio 260/280 aller zur Hybridisierung bereitgestellten RNA-Proben war 1,8-1,9.
- Der Scaling-Faktor lag bei der Serie 1 zwischen 0,4-0,5, bei der Serie 2 zwischen 2,7-6,2 und bei der Serie 3 zwischen 2,8-3,1.
- Der prozentuale Anteil der als „present“ bewerteten Gene lag in der Serie 1 zwischen 32,3-36 %, in der Serie 2 32,1–38 % und in der Serie 3 36,5-39,7 %.

Die Werte zeigen, dass die Qualitätsanforderungen für mRNA und Hybridisierung in unseren Untersuchungen erfüllt wurden.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte durch Dr. Kuban (Labor für funktionelle Genomforschung Charité). Jedes Signal hat eine Kennzahl für die statistische Sicherheit ($p =$ „present“, $p \leq 0,04$; $m =$ „marginal“, $p > 0,04 - < 0,06$; $a =$ „absent“, $p \geq 0,06$). Die „Digital Light Units“ (DLU) wurden mit den Programmen GenChip und GeneSpring analysiert und normalisiert. Die deskriptive Statistik wurde mit Hilfe von Excel bzw. Statistica 7.1 erstellt.

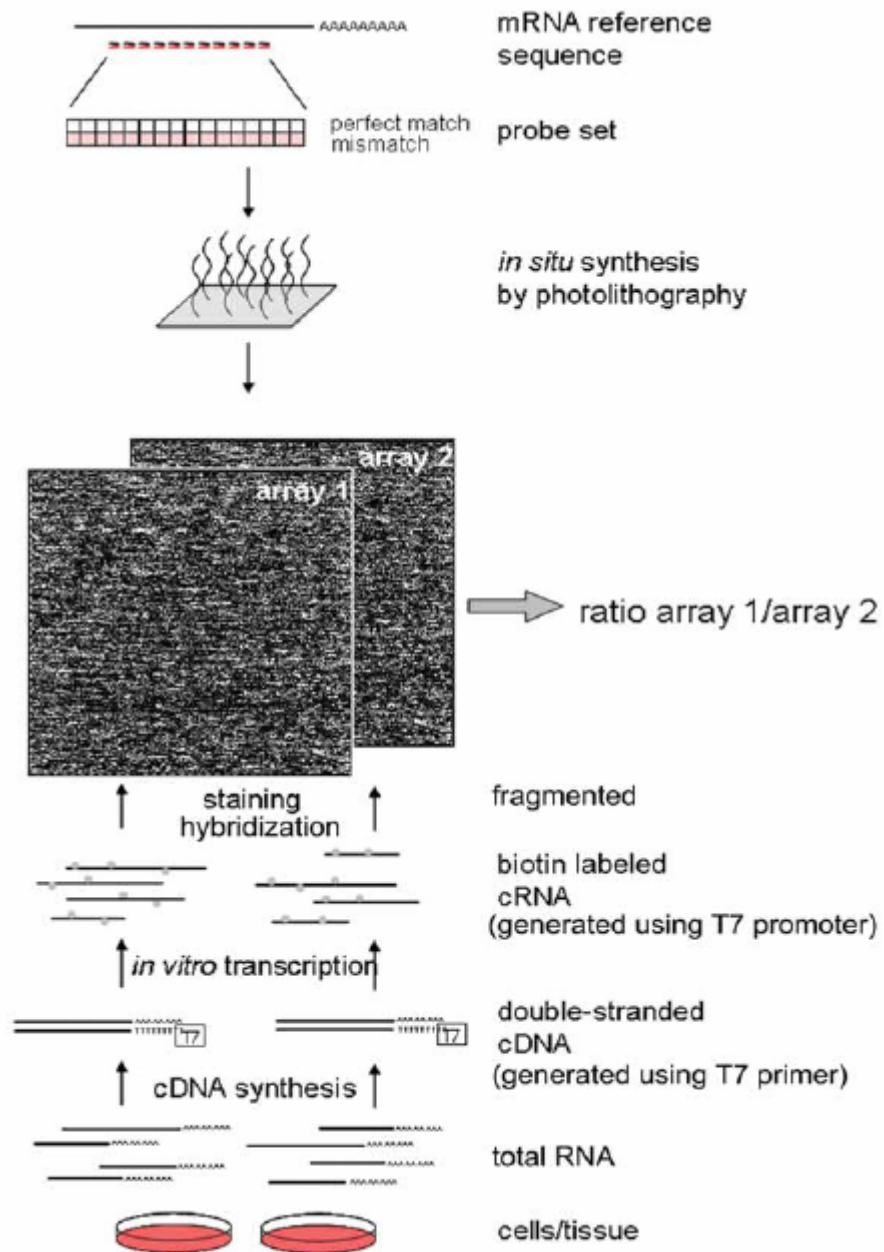


Abb. 2 Darstellung der Microarray-Untersuchung. (Quelle: www.dkfz.de/ibios_old/lectures/bioinf_ss05/rKoenig/FunktionalAnalyse1TB.pdf)

2.6.4. Statistik der Microarray-Untersuchungen

Für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit und des Fehlers der Microarray-Daten erfolgten Parallelanalysen in insgesamt 4 adäquaten Proben. Die Daten sind mit einem Variationskoeffizienten von nicht höher als 30 % behaftet (s. Ergebnisse, Abschnitt 3.6.1). In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen um den Faktor zwei als statistisch

signifikant angesehen. Unter Kultivierung (S2) wurde aus Gründen der Begrenzung und der Betonung von wesentlichen Veränderungen der Genexpression nur Gene betrachtet, die deutlich hochreguliert (≥ 4 fach) bzw. runterreguliert ($\leq 0,25$) waren. Unter Hypoxie (S3) wurde aufgrund der geringen Veränderung der Genexpression der Faktor 1,6 als Kriterium für die Hochregulation der Gene und der Faktor 0,5 für die Runterregulation gewählt.

2.7. mRNA von HIF-1 alpha und Prestin

Die Bestimmung der HIF-1 alpha mRNA erfolgte qualitativ über RT-PCR sowie quantitativ über Zusatz eines internen Standards. Es wurden RNA-Proben von intakter normoxischer und hypoxieexponierter OC, MOD und SV gesammelt und aufgearbeitet. Die Aufarbeitung der RNA erfolgte mit dem InViSorb total RNA KIT II (InVitek, Berlin, Germany) zur Präparation von Gesamt RNA aus Zellen und Geweben. Die Primer wurden mittels Primer Designer Programm ausgewählt. Die Sequenzen sind:

a) Primer für HIF-1 alpha (Acc. Nr. Y09507)

1. Primer 5'-CTA-TGA-CGT-GCT-TGG-TGC-TGA-T-3'

2. Primer 5'-CTG-TAC-TGT-CCT-GTG-GTG-ACT-T-3'

b) Primer für Prestin (Acc. Nr. NM_030840)

1. Primer 5'-CAC-AGA-GTC-CGA-GCT-ACA-CAG-TC -3'

2. Primer 5'-TCA-GTG-CGC-TGC-TGT-ACA-AG -3'.

Zum Ausschluss von DNA-Verunreinigungen der RNA-Proben wurde eine PCR nach demselben Schema, jedoch ohne Zusatz der Reversen Transkriptase MLV (eine so genannte No-RT-PCR) durchgeführt, die negativ, also ohne Amplifikation verlief.

2.8. HIF-1-Aktivität

Da sich die organotypische Kultur der Cochlea nicht ausreichend transfizieren ließ, erfolgte die Herstellung von Einzelzellkulturen (EZK) der Regionen OC, SV und MOD. Die Vereinzelung erfolgte zunächst durch Aufnahme der Fragmente in eine 0,05 %ige Trypsin-haltige Pufferlösung für 20 min bei 37°C im Wasserbad und anschließend durch weitere 20 Hübe mit einer 1000- μ l-Pipette. Danach erfolgte die Inkubation im Medium (37°C, GIBCO, DMEM/F12). In der Zellkultur wachsen dann die Zellen als adhärenter Zellrasen.

Die Messung der HIF-1-Aktivität erfolgte über ein Reporterassay, das uns von Kietzmann bereitgestellt wurde. Für die Transfektion wurden die Plasmide pG13 (Promega, Mannheim, Germany), pHBE (Kietzmann, Kaiserslautern, Germany) und pGreenLatern verwandt (Abb. 3). In das Reporterplasmid pHBE wurde stromaufwärts des basalen SV 40-Promotors drei als Enhancer wirkende HRE-Sequenzen des Erythropoietin-Gens kloniert. Es wurde zur Aktivitätsmessung ein Luciferasesystem (Luciferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*) verwendet, und die DNA wurde mittels Kalziumphosphatkoppräzipitation (CalPhos™ Mammalian Transfection Kit, Clontech, Palo Alto, CA, USA) in die Zelle geschleust. Wenn unter Hypoxie HIF-1 induziert wird, bindet das Protein an die HRE des Reporterplasmides und erhöht die Expression der Luciferase. Das Kontrollplasmid pG13 besitzt keine HBE-Sequenz, ist also nicht HIF-1-sensitiv, aber ansonsten identisch zum pHBE. Die Quantifizierung der Luciferase erfolgte in einem Biolumineszenzsystem. Dazu wurde das Luciferinsignal in relativen Lichteinheiten (RLE) nach automatischer Injektion von 50 μ l Luciferase assay Substrat in einem Luminometer (LabsSystem, Finnland) gemessen. Das Kontrollplasmid wurde parallel zum Reporterplasmid transfiziert, um die basale Expression und die Transfektionseffizienz der Vektoren in der Kultur zu erfassen. Das pGreenLatern enthält als Reporter gen GFP, das ein grün fluoreszierendes Protein der Qualle *Aequorea victoria* ist. Es benötigt keine

exogenen zugesetzten Substrate zur Erzeugung einer Fluorophoren und ist als *in vivo* Markerprotein gut geeignet. pGreenLatern wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz ausgesucht. Die HIF-1 alpha Proteinbestimmung erfolgte mit dem HIF-1-ELISA/“Enzyme-linked immunosorbent assay“ (TransAM HIF-1, Active Motif, Rixensart, Belgien).

2.9. Statistik

Die Resultate der Versuchsreihen mit der organotypischen Kultur und der Cochlea-EZK wurden mit Hilfe der Software Statistica 6.0/7.1 (StatSoft) ausgewertet. Berechnet wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung bzw. Standardfehler. Die Datenanalyse erfolgte mittels ANOVA und anschließendem post-hoc Test (Scheffè) bzw. Kontrastanalyse, um ausgewählte Mittelwerte zu vergleichen. Die Beziehung zwischen der Anzahl der Haarzellen und Zellkerne wurde mit Hilfe der Pearson-Korrelation getestet. $p < 0,05$ wurde als Signifikanzniveau gewählt.

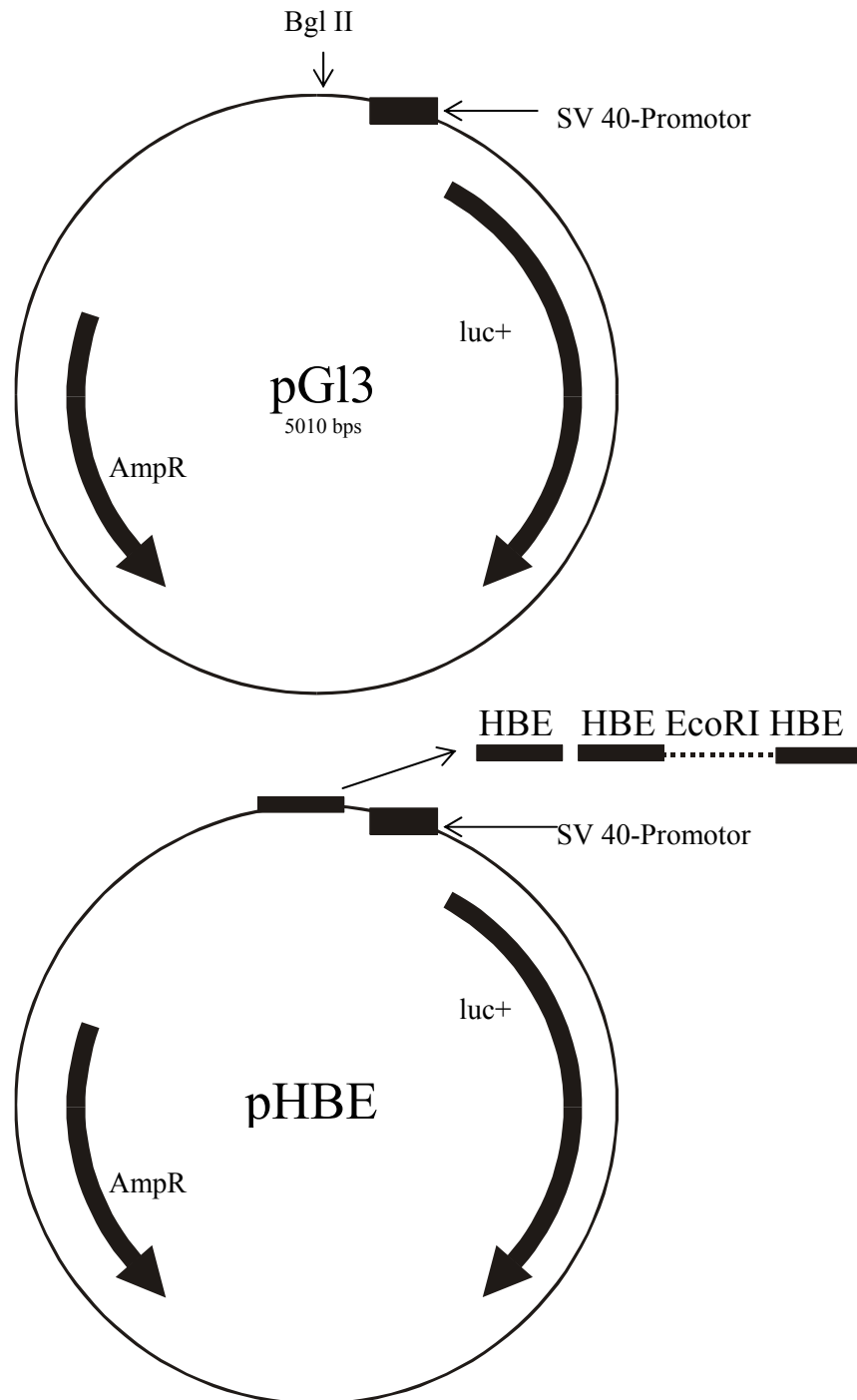


Abb. 3 Kontrollplasmid pG13 und Reporterplasmid pHBE.

In das Reporterplasmid pHBE sind drei HBE-Bindungsstellen mit einer EcoRI-Kontrollschnittstelle in den Enhancer-Bereich des SV 40-Promotors hineinkloniert worden. Nach Bindung von HIF-1 an die HBEs erfolgte eine im Vergleich zum Kontrollplasmid verstärkte Expression der Luciferase.

SV 40 – Promotor aus dem Simeonvirus

HBE – HIF Binding Element

Bgl II – Schnittstelle, in welche die drei HBE des EPO hineinkloniert wurden

EcoRI – Kontrollschnittstelle

luc+ - Luciferasegen

AmpR – Ampizillinresistenzgen