

**Untersuchungen zur transkriptionellen
Regulation des *Erythropoietin-Rezeptor* Gens in
Kardiomyozyten**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sandy von Salisch

aus Zwickau

2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 2006 bis Oktober 2010 in der Abteilung Molekulare Neonatologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Christof Dame angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Christof Dame

2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus

Disputation am 8. März 2011

Danksagung

Eine solche Arbeit wäre ohne die Hilfe vieler Personen nicht möglich. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die während der letzten vier Jahre maßgeblich zum Gelingen der Promotionsarbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Christof Dame möchte ich für die Vergabe des spannenden Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Arbeit in der AG Molekulare Neonatologie durchführen zu können, herzlich danken. Außerdem danke ich ihm für jegliche Unterstützung, anregende Diskussionen sowie die gewissenhaften Korrekturen des Manuskripts.

Bei Frau Prof. Dr. Petra Knaus möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie die regelmäßige Durchführung der interessanten Doktorandensymposien bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Martin Klar. Jederzeit gewährte er mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Promotionsarbeit äußerst sachkundige und wertvolle Unterstützung. Dankbar bin ich auch für die unzähligen hilfreichen Diskussionen, die wesentlich zur Erstellung der Arbeit beigetragen haben.

David Drews möchte ich für das freundschaftliche Miteinander während der gemeinsamen Doktorandenzeit herzlich danken.

Dr. Boris Thurisch danke ich für die wertvolle Unterstützung bei den tierexperimentellen Arbeiten.

Mein Mann Marcus hat mich während jeder Phase der Arbeit unterstützend und motivierend begleitet - ihm danke ich von ganzem Herzen.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	1
1.1. Biologie des Erythropoietins und Erythropoietin-Rezeptors	1
1.1.1. Erythropoietin	1
1.1.2. Erythropoietin-Rezeptor	2
1.1.2.1. Struktur und Aktivierung des Erythropoietin-Rezeptors	2
1.1.2.2. Expression des Erythropoietin-Rezeptors	5
1.1.3. Rolle des Erythropoietin-Rezeptors im Herzen	8
1.1.3.1. Entwicklungsbiologische Relevanz des Erythropoietin-Rezeptors im Herzen	8
1.1.3.2. Kardioprotektive Effekte durch rekombinantes Erythropoietin	9
1.1.4. Regulation des <i>EpoR</i> Gens unter Normoxie	14
1.1.5. Regulation des <i>EpoR</i> Gens unter Hypoxie	17
1.2. Regulation des <i>hypoxia inducible factor</i> (HIF)	17
1.3. Gata-Transkriptionsfaktoren	20
1.3.1. Charakteristika der Gata-Transkriptionsfaktoren	20
1.3.2. Gata-Transkriptionsfaktoren im Herzen	20
1.3.3. Proteinstruktur und Regulation von Gata4	23
1.3.4. Kardiale Gata4 Zielgene	25
1.4. Zielsetzung der Arbeit	26
2. MATERIAL	27
2.1. Material und Hersteller	27
2.1.1. Chemikalien	27
2.1.2. Enzyme	28
2.1.3. Puffer und Lösungen	28
2.1.4. Kommerzielle Assay-Systeme und Kits	29
2.1.5. DNA- und Protein-Marker	30
2.1.6. Oligonukleotide	30
2.1.6.1. PCR Primer	30
2.1.6.2. TaqMan [®] Gene Expression Assays und Real-time PCR Oligonukleotide	31
2.1.6.3. ChIP-Primer	31
2.1.6.4. Oligonukleotide zur Herstellung der Reporter-genkonstrukte	32
2.1.6.5. Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese	32
2.1.6.6. Oligonukleotide zur Herstellung von siRNA Duplexen	33
2.1.6.7. Oligonukleotide zur Amplifikation von Bisulfit-konvertierter DNA	34
2.1.7. Vektoren	34

2.1.8. Antikörper	35
2.1.9. Computerprogramme	36
2.1.10. Geräte	36
2.1.11. Sonstige Materialien	37
2.2 Bakterien, Zelllinien, Tiere	37
2.2.1. Bakterien	37
2.2.2. Zelllinien	38
2.2.3. Tiere	39
3. METHODEN	40
3.1. Zellkulturtechniken	40
3.1.1. Kultivierung von myokardialen HL-1 Zellen	40
3.1.2. Einfrieren und Auftauen von HL-1 Zellen	40
3.1.3. Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in HL-1 Zellen	41
3.1.4. Transfektion von siRNA Duplexen in HL-1 Zellen	41
3.2. Molekularbiologische Arbeitstechniken	41
3.2.1. RNA-Techniken	41
32.1.1. Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben	41
3.2.1.2. Reverse Transkription	41
3.2.1.3. Real-time PCR	42
3.2.2. DNA-Techniken	42
3.2.2.1. Isolierung hochmolekularer DNA aus Zellen: <i>Quick</i> -HMW-DNA	42
3.2.2.2. Isolierung hochmolekularer DNA aus Geweben mittels DNeasy [®] Blood & Tissue Kit	43
3.2.2.3. Bisulfitkonvertierung genomischer DNA mittels EpiTect [®] Bisulfite Kit	43
3.2.2.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus cDNA, HMW-DNA oder Bisulfit-konvertierter DNA	43
3.2.2.5. Ortsgerichtete Mutagenese (<i>site-directed mutagenesis</i>)	44
3.2.2.6. Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	44
3.2.2.7. <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA)	45
3.2.3. Klonierungstechniken	46
3.2.3.1. Präparativer Restriktionsverdau	46
3.2.3.2. Aufreinigung der DNA via QIAquick [®] Gel Extraction und PCR Purification Kit	46
3.2.3.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA-Enden	47
3.2.3.4. Ligation	47
3.2.3.5. Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien und Transformation	47
3.2.3.6. Minipräparation und analytischer Restriktionsverdau	48
3.2.3.7. Präparative Plasmidisolierung mittels QIAprep [®] Plasmid Midi Kit	49
3.2.3.8. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	49
3.2.3.9. Anlegen von Glycerinstocks	49

3.2.4. Proteinbiochemische Arbeitstechniken	49
3.2.4.1. Aufreinigung von Proteinen aus Zellen und Organen	49
3.2.4.2. Herstellung von Kernextrakten aus HL-1 Zellen	50
3.2.4.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	51
3.2.4.4. Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
3.2.4.5. Reportergenanalysen	52
3.2.5. Immunologische Arbeitstechniken	53
3.2.5.1. Western Blot	53
3.2.5.2. Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)	54
3.3. Tierexperimentelle Analysen	55
3.3.1. Verpaarung von CD1-Mäusen und Gewinnung von primären Geweben	55
3.3.2. Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie in C57BL/6 Mäusen	55
3.4. Statistische Analysen	55
4. ERGEBNISSE	56
4.1. EpoR Genregulation in Kardiomyozyten	56
4.1.1. Identifizierung regulatorischer Domänen des murinen <i>EpoR</i> Promotors in HL-1 Kardiomyozyten	56
4.1.2. Identifizierung essentieller Transkriptionsfaktorbindestellen im murinen <i>EpoR</i> Promotor	60
4.1.3. Expressionsanalyse potentieller Transkriptionsfaktoren im Herzen sich entwickelnder und adulter CD1-Mäuse sowie in HL-1 Kardiomyozyten	62
4.1.4. <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Studien zur Bindung von Gata-Transkriptionsfaktoren und Sp1 am murinen <i>EpoR</i> Promotor	63
4.1.5. Einfluss ektopisch exprimierter Transkriptionsfaktoren auf die endogene <i>EpoR</i> Expression	67
4.1.6. Einfluss von <i>Gata4</i> und <i>Sp1</i> siRNA auf die <i>EpoR</i> Expression in HL-1 Kardiomyozyten	68
4.1.7. Verifizierung der <i>EpoR</i> Regulation in transgenen Mäusen mit induzierbarer <i>short hairpin</i> RNA gegen <i>Gata4</i>	69
4.2. Veränderungen der kardialen <i>EpoR</i> Regulation bei Doxorubicin-induzierter Kardiomyopathie und unter Hypoxie	70
4.2.1. <i>EpoR</i> Expression in Doxorubicin-induzierter Kardiomyopathie	71
4.2.2. Kardiale <i>EpoR</i> Regulation unter Hypoxie	72
4.2.2.1. Stimulation der endogenen <i>EpoR</i> Expression in HL-1 Kardiomyozyten durch Hypoxie	73
4.2.2.2. Simulation einer hypoxischen Stimulation durch den PHD-Inhibitor L-Mimosin	74
4.2.2.3. Identifizierung Hypoxie-induzierbarer DNA-Domänen im <i>EpoR</i> Genlocus	76
4.2.2.4. Vergleichende Sequenzanalyse des ersten Introns vom <i>EpoR</i> Gen	76

4.2.2.5. Funktionelle Relevanz der intronischen DNA-Motive für die hypoxische Induktion der <i>EpoR</i> Expression	77
4.3. Untersuchungen zur myokardialen <i>Epo</i> Genregulation	79
4.3.1. Einfluss von Gata-Transkriptionsfaktoren auf die <i>Epo</i> Expression	80
4.3.2. Einfluss von DNA-Methylierung auf die kardiale <i>Epo</i> Expression	82
5. DISKUSSION	85
5.1. Transkriptionelle Aktivierung des <i>EpoR</i> Promotors in Kardiomyozyten durch Gata4 und Sp1	85
5.2. Weitere an der kardialen <i>EpoR</i> Regulation beteiligte Transkriptionsfaktoren	89
5.3. Kardiale <i>EpoR</i> Regulation unter Hypoxie	93
5.4. Entwicklungsabhängige und gewebespezifische Regulation des <i>EpoR</i> Gens	96
5.5. Bedeutung des <i>EpoR</i> und von Gata4 für eine Kardioprotektion durch rekombinantes Erythropoietin	98
5.6. Myokardiale <i>Epo</i> Expression	100
5.7. Schlussfolgerungen	101
5.8. Ausblick	102
6. ZUSAMMENFASSUNG	103
7. ABSTRACT	104
8. REFERENZEN	105
9. TABELLARISCHER LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
10. PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE	124

Abkürzungsverzeichnis

Akt	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i> , Serin/Threonin-Kinase
α CA	<i>Cardiac α-Actin</i>
α -MHC	<i>α-Myosin Heavy Chain</i>
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
Ang-II	Angiotensin-II
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
ATF-1	<i>cyclic AMP dependent transcription factor-1</i>
AT1aR	Angiotensin II Typ I α Rezeptor
Aza	5- Aza -2-Deoxycytidin
Bcl	<i>B-Cell Leukemia/lymphoma</i>
BFU-E	<i>Burst forming uni-erythroid</i>
β cR	<i>common-β-Rezeptor</i>
β -MHC	<i>β-Myosin Heavy Chain</i>
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CEPO	carbamyliertes Erythropoietin
c-Fos	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
CFU-E	<i>colony forming unit-erythroid</i>
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CMV	Cytomegalovirus
CREB	<i>cAMP Responsive Element Binding protein</i>
C _t	<i>threshold Cycle</i> , Schwellenwert-Zyklus
cTnC	<i>cardiac Troponin C</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dHAND	<i>Heart-and Neural Crest Derivatives-expressed protein 2</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>

DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Dpc	<i>days post conceptionem</i>
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ESA	<i>Erythropoiesis Stimulating Agent</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPC	<i>Endothelial Progenitor Cells</i>
Epo	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietin-Rezeptor
ET-1	Endothelin-1
ERK	Extrazellulär Regulierte Kinase
FBS	<i>Fetale bovine serum</i>
FIH	<i>Factor Inhibiting HIF</i>
Fog2	<i>Friend of Gata 2</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase 3β
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HMW-DNA	<i>High-Molecular Weight</i>
HRE	<i>Hypoxia Response Element</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
ISO	Isoproterenol
i.v.	intravenös
JAK2	Janus Tyrosin Kinase 2
kDa	kiloDalton

KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
KLF13	<i>Krüppel-Like Transcription Factor 1</i>
Luc	<i>Luciferase</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MLC	<i>Myosin Light Chain</i>
mut	mutiert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid phosphat
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
P	Postnatal
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	<i>Phenylephrine</i>
PHD	<i>Prolyl-4-hydroxylase Domain-containing proteins</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
pVHL	Tumorsuppressor Von-Hippel-Lindau
RA	<i>Retinoic Acid</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
Pol II	Polymerase II
rEpo	rekombinantes Erythropoietin
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkription
RXR α	<i>Retinoic Acid Receptor α</i>
s.c.	subcutan
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SH2	<i>Src Homology 2</i> , Proteindomäne die phosphoryliertes Tyrosin erkennt

shGata4	Gata4 Short Hairpin RNA
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
siGata4	Gata4 Small Interfering RNA
Smad	<i>Mothers against decapentaplegic</i>
sEpoR	<i>soluble Erythropoietin Rezeptor (löslicher EpoR)</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
SRF	<i>Serum Response Factor</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SUMO-1	<i>Small Ubiquitin-like Modifier-1</i>
Tbx5	T-Box-5
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAF	TBP assoziierter Faktor
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBP	TATA <i>B</i>inding <i>P</i>rotein
TBS	Tris <i>B</i>uffered <i>S</i>aline
TBST	TBS + Tween®20
TE	Tris EDTA
TetR	Tetrazyklin Repressor
TFIID	Transkriptionsfaktor II D
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Unit
USF	<i>Upstream Stimulating Factor</i>
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
Vegf	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp
Wt1	<i>Wilm's tumor suppressor 1</i>
YY1/2	Yin Yang 1/2

1. Einleitung

Die nicht-hämatopoietischen Effekte von Erythropoietin (Epo), welches primär die Bildung roter Blutkörperchen (Erythrozyten) reguliert, stehen seit einigen Jahren im Fokus der Forschung. Grund dafür ist, dass rekombinantes Epo (rEpo) in tierexperimentellen Studien vor allem im Herz und im zentralen Nervensystem gewebeschützende und antiapoptotische Effekte zeigt. Das Verständnis der Biologie von Erythropoietin und Erythropoietin-Rezeptor (EpoR) in nicht-hämatopoietischen Geweben ist daher von großem klinischem Interesse.

1. 1. Biologie des Erythropoietins und Erythropoietin-Rezeptors

1.1.1. Erythropoietin

Erythropoietin, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 34 kDa, stimuliert die Proliferation und Differenzierung erythroider Vorläuferzellen, insbesondere der BFU-E (*burst forming uni-erythroid*) und CFU-E (*colony forming unit-erythroid*), in der fetalen Leber und im Knochenmark.¹⁰ Zugleich hemmt es die Apoptose dieser Zellen. Die Bildung von Epo erfolgt auf einem niedrigen basalen Level und wird in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck reguliert, wobei sie unter Hypoxie bis zu 1000-fach gesteigert werden kann.¹⁰

Erythropoietin wird während der Entwicklung zunächst in der fetalen Leber produziert; die primäre Synthesestelle wechselt aber im Verlauf der Ontogenese zur Niere. Dieser sogenannte *switch* ist speziesspezifisch reguliert. Er beginnt beim Menschen etwa 20 Wochen *post conceptionem* und ist nach heutigem Kenntnisstand im Alter von 3 bis 6 Monaten abgeschlossen. Im adulten Organismus trägt die Leber noch mit etwa 15% zur gesamten Epo-Produktion bei.¹¹

Neben der hepatischen und renalen Synthese von Epo im adulten Organismus, konnte eine Expression auch in zahlreichen anderen fetalen Organen nachgewiesen werden.^{11, 12} Im fetalen Gehirn sowie in der fetaler Lunge, Nebenniere und Milz kann die Expression von *Epo* mRNA als gesichert angesehen werden.^{8, 11}

1.1.2. Erythropoietin-Rezeptor

1.1.2.1. Struktur und Aktivierung des Erythropoietin-Rezeptors

Epo vermittelt seine Wirkung durch Bindung an den EpoR. Dieser gehört, wie die Rezeptoren für verschiedene Interleukine, für Thrombopoietin, GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), Wachstumshormon, Prolactin und Leptin zur sogenannten Superfamilie der Zytokin-Rezeptoren.¹³⁻¹⁷ Der strukturelle Aufbau des EpoR ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

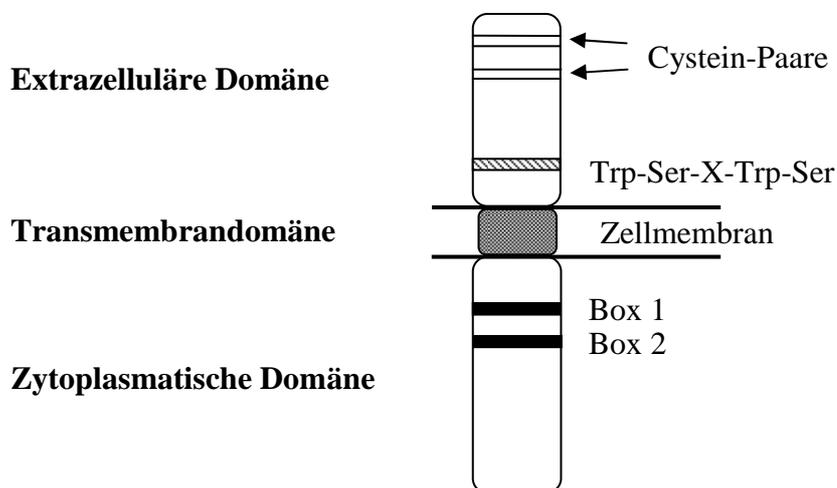


Abbildung 1. Schematische Darstellung des EpoR. In der extrazellulären und in der zytoplasmatischen Domäne sind die für die Mitglieder der Zytokin-Rezeptor-Familie charakteristischen Motive markiert.

Der aus 507 Aminosäuren bestehende Rezeptor hat eine extrazelluläre und eine zytoplasmatische Domäne, welche über eine hydrophobe Transmembranhelix miteinander verbunden sind. Typisch für die Familie der Zytokin-Rezeptoren sind zwei verschiedene Motive in der extrazellulären Domäne: 4 konservierte Cystein-Reste und ein 5 Aminosäuren langes Trp-Ser-X-Trp-Ser-Motiv (X steht für eine beliebige Aminosäure) nahe der transmembranen Domäne. Beide Strukturen scheinen für eine korrekte Faltung und die Präsentation des EpoR auf der Zelloberfläche relevant zu sein.⁹

Wie in Abbildung 2 A dargestellt, bilden EpoR in hämatopoietischen Zellen über ihre Transmembran-Helices (Leucin-Zipper) ein Homodimer aus jeweils zwei 66 kDa

großen Untereinheiten.^{18, 19} Durch Bindung eines Epo-Moleküls an ein solches funktionelles Dimer kommt es zu einer Konformationsänderung in der extrazellulären Domäne, welche sich auf die zyttoplasmatische Domäne überträgt und Signalkaskaden aktiviert (Abbildung 2A).^{20, 21}

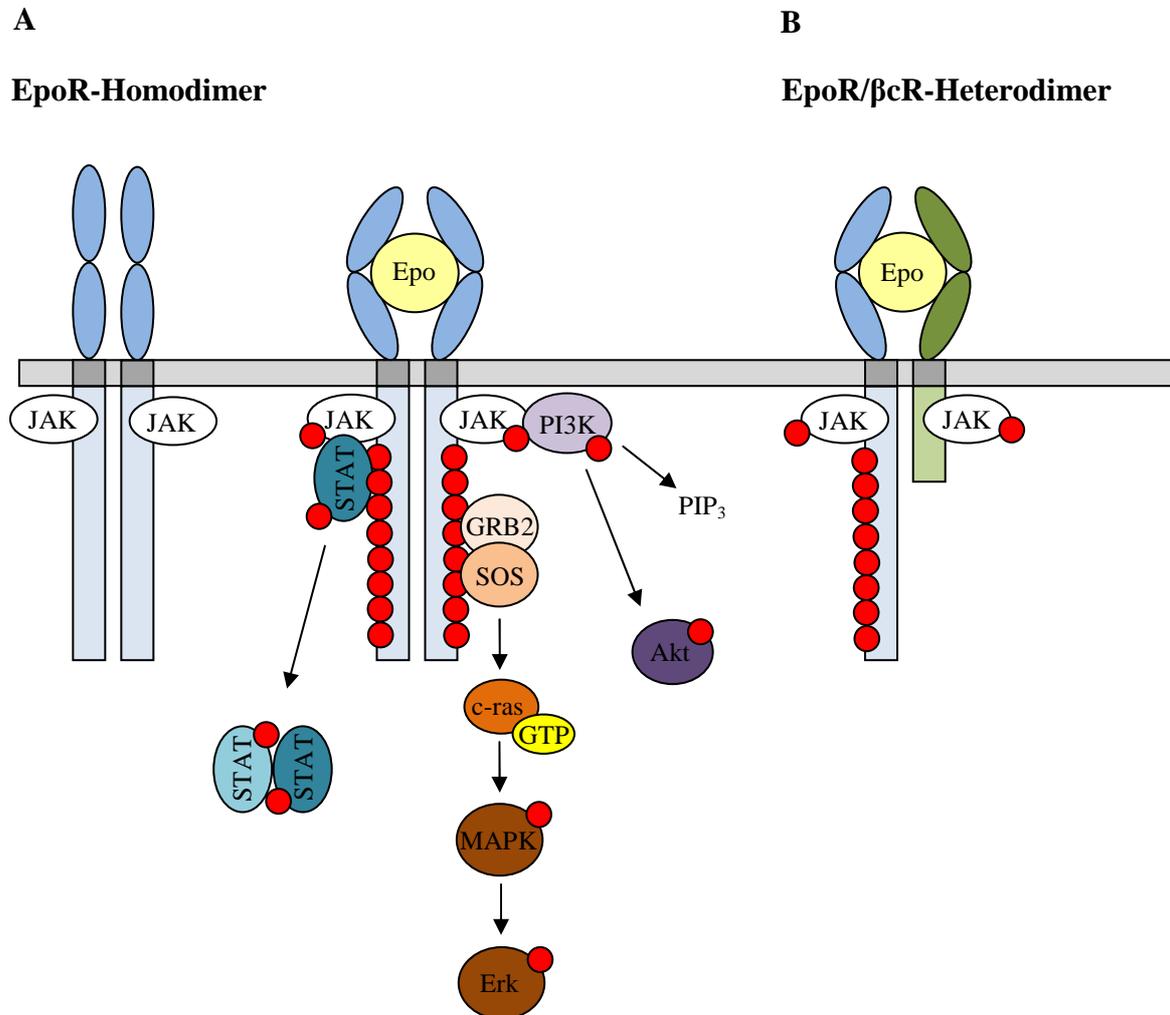


Abbildung 2. Schematische Darstellung des inaktiven und aktivierten EpoR-Homodimers mit Signaltransduktionskaskaden sowie eines Heterodimers aus EpoR und *common* β-Rezeptor (βcR). (A) Die Bindung von Epo an ein EpoR-Homodimer führt zur Konformationsänderung und Autophosphorylierung der assoziierten Janus Kinasen (JAK), welche die in der zyttoplasmatischen Domäne des EpoR lokalisierten Tyrosinreste phosphorylieren. Im weiteren Verlauf werden der STAT- (*signal transducer and activator of transcription*), der PI3K- (Phosphoinositol-3-Kinase) und MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) Erk- (*extracellular-signal regulated kinase*) Signalweg aktiviert. Phosphorylierungen sind mit roten Kreisen dargestellt. GRB2: *growth factor receptor bound protein-2*, SOS: *son of sevenless*, GTP: Guanosintriphosphat (B) Heterodimere aus einem EpoR und dem βcR können ebenfalls durch Epo aktiviert werden und die spezifischen Signalwege induzieren.

Zu den Signalkaskaden, die durch Epo aktiviert werden, gehören der STAT5A und STAT5B (*signal transducer and activator of transcription*), der MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*)/Erk- (*extracellular-signal regulated kinase*) Signalweg und die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), welche anschließend die Serin/Threonin-Kinase Akt phosphoryliert.²² Der erste Schritt der Signaltransduktion ist die gegenseitige Phosphorylierung der mit dem EpoR konstitutiv assoziierten Janus Tyrosin Kinasen 2 (JAK2), die durch die Konformationsänderung in unmittelbare Nähe zueinander kommen.²³ JAK2 aktiviert neben dem EpoR selbst die Tyrosinreste zahlreicher anderer Proteine. In der zytoplasmatischen Domäne des EpoR können bis zu 8 Tyrosinreste phosphoryliert werden, an welche Proteine mit SH2 (*src homology 2*)-Domänen binden. Diese können anschließend ebenfalls an ihren Tyrosinresten phosphoryliert werden. Durch negative Rückkopplungsmechanismen werden Tyrosin-Phosphatasen aktiviert, welche sowohl den EpoR als auch die JAK2 dephosphorylieren und die Signalkaskade unterbrechen.²⁴

Der EpoR ist zudem in der Lage mit anderen Rezeptoren, wie zum Beispiel dem *common* β -Rezeptor (β cR) des Interleukin-3-Rezeptors (IL-3) oder des GM-CSF-Rezeptors zu interagieren (Abbildung 2 B) und so Epo-spezifische Signalkaskaden zu aktivieren. Dies erklärt vermutlich synergistische Effekte von Epo, GM-CSF, IL-3 und anderen hämatopoietischen Faktoren auf die Erythropoese.²⁵⁻²⁷ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Stammzell-Faktor-Rezeptor (KIT) den EpoR durch Phosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosinreste aktiviert und dieser Mechanismus für die Bildung der CFU-E essentiell ist.²⁸

Auch in nicht-hämatopoietischen Zellen könnte die Heterodimersierung des EpoR mit anderen Rezeptoren von Bedeutung sein. Während Untersuchungen aus dem Jahr 2004 in β cR *knockout* Mäusen (β cR^{-/-}) darauf hinweisen, dass Epo gewebesetzende Effekte durch Bindung an einen EpoR/ β cR-Heterorezeptor vermittelt²⁹, zeigt hingegen die aktuellste Studie, dass kardioprotektive Effekte von Darbepoietin unabhängig vom β cR sind.³⁰ In Endothelzellen induziert Epo seine Wirkung auch über Heterorezeptoren aus dem β cR und dem VEGF (*vascular endothelial growth factor*)-Rezeptor 2.³¹ Dies zeigt, dass unterschiedliche Mechanismen für eine gewebespezifische Aktivierung der Epo-Signalkaskaden relevant sein können.

1.1.2.2. Expression des Erythropoietin-Rezeptors

Der EpoR wird von frühen und linienspezifischen hämatopoietischen Vorläuferzellen exprimiert, welche durch Epo in ihrer Proliferation und Differenzierung stimuliert werden. Während der Erythropoese nimmt die Anzahl der EpoR auf der Oberfläche der sich entwickelnden Zellen zunächst zu, mit fortschreitender Differenzierung jedoch wieder ab.³²⁻³⁴ So besitzt der früheste Zelltyp der erythroiden Linie, die BFU-E, noch eine relativ geringe Dichte von EpoR auf seiner Oberfläche, während primäre CFU-E und Proerythroblasten ca. 1.100 Rezeptoren/Zelle besitzen.³³ Reife Erythroblasten besitzen ca. 300 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche; bei Retikulozyten kann keine Epo-Bindung mehr detektiert werden.³³ Die Anzahl der EpoR auf Epo-abhängigen Zelllinien, beispielsweise KU812F und UT7/Epo, wird mit ca. 200 beziehungsweise 11.700 angegeben.^{35, 36} Ferner wurden moderate *EpoR* mRNA-Level und eine moderate Epo-Bindung in pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen beziehungsweise an Megakaryozyten detektiert.^{37, 38}

Die *EpoR* Expression konnte außerdem in zahlreichen nicht-hämatopoietischen Zellen oder Geweben nachgewiesen werden. Diese Informationen sind unter Berücksichtigung der jeweiligen Nachweismethode und mit Angabe der Spezies in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Expression des *EpoR* in nicht-hämatopoietischen Organen und Geweben unter Berücksichtigung der Spezies und Nachweismethode.

Organ/ Gewebe	Struktur/Zelltyp	Spezies	Nachweismethode und Referenz
Auge/ Retina	Ganglienzellen	<i>Homo sapiens</i>	<i>In-situ</i> Hybridisierung ³⁹ , RT-PCR, Immunhistochemie ⁸
	äußere und innere plexiforme Schicht	<i>Cavia aperea</i>	Immunhistochemie ⁴⁰
	Horizontalzellen	<i>Cavia aperea</i>	Immunhistochemie ⁴⁰
Darm	nicht spezifiziert	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ⁸
Herz	atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Western Blot ⁴¹
	Myokard	<i>Homo sapiens, Mus musculus, Rattus norvegicus</i>	Immunhistochemie ^{8, 41-44} , Western Blot ⁴⁵
	Epikard	<i>Mus musculus</i>	<i>In-situ</i> Hybridisierung ⁴³
	Endokard	<i>Mus musculus</i>	<i>In-situ</i> Hybridisierung ⁴³
	Perikard	<i>Mus musculus</i>	<i>In-situ</i> Hybridisierung ⁴³
	Fibroblasten	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Western Blot ⁴⁶
	Endothel	<i>Homo sapiens</i>	Immunhistochemie ⁴¹

Leber	Hepatozyten	<i>Homo sapiens</i> , <i>Sus scrofa</i>	RT-PCR ⁸ , <i>Real-time</i> PCR ⁴⁷ Immunhistochemie ⁸	
	Stromazellen	<i>Mus musculus</i>	Northern Blot ⁴⁸	
Lunge	Mesothel	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ^{8, 49}	
	Alveolen	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ^{8, 49}	
	Glatte Muskulatur	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ^{8, 49}	
	Chondrozyten	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ^{8, 49}	
	Endothel	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ⁴⁹	
Milz	nicht spezifiziert	<i>Homo sapiens</i> <i>Sus scrofa</i> , <i>Mus musculus</i> <i>Spalax ehrenbergi</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ⁸ <i>Real-time</i> PCR ^{47, 50} , Northern Blot ⁵¹	
	Neben- niere	Kortex	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ⁸
		Medulla	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ⁸
Niere	Kortex (Nierenrinde)	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> ,	RT-PCR ⁵² , Immunhistochemie ⁸	
	Medulla (Nierenmark)	<i>Rattus norvegicus</i>	RT-PCR ⁵² , Immunhistochemie ⁸	
	Papilla (Spitzen der Markkegel)		RT-PCR ⁵² , Immunhistochemie ⁸	
	proximaler Tubulus	<i>Homo sapiens</i>	Immunhistochemie ⁸	
Plazenta	binukleäre Zellen	<i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i>	¹²⁵ I-Epo-Bindung ⁵³	
	Trophoblasten	<i>Homo sapiens</i> , <i>Ovis aries</i>	RT-PCR ⁵⁴ , Immunhistochemie ^{54, 55} , Western Blot ⁵⁴	
	Endothel/Nabelschnur	<i>Homo sapiens</i>	Immunhistochemie ^{54, 56}	
	HUVEC (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR ⁵⁶ , ¹²⁵ I-Epo-Bindung ⁵⁷	
Prostata	Epithel, nicht spezifiziert	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ⁵⁸	
Testis	Leydig-Zellen	<i>Rattus norvegicus</i>	¹²⁵ I-Epo-Bindung ⁵⁹ , RT-PCR ⁶⁰	
Skelett- muskel	Satellitenzellen	<i>Mus musculus</i>	RT-PCR, Western Blot, Immunhistochemie ⁶¹	
Uterus	Endometrium (Epithel)	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ⁶²	
	Endothel des Endo- metriums	<i>Mus musculus</i>	Immunhistochemie ⁶³	
ZNS	Gehirn	<i>Homo sapiens</i>	RT-PCR, Immunhistochemie ^{8, 64}	
	Hirnstamm		RT-PCR, Immunhistochemie ⁸	
	Rückenmark		RT-PCR, Immunhistochemie ^{8, 64}	
	Gliazellen		RT-PCR ⁶⁴	
	Neuronen	<i>Homo sapiens</i> , <i>Rattus norvegicus</i>	RT-PCR ⁶⁴ , Immunhistochemie ^{64, 65}	
	Astrozyten	<i>Homo sapiens</i>	Immunhistochemie ⁶⁴	
	Endothel: RBEC (<i>rat brain capillary endothelial cells</i> , primäre Zellen)	<i>Rattus norvegicus</i>	RT-PCR, ¹²⁵ I-Epo-Bindung ⁶⁶	

Demnach wird der EpoR in einer Vielzahl von Organen, Geweben und Zelltypen exprimiert. Außer in den gewebespezifischen Zelltypen konnte der EpoR auch in endothelialen Zellen von Herz, Lunge, Gehirn und Plazenta detektiert werden. Während Expressionsanalysen auf RNA-Ebene durch RT-PCR, quantitative Real-time PCR oder Northern Blot als valide betrachtet werden können, müssen Daten, die allein durch immunhistochemische Analysen oder Western Blot gewonnen wurden, kritisch betrachtet werden. Grund dafür ist, dass die kommerziell erhältlichen EpoR Antikörper unspezifisch binden und beispielsweise im Western Blot mit anderen Proteinen wie dem Hsp70 (*heat shock protein 70*) kreuzreagieren. Auch die immunhistologischen Färbungen mit diesen Antikörpern sind teilweise inkonsistent; oftmals wurden damit auch Signale in Geweben von Mausmutanten mit homozygoter *EpoR* Deletion detektiert.^{67, 68}

Zwei jüngst publizierte und kontrovers diskutierte Studien von Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA, USA) stellen das Vorhandensein eines funktionellen EpoR-Homodimers auf endothelialen, kardialen, neuronalen und renalen Zellen sowie auf Tumorzellen in Frage.⁶⁹⁻⁷¹ So wurde in verschiedenen Zelllinien und primären Zellen zwar *EpoR* mRNA detektiert, aber in Western Blot Analysen mit einem neu entwickelten, EpoR-sensitiven Antikörper (A82, noch nicht kommerziell erhältlich) konnten nur auf einer der untersuchten Zelllinien (HUVEC) eine Zahl von 80 bis 160 EpoR-Homodimere nachgewiesen werden.⁶⁹ In Proteinpräparationen aus Leber, Niere, Gehirn und Herz war der EpoR mit dem A82-Antikörper nicht detektierbar. Zudem konnte in keiner der untersuchten Zellen durch Zugabe von rEpo eine Aktivierung des JAK/STAT-, Akt- oder MAPK/Erk-Signalwegs nachgewiesen werden. Dies wäre zumindest im Falle der HUVEC-Zellen zu erwarten gewesen.⁶⁹

Diese Daten stehen auch im Widerspruch zu den zahlreichen, voneinander unabhängigen und in verschiedenen Modellsystemen durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Studien zur Kardio- und Neuroprotektion durch rEpo/ESA (*Erythropoiesis Stimulating Agents*). Obwohl die Zahl der EpoR-Homodimere auf differenzierten Neuroblastomzellen SH-SY5Y sogar mit weniger als 50 angegeben wird, zeigen *EpoR knockdown*-Experimente in diesen Zellen, dass antiapoptotische Effekte von rEpo tatsächlich über den EpoR vermittelt werden.⁷² Daher kann man davon ausgehen, dass in nicht-hämatopoietischen Geweben, in denen *EpoR* mRNA exprimiert wird, der EpoR zumindest in geringer Dichte auf der Zelloberfläche präsentiert wird, wodurch die rEpo/ESA-vermittelten Effekte induziert werden können.

1.1.3. Rolle des Erythropoietin-Rezeptors im Herzen

1.1.3.1. Entwicklungsbiologische Relevanz des Erythropoietin-Rezeptors im Herzen

Erste Hinweise für eine Funktion von Epo und EpoR im Herzen resultierten aus der Untersuchung von transgenen Mäusen mit homozygoter Deletion des *Epo* (*Epo*^{-/-}) oder des *EpoR* (*EpoR*^{-/-}) Gens.^{43, 73} Beide Mausmutanten sind embryonal letal (E12.5) und weisen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen - neben einer schweren Anämie - am Herzen eine Hypoplasie der Ventrikel, eine Ablösung des Epikards sowie eine gestörte Gefäßbildung auf. Darüber hinaus ist die Zahl der proliferierenden Kardiomyozyten deutlich reduziert, was als Hinweis darauf verstanden wird, dass Epo in frühen Entwicklungsstadien die Zellteilung stimuliert.⁴³ Ein weiteres Indiz für die Relevanz des endogenen Epo/EpoR Systems während der Embryonalentwicklung lieferte die *hEpoR*⁺ Maus, eine *EpoR*^{-/-} Mausmutante, die das humane *EpoR* Transgen exprimiert. Die Nachkommen dieser Linie überleben den sonst letalen hämatopoietischen Phänotyp bis ins Erwachsenenalter ohne Störung der Herzentwicklung oder -funktion.⁷³

Um den Einfluss der *EpoR* Expression auf die Entwicklung nicht-hämatopoietischer Gewebe zu untersuchen, wurde eine Mausmutante entwickelt, deren *EpoR* Gen sich unter der Kontrolle einer *Gata1*-HRD (*hematopoietic regulatory domain*) Kasette befindet. Die *EpoR* Expression ist bei diesen Tieren aufgrund der Kontrolle durch den *Gata1* Promotor auf hämatopoietische Zellen beschränkt. Die Tiere überleben bis ins Erwachsenenalter, haben ein morphologisch normal entwickeltes Herz und unter Normalbedingungen eine normale Herzfunktion.⁷⁴ Daher wurde zunächst postuliert, dass die gestörte Herzentwicklung in *EpoR*^{-/-} Mäusen auf die verminderte Anzahl von zirkulierenden Erythrozyten und somit auf eine Sauerstoffminderversorgung der Kardiomyozyten zurückzuführen ist.⁷⁴ Allerdings könnten in der *Gata1*-HRD *EpoR* Mausmutante auch andere *Gata*-Transkriptionsfaktoren das *Gata1*-Element unspezifisch induzieren und somit die normale Herzentwicklung bedingen.⁷⁵ Hinweise für die Bedeutung des EpoR in der Herzentwicklung liefern auch zahlreiche *in vitro* Studien, in denen sich rEpo positiv auf die Proliferation und das Überleben von Kardiomyozyten auswirkt.^{76, 77} Eine Mausmutante mit konditionaler Deletion des *EpoR* Gens im Herzen wurde bislang nicht beschrieben.

1.1.3.2. Kardioprotektive Effekte durch rekombinantes Erythropoietin

Wie *in vitro* und *in vivo* Experimente zeigen, spielt der EpoR nicht nur während der Kardiogenese eine Rolle, sondern vermittelt auch kardioprotektive Effekte von rEpo. Tabelle 2 fasst die wesentlichen *in vivo* Experimente zur Kardioprotektion durch rEpo zusammen:

- a) aus dem Schädigungsmodell „Myokardinfarkt“ (MI), bei dem durch Verschluss einer Koronararterie ein Infarkt induziert wird,
- b) das Modell der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion (I/R), in welchem der Herzmuskel einer begrenzten Ischämie und anschließender Reperfusion ausgesetzt wird, und
- c) aus dem Schädigungsmodell einer durch das Anthrazyklin Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie.

Tabelle 2. Zusammenfassung wesentlicher Publikationen zur *in vivo* Kardioprotektion durch rEpo oder rEpo-Derivate in wichtigen Schädigungsmodellen.

Schädigungsmodell und Spezies	Dosis (rEpo, CEPO oder Darbepoietin- α)	Effekt
MI ⁷⁸ <i>Rattus norvegicus</i>	rEpo 5000 U/kg nach MI (s.c. täglich für 4 Tage) 1000 U/kg nach MI (s.c. 3x pro Woche für 4 Wochen)	- erhöhte Kapillardichte - reduzierte Infarktgröße - verbesserte Herzfunktion (LVEDP, EF%)
MI ⁷⁹ <i>Mus musculus</i>	rEpo 1000 U/kg (12 Stunden vor LAD-Ligation) oder Mausmutante mit transgener Epo-Überexpression (<i>tg6</i> Maus)	- reduzierte Infarktgröße
MI ⁸⁰ <i>Rattus norvegicus</i>	CEPO 5 μ g/kg (i.v. 5 min vor Reperfusion) 50 μ g/kg (s.c. jeden Tag für 6 Tage)	- Hämatokrit unverändert - verbesserte Herzfunktion (LVIDd, EF%, EDV, ESV)
MI ⁸¹ <i>Rattus norvegicus</i>	rEpo 1500 U/kg (s.c. Beginn 6 Wochen nach Myokardinfarkt, 2x wöchentlich für 4 Wochen)	- verringerte Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-6) - verbesserte Herzfunktion (LVEDP, EF%, LV dP/dt) - verringerte Fibrose

I/R⁸² <i>Rattus norvegicus</i>	Darbepoietin-α 40 μ g/kg (i.p. direkt nach LAD-Ligation oder nach Ligation und alle drei Wochen 1x für 9 Wochen, oder alle drei Wochen 1x, Start 3 Wochen nach Ligation)	- reduzierte Infarktgröße - verbesserte Herzfunktion (LVEDP, LV dP/dt) - vermindertes ANP im Plasma - erhöhte Kapillardichte
I/R⁴⁶ <i>Oryctolagus cuniculus</i>	rEpo 1000 U/kg (12 Stunden vor Ischämie) 5000 U/kg (während der Ischämie)	- verbesserte Herzfunktion (LVEDP, LV dP/dt) - verringerte Apoptose - reduzierte Infarktgröße
I/R⁸³ <i>Rattus norvegicus</i>	rEpo 5000 U/kg (i.p. 24 Stunden und 0.5 Stunden vor Ischämie)	- verbesserte Herzfunktion (LVEDP) - verringerte Apoptose
I/R⁸⁴ <i>Mus musculus</i>	rEpo 2500 U/kg (i.v. 24 Stunden und 30 min vor Ischämie)	- verringerte Apoptose - reduzierte Infarktgröße
I/R⁸⁵ <i>Rattus norvegicus</i>	rEpo 5000 U/kg (i.p. 24 Stunden vor Ischämie)	- reduzierte Infarktgröße - verminderte Infiltration neutrophiler Granulozyten - verringerte Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6) - erhöhte Expression anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10)
I/R⁸⁶ <i>Rattus norvegicus</i>	rEpo 5000 U/kg (i.p. 24 Stunden vor Ischämie)	- reduzierte Infarktgröße - gesteigerte COX-2 Expression - gesteigerte Synthese der Prostaglandine E ₂ und F _{1α} im Myokard
Dox-induzierte Kardiomyopathie⁸⁷ <i>Mus musculus</i>	rEpo 5000 U/kg mit Start der Dox-Behandlung (i.p. alle 5 Tage für 2 Wochen)	- verbesserte Herzfunktion (LVEDP, FS%, LV dP/dt) - verringerte myokardiale Fibrose - reduzierte COX-2 Expression
Dox-induzierte Kardiomyopathie⁴⁵ <i>Mus musculus</i>	rEpo 1000 U/kg während der Dox-behandlung (alle 3 Tage für 3 Wochen)	- verbesserte Herzfunktion (Herzrate, FS%) - verringerte LDH-Aktivität
Dox-induzierte Kardiomyopathie⁸⁸ <i>Rattus norvegicus</i>	rEpo 2500 U/kg mit Start der Dox-behandlung (i.p. 6x über 2 Wochen)	- verringerte Apoptose - reduzierte Fibrose - verbesserte Herzfunktion (LVEDP, FS%, LV dP/dt)

Abkürzungen: CEPO, carbamylisiertes Erythropoietin; COX-2, Cyclooxygenase-2; Dox, Doxorubicin; EDV, enddiastolisches Ventrikelvolumen; EF, Auswurfraction; ESV, endsystolisches Ventrikelvolumen; FS, Verkürzungsfraction; I/R, Ischämie/Reperfusion; LAD, *left anterior descending artery*; LDH, Lactatdehydrogenase; LVEDP, linksventrikulärer enddiastolischer Druck; LVIDd linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; MI, Myokardinfarkt.

Die in Tabelle 2 zusammengefassten Ergebnisse verdeutlichen, dass in allen Schädigungsmodellen durch ESA die Herzfunktion verbessert werden konnte. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass apoptotische und inflammatorische Prozesse sowie fibrotische Veränderungen des Herzmuskels deutlich minimiert wurden. Obwohl das *Epo* Gen im adulten gesunden Herzen nicht exprimiert wird, scheint interessanterweise in Infarktarealen des Myokards sowie in Hypoxie-konditionierten murinen Herzen das *Epo-Silencing* aufgehoben zu sein, da *Epo* mRNA beziehungsweise Epo Protein in diesen Schädigungsmodellen detektiert werden konnte.^{89, 90} Dies könnte auf eine autokrine und/oder parakrine Funktion vom endogenen Epo hinweisen.

Unser heutiges Verständnis der molekularen Grundlagen der Kardioprotektion durch rEpo ist in Abbildung 3 zusammengefasst. Eine zentrale Rolle spielt dabei die *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS). Durch Stimulation der Kardiomyozyten mit rEpo wird die *eNOS*-Expression durch AP-1 (*activator protein 1*) gesteigert, während gleichzeitig das Enzym durch Phosphorylierung aktiviert wird. Das durch die eNOS gebildete Stickstoffmonoxid vermindert zum einen oxidativen Stress durch Inhibition der NADPH-Oxidase, zum anderen induziert es antiapoptotische Prozesse durch Inhibition der Caspase-3/Caspase-8 Aktivierung und Modulation der *bcl-2*-Expression.^{84, 91} Zudem verhindert Stickstoffmonoxid die Infiltration von Leukozyten ins Myokard.^{85, 91} Ein weiterer Prozess, der die Inflammation reduziert, ist die STAT3/5 vermittelte Repression der Gene für die proinflammatorischen Zytokine *TNF- α* , *IL-6* und *IL-1 β* .^{81, 85} Weiterhin scheint der Transkriptionsfaktor Gata4 eine zentrale Rolle zu spielen: rEpo induziert die Gata4-Phosphorylierung, was zu einer erhöhten Expression von *bcl-2* führt.^{92, 93} Im Gegensatz dazu hebt die Überexpression einer dominant-negativen Form von Gata4 (dnGata4) in Kardiomyozyten die kardioprotektiven Effekte von rEpo auf.⁹³ Weitere durch Gata4 regulierte Gene, die im Rahmen der Kardioprotektion durch rEpo eine Rolle spielen, sind *bcl-x(L)* und *Vegf*.⁹⁴⁻⁹⁶

Neben der akuten Kardioprotektion ist rEpo auch für eine Gefäßneubildung und damit für ein verbessertes *remodelling* des geschädigten Herzens relevant. Es wurde gezeigt, dass rEpo die Anzahl der zirkulierenden *endothelial progenitor cells* (EPCs) sowie deren Proliferation, Migration und Fähigkeit zur Adhäsion in neu gebildeten Blutgefäßen erhöht, während es gleichzeitig proapoptotische Prozesse hemmt.⁹⁷⁻¹⁰²

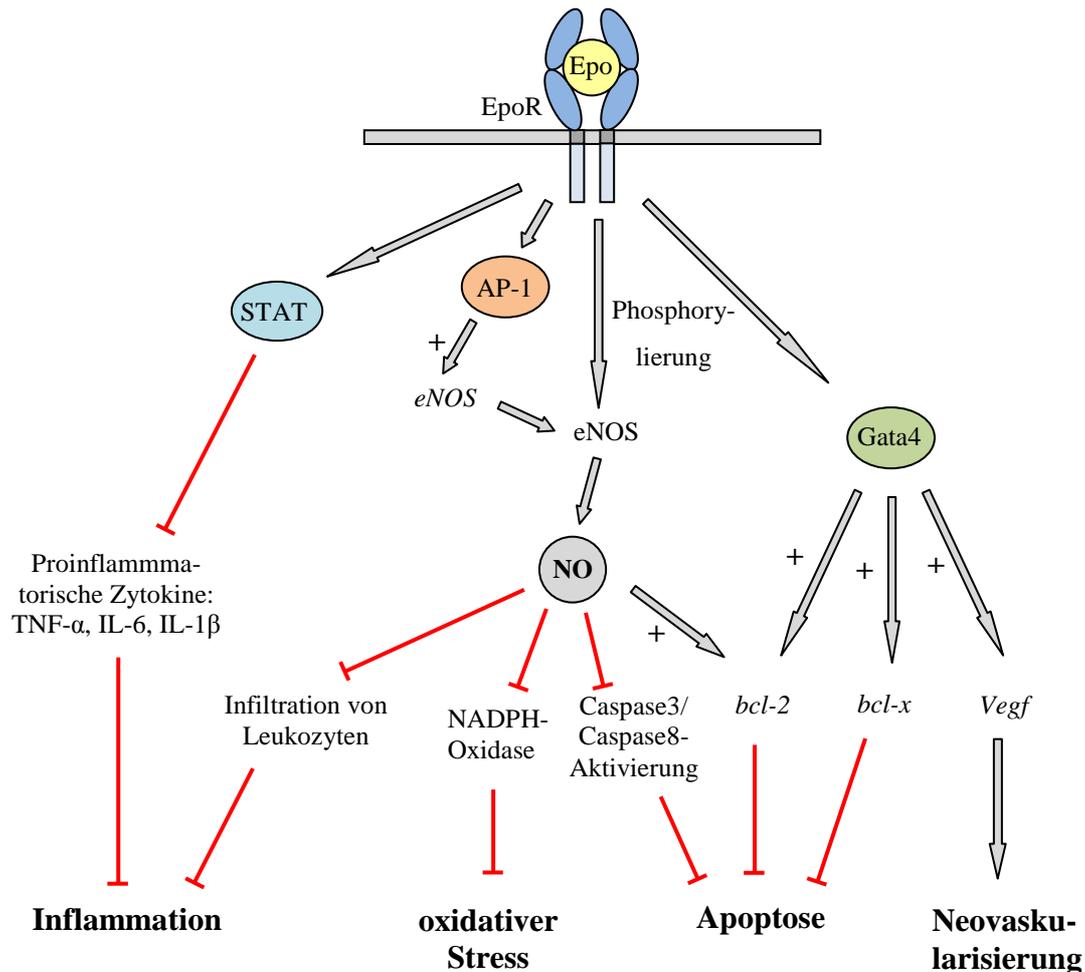


Abbildung 3. Schematische Darstellung molekularer Mechanismen, die durch rEpo ausgelöst werden und zur Kardioprotektion führen. Zentrale Rollen spielen die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Gata4, welcher die Genexpression der antiapoptotischen Faktoren *bcl-2* und *bcl-x* sowie des Wachstumsfaktors *Vegf* positiv beeinflusst (+) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS).

Ein wichtiges Schädigungsmodell, welches auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ist die Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie. Doxorubicin, ein Anthrazyklin-Derivat, ist ein Chemotherapeutikum zur Behandlung von Leukämien und soliden Tumoren. Die klinische Anwendung ist allerdings oftmals durch kardiotoxische Effekte limitiert.^{103, 104} Eine Kardiomyopathie ist insbesondere durch die Vergrößerung der Ventrikel und eine daraus resultierende globale Herzinsuffizienz gekennzeichnet. Die Pathomechanismen der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie sind nur teilweise verstanden. Einige Studien zeigen, dass eine Störung der adrenergen Regulation, Calciumüberschuss in den Zellen sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) daran beteiligt sind.¹⁰⁵⁻¹⁰⁹

Zudem triggern oxidativer Stress und die Abnahme der endogenen Antioxidantien die intrinsische, Mitochondrien-abhängige Apoptose.^{110, 111} Ferner wird in primären Kardiomyozyten der Ratte durch Doxorubicin die Caspase-3 aktiviert; eine Depletion der Histonacetyltransferase p300 führt zur Akkumulation des Tumorsuppressors p53.^{112, 113} Ein zentraler Aspekt ist die Depletion des Transkriptionsfaktors Gata4, welche auf RNA- als auch auf Proteinebene gezeigt wurde.^{87, 94} Da Gata4 ein positiver Regulator wichtiger kardialer Gene ist, beispielsweise für die sarkomeren Proteine α -MHC (*myosin heavy chain*) und Troponin I, resultiert dies in einer verminderten Kontraktilität des Herzmuskels.⁸⁷ Außerdem wird durch den Gata4 Mangel die Expression der antiapoptotischen Gene *bcl-2* und *bcl-x(L)* supprimiert.^{92, 94}

Im Kontext einer Kardioprotektion durch rEpo ist bedeutsam, dass durch Doxorubicin-Behandlung die EpoR Proteinlevel im Myokard reduziert werden.⁸⁷ Interessanterweise kann durch eine Applikation von rEpo sowohl die Doxorubicin-vermittelte Gata4 Depletion, als auch der EpoR Abbau aufgehoben werden.⁸⁷

Trotz zahlreicher tierexperimenteller Studien, welche eine Gewebeprotektion durch rEpo zeigen, sind die ersten klinischen Studien zur Kardioprotektion durch rEpo bei Patienten mit Myokardinfarkten eher enttäuschend.¹¹⁴⁻¹¹⁶ In zwei Studien blieben bei einer einmaligen Gabe von Darbepoietin- α (300 μ g i.v.) beziehungsweise Epoietin- α (40.000 U i.v.) signifikant positive Effekte aus.^{115, 116} Allerdings wurde in der Darbepoietin- α -Gruppe eine erhöhte Anzahl von EPC's im Blut gemessen.¹¹⁶ Im Gegensatz dazu konnte in einer weiteren Studie durch eine dreimalige Gabe von rEpo (3 x 30.000 U i.v.) die Infarktgröße signifikant reduziert werden.¹¹⁴ In allen Studien zur Kardioprotektion wurde die Applikation von Epo oder den Epo-Derivaten gut vertragen. Allerdings sind andere Studien, die eine Häufung von kardiovaskulären Komplikationen zeigten, zu berücksichtigen. Bei Patienten mit Diabetes, Niereninsuffizienz und Anämie hat Darbepoietin- α keinen Benefit erbracht (maximal 600 μ g monatlich i.v., Dosis abhängig vom Hämoglobinlevel).¹¹⁷ In der aktuellsten Studie wurde bei Schlaganfall-Patienten neben rt-PA (*recombinant tissue-type plasminogen activator*) hochdosiertes rEpo zur Neuroprotektion eingesetzt (3 x 40.000 U i.v.).¹¹⁸ Während bei Patienten, welche entweder nur rEpo oder rt-PA erhielten, ein Benefit zu beobachten war, stieg in jener Patientengruppe, welche rEpo und rt-PA in Kombination erhielt, die Mortalität infolge von Hirnblutungen, Hirnödemen und Thrombosen signifikant an.¹¹⁸

Experimentelle Studien weisen darauf hin, dass die Komplikationen in den klinischen Studien möglicherweise auf geschädigte Endothelien zurückzuführen sind. Beispielsweise wird Thromboplastin in der extrazellulären Matrix von Endothelzellen durch rEpo verstärkt exprimiert, was zu einer größeren Haftung der Thrombozyten an vorgeschädigten Endothelien führt.¹¹⁹ Zudem stimuliert rEpo die Bildung einer *Neointima* (verdickte Endothelschicht im Gefäß) und führt so zu Stenosen in einer vorgeschädigten *Carotis*-Arterie.¹²⁰ Beide Faktoren könnten zu einer erhöhten Thrombosegefahr führen. Die klinischen Studien zeigen, dass den Grundlagen der EpoR Biologie in nicht-hämatopoietischen Zellen für die Gewebeprotektion durch rEpo eine essentielle Rolle zukommt.

1.1.4. Regulation des *EpoR* Gens unter Nomoxie

Das *EpoR* Gen ist ein *single-copy* Gen und liegt beim Menschen auf dem proximalen Arm vom Chromosom 19 (NCBI *Accession*: NG_021395), bei der Maus auf dem proximalen Arm vom Chromosom 9 (NCBI *Accession*: NC_000075). Beide sind mit einer Länge von 5 (murin) bis 6.5 kb (human) relativ kurze Gene, die aus 8 Exons bestehen.¹ Das humane und murine Gen sind zu 81.6% homolog. Während in der 3' Region die Homologie nach dem Stoppcodon endet, ist der Promotorbereich bis ca. 200 bp *upstream* des ATG-Startcodons in Säugern stark konserviert. Dieser Promotorbereich ist in hämatopoietischen Zellen für eine basale *EpoR* Transkription essentiell und wurde als „minimaler Promotor“ definiert.¹ Abbildung 4 stellt schematisch einen Teil des murinen *EpoR* Genlocus sowie einen Ausschnitt aus dem minimalen Promotor dar.

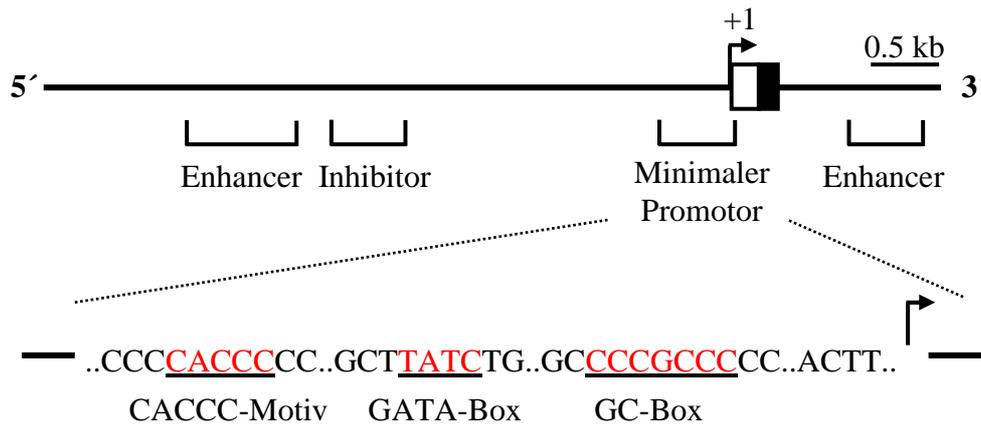


Abbildung 4. Der Promotorbereich des murinen *EpoR* Gens. Die Transkriptionsstartstelle ist mit einem Pfeil, die 5' UTR (*untranslated region*) mit einer weißen Box und Exon 1 mit einer schwarzen Box dargestellt. Die Enhancer und Inhibitor Elemente wurden von Youssouffian *et al.* und Heberlein *et al.* identifiziert.^{1, 5-8} Der untere Teil der Abbildung stellt einen Ausschnitt aus dem minimalen Promotor mit proximalem CACCC-Element, GATA-Bindungsstelle und GC-Box dar. Die Abbildung wurde nach Youssouffian *et al.* modifiziert.⁹

Der minimale Promotor enthält essentielle Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren: drei CACCC-Motive, eine GATA-Box sowie eine GC-Box.^{1, 121, 122} Auffällig ist, dass sich im gesamten Promotorbereich keine TATA-Box oder CAAT-Box befinden.¹ Diese beiden klassischen Konsensus-Sequenzen spielen im Promotor vieler Gene eine Rolle beim Aufbau des Transkriptionsinitiationskomplexes. So bindet zum Beispiel an die TATA-Box TBP (*TATA binding protein*), ein mit dem Transkriptionsfaktor II D (TFIID) assoziiertes Protein. In Übereinstimmung mit dem Fehlen der TATA-Box konnte auch keine direkte Bindung von TFIID an den *EpoR* Promotor nachgewiesen werden.¹²¹

Die transkriptionelle Regulation des *EpoR* Gens wurde zunächst sowohl in humanen als auch in murinen hämatopoietischen Zellen charakterisiert. Der Promotor wird in hämatopoietischen Zellen durch Bindung des ubiquitär exprimierten Sp1 an die GC-Box und Bindung des Transkriptionsfaktors Gata1 an die GATA-Box aktiviert.^{7, 121, 123} Interessanterweise wird in frühen hämatopoietischen Vorläuferzellen durch die Aktivierung des EpoR ein positiver Rückkopplungsmechanismus induziert: der hämatopoietische Transkriptionsfaktor Gata1 wird durch Phosphorylierung aktiviert, wodurch nicht nur die Expression von *Gata1*, sondern auch die des *EpoR* verstärkt wird.^{7, 123}

Gata1 gehört zur Familie der Gata-Transkriptionsfaktoren, welche sich durch die Bindung an die gemeinsame namensgebende Konsensus-Sequenz (A/T)GATA(A/G) auszeichnet und sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten hochgradig konserviert ist.¹²⁴ Auf Gata-Transkriptionsfaktoren soll im Folgenden noch näher eingegangen werden.

Sp1 (*specificity protein 1*) ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der sich durch das Vorhandensein von drei aufeinanderfolgenden klassischen Cys₂-His₂ Zinkfingern und einer BTD (*buttonhead*)-Box (Cys-X-Cys-Pro-X-Cys, X steht für eine beliebige Aminosäure) im N-Terminus auszeichnet.^{125, 126} Bislang wurden 8 weitere Transkriptionsfaktoren aus dieser Familie identifiziert (Sp2-Sp9), wobei nur Sp1 als Aktivator des *EpoR* Gens bekannt ist.¹²⁶ Ferner wurde kürzlich die transkriptionell aktive Spleiß-Variante des *Wilms' tumor suppressors* Wt1(-KTS) als positiver Regulator des *EpoR* Gens identifiziert, der in sehr frühen hämatopoietischen Zellen (CD117+) die Transaktivierung durch Bindung an die GC-Box vermittelt.^{121, 127}

CACCC-Motive kommen häufig im proximalen Promotor von Hämoglobin- und anderen erythroid-spezifischen Genen vor und sind meist mit GATA- und GC-Boxen assoziiert.¹²⁸ Der humane *EpoR* Promotor besitzt insgesamt fünf CACCC-Motive, welche in der distalen 5' Region des Promotors liegen und deren Deletionen kaum einen Effekt auf die Promotoraktivität haben.^{121, 129} Der murine Promotor des *EpoR* Gens besitzt innerhalb des minimalen Promotors nur drei CACCC-Motive, wobei das am weitesten proximal liegende CACCC-Motiv (Abbildung 4) in hämatopoietischen Zellen signifikant zur Promotoraktivität beiträgt.⁵ Transkriptionsfaktoren der Sp und KLF- (*krüppel-like factor*) Familien interagieren mit solchen CACCC-Boxen.^{126, 130, 131} Die Proteine der KLF-Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch 3 konservierte Cys₂-His₂ Zinkfinger aus.^{126, 131}

Darüber hinaus befinden sich im Promotor und im ersten Intron des murinen *EpoR* Gens zwei weitere Enhancer- und ein Inhibitor-Element (Abbildung 4).^{5, 6, 9} Beide Enhancer wurden als DNaseI hypersensitive Bereiche identifiziert.^{5, 132} Der distal gelegene Enhancer weist in MEL-Zellen (erythroide Vorläuferzellen im Stadium der CFU-E) eine mehr als doppelt so hohe Aktivität auf wie in früheren hämatopoietischen Vorläuferzellen (BFU-E), was auf eine linien- und entwicklungsabhängige Regulation des *EpoR* Promotors hinweist.^{5, 9} Der Enhancer im ersten Intron des *EpoR* Gens zeigt ebenfalls in hämatopoietischen Zellen eine vielfach höhere Aktivität als in nicht-hämatopoietischen Zellen, beispielsweise HeLa-Zellen oder 3T3-Fibroblasten.¹³² Mittels Reporteranalysen in hämatopoietischen Zellen wurde im *EpoR* Promotor das Inhibitor-Element mit alterna-

tivem Transkriptionsstart identifiziert. Es wird postuliert, dass die Inhibition über eine transkriptionelle Interferenz vermittelt wird.⁶

Die transkriptionelle Regulation des *EpoR* Gens wurde nicht nur in hämatopoietischen, sondern auch in unterschiedlichen neuronalen Zelllinien untersucht. Während in humanen neuronalen Teratomzellen (NT2-Zellen) GATA3 und Sp1 als Aktivatoren interagieren, führten eine Überexpression von GATA2, -3 oder -4 oder eine siRNA gegen diese Faktoren in undifferenzierten humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) zu keiner Änderung der *EpoR* mRNA-Level.^{44, 133} Interessanterweise scheinen auch epigenetische Mechanismen die Aktivität des humanen *EpoR* Promotor zu beeinflussen. Während die meisten CpG-Motive in der Promotorregion -600 bis +149 (relativ zum Transkriptionsstart) in den SH-SY5Y Zellen unmethyliert waren, sind diese Motive in Gewebeproben des adulten humanen Gehirns methyliert. Durch Demethylierung der DNA konnte in SH-SY5Y Zellen die *EpoR* Expression signifikant gesteigert werden.¹³³

1.1.5. Regulation des *EpoR* Gens unter Hypoxie

Eine Stimulation der *EpoR* Expression unter Hypoxie wurde in verschiedenen Zellen beziehungsweise Organsystemen nachgewiesen. Beispielsweise konnte die Expression der *EpoR* mRNA in endothelialen Vorläuferzellen und im ausdifferenzierten Endothel, in primären Neuronen sowie in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, aber auch in anderen Tumorzelllinien durch Hypoxie gesteigert werden.^{44, 133-137} Außerdem wurde bei Ratten unter Hypoxie ein Anstieg der *EpoR* Expression im *Glomus caroticum*, einer Ansammlung von Chemorezeptoren an der *Carotis*, nachgewiesen.¹³⁸ Die Mechanismen der hypoxischen Induktion des *EpoR* Gens sind bislang nicht identifiziert worden.

1.2. Regulation des *hypoxia inducible factor* (HIF)

Ein zentraler Regulator für die Anpassung von Zellen und Geweben an hypoxische Bedingungen, wie sie beispielsweise während eines Myokardinfarkts oder im Schädigungsmodell der Ischämie/Reperfusion vorkommen, ist der Transkriptionsfaktorkomplex HIF (*hypoxia inducible factor*). HIF induziert unter Hypoxie die Expression von mehr als 70 Genen.³ Zu diesen gehören das *Epo* Gen sowie die Gene zahlreicher glykolytischer Enzyme, Glukosetransporter und von Wachstumsfaktoren wie *Vegf*.^{3, 139-141} Abbildung 5

fasst grundlegende Mechanismen der Regulation von HIF unter Normoxie und Hypoxie zusammen.

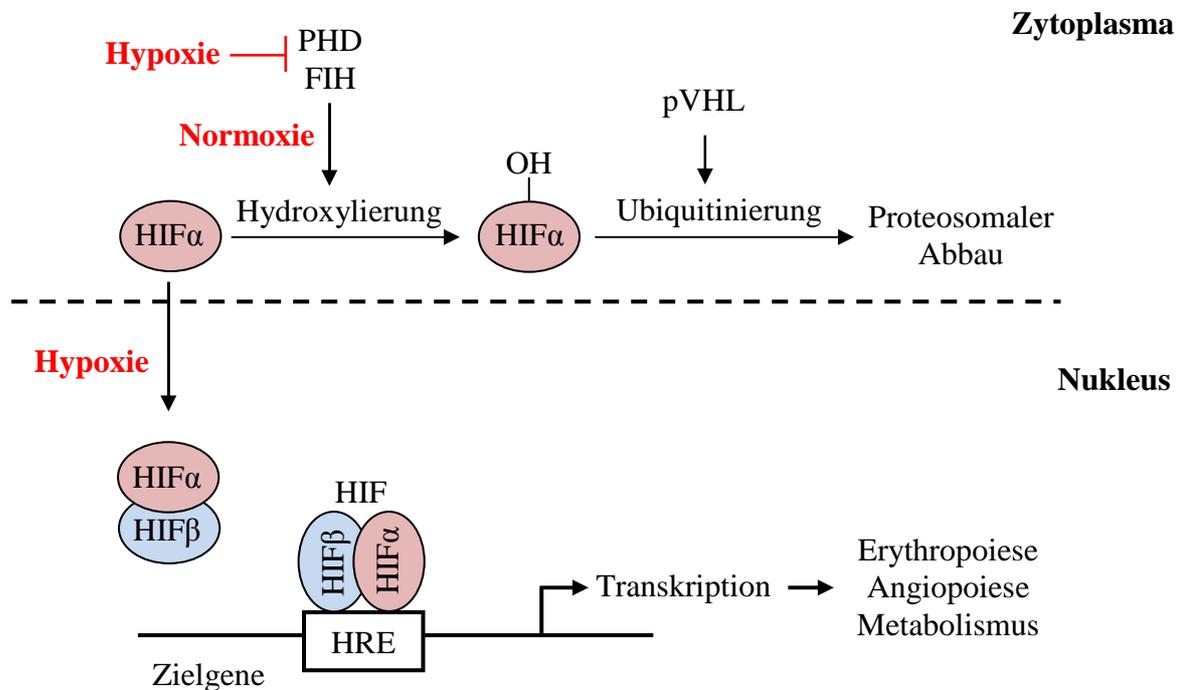


Abbildung 5. Darstellung grundlegender Mechanismen der posttranslationalen Regulation von HIF (hypoxia inducible factor) unter Normoxie und Hypoxie. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF α durch PHD (*prolyl-4-hydroxylase domain-containing protein*) und FIH (*factor inhibiting HIF*) hydroxyliert und durch pVHL (Von-Hippel-Lindau) für den proteosomalen Abbau markiert. Unter Hypoxie werden PHD und FIH gehemmt, HIF α wird in den Nucleus transportiert und bildet zusammen mit HIF β das transkriptionell aktive HIF, welches an das HRE (*hypoxia response element*) des Zielgens bindet.

Die transkriptionell aktive Form von HIF besteht aus einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit sowie einer α -Untereinheit (HIF-1 α , HIF-2 α oder HIF-3 α), welche hauptsächlich auf Proteinebene durch Sauerstoff reguliert wird. Die Gene für beide Untereinheiten werden fortlaufend transkribiert und translatiert. Unter Normoxie wird die α -Untereinheit an zwei spezifischen Prolylresten durch Prolylhydroxylasen (*Prolyl-4-hydroxylase domain-containing proteins*, PHD1, PHD2, PHD3 oder PHD4), und an einem Asparglylrest durch eine Asparglylhydroxylase (FIH, *factor inhibiting HIF*) hydroxyliert.¹⁴²⁻¹⁴⁷ Diese spezifischen Hydroxylierungen werden vom Tumorsuppressor Von-Hippel-Lindau (pVHL) erkannt, welches die α -Untereinheit ubiquitiniert und somit für den proteosomalen Abbau markiert.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Bei einem ausreichenden Sauerstoffangebot wird so der Aufbau des

vollständigen HIF-Komplexes aus den beiden Untereinheiten verhindert. Wie in Abbildung 5 dargestellt, bleibt unter hypoxischen Bedingungen die Hydroxylierung an den Prolyl- und Asparagylresten aus. Die α -Untereinheit von HIF wird damit stabilisiert und die transkriptionell aktive Form von HIF kann ausgebildet werden. Über diesen Mechanismus ist die Zelle sehr schnell in der Lage auf Hypoxie zu reagieren und Gene zu aktivieren, welche zur Anpassung an die reduzierte Sauerstoffversorgung erforderlich sind.

HIF-Transkriptionsfaktorkomplexe vermitteln ihre Aktivität über die Bindung an das HRE (*hypoxia response element*).³ Dieses aus der *Core*-Sequenz CGTG und weiteren flankierenden Basen bestehende DNA-Element ist in Abbildung 6 dargestellt.

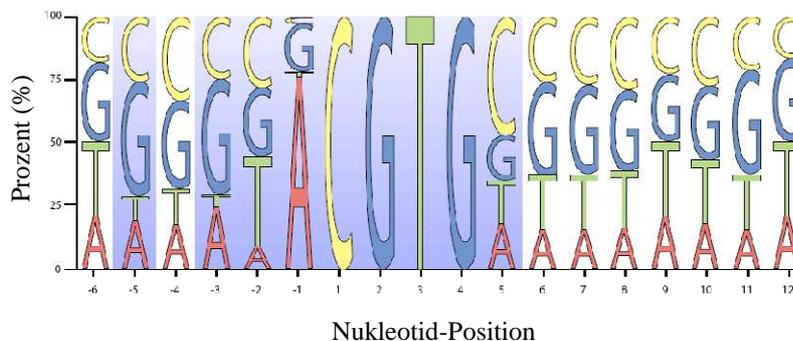


Abbildung 6. Konsensus-Sequenz des HRE (*hypoxia response elements*). Relative Häufigkeit (%) der Nucleotide in 108 bekannten HRE-Motiven. Blau hinterlegte Boxen kennzeichnen Basen, welche mit der HIF α -Untereinheit interagieren. Die Abbildung wurde von Wenger *et al.* übernommen und modifiziert.³

Das Vorhandensein des HRE-*Core*-Motivs ist zwar für eine transkriptionelle Aktivierung der Zielgene unter Hypoxie notwendig, jedoch nicht ausreichend. Meist befinden sich DNA-Bindungsmotive für andere Transkriptionsfaktoren in unmittelbarer Nähe des HRE. Diese Faktoren sind oft nicht durch Hypoxie induzierbar, amplifizieren aber die Hypoxie-Antwort.³ *Hypoxia response* Elemente können in Promotoren (zum Beispiel bei *Wt1*), in intronischen Bereichen (*Angiopoietin*), oder 3' des Polyadenylierungssignals ihrer Zielgene lokalisiert sein (*Epo*).¹⁵¹⁻¹⁵⁵

1.3. Gata-Transkriptionsfaktoren

1.3.1. Charakteristika der Gata-Transkriptionsfaktoren

Gata-Transkriptionsfaktoren stellen bei Vertebraten eine Gruppe von sechs verschiedenen Proteinen dar, die eine zentrale Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen spielen.¹⁵⁶ Die Proteine dieser Familie von Transkriptionsfaktoren sind ca. 50 kDa groß und zeichnen sich durch zwei hochkonservierte Zinkfinger motive aus. Der C-terminale Zinkfinger bildet zusammen mit einer benachbarten, stark basischen Region die DNA-Bindungsdomäne, welche an die Konsensus-Sequenz (A/T)GATA(A/G) in den regulatorischen Elementen der Zielgene bindet.¹²⁴

In Säugern unterscheidet man die Gata-Transkriptionsfaktoren unter anderem aufgrund ihres Expressionsmusters: *Gata1*, *Gata2* und *Gata3* werden als „hämatopoetische“ Gata-Transkriptionsfaktoren bezeichnet und sind in die Proliferation und Differenzierung von erythroiden und myeloiden Zellen sowie T-Helferzellen involviert.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ *Gata4*, *Gata5* und *Gata6* hingegen bilden eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, welche hauptsächlich in Geweben meso- oder endodermalen Ursprungs exprimiert werden und dort eine wichtige entwicklungsbiologische Rolle spielen.¹⁶⁰⁻¹⁶³

1.3.2. Gata-Transkriptionsfaktoren im Herzen

Die Expression von Gata-Transkriptionsfaktoren ist essentiell für die normale Herzentwicklung und die Aufrechterhaltung der zellulären und funktionellen Integrität adulter Kardiomyozyten. Die entwicklungsabhängigen Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren *Gata4*, *Gata5* und *Gata6* im Herzen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Während *Gata4* und *Gata6* bei der Entwicklung des Herzens ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen und auch im adulten Myo- und Endokard exprimiert werden, ist die Expression von *Gata5* ab E12.5 auf das atriale Endokard beschränkt und kann im Verlauf der Entwicklung nicht mehr nachgewiesen werden. Eine homozygote Deletion von *Gata5* (*Gata5*^{-/-}) ist im Gegensatz zu Mausmutanten mit homozygoten Deletionen anderer Gata-Transkriptionsfaktoren nicht letal.¹⁶⁴ Mausmutanten mit homozygoter *Gata4* oder *Gata6* Deletion (*Gata4*^{-/-} beziehungsweise *Gata6*^{-/-}) versterben aufgrund schwerer Fehlbildungen, welche unter anderem durch eine gestörte Differenzierung kardiovaskulärer Strukturen in frühen Embryonalstadien bedingt sind.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Im Vergleich zu *Gata5* und

Gata6 ist Gata4 der dominierende Transkriptionsfaktor in Kardiomyozyten aller Entwicklungsstadien.¹⁶⁸

Tabelle 3. Expression von Gata4, Gata5 und Gata6 während der Herzentwicklung bei der Maus

Transkriptionsfaktor	Nachweismethode	Expression
Gata4 ^{2, 169, 170}	<i>In-situ</i> Hybridisierung, Immunhistochemie	E7.0-7.5: in zoelomischen Epithelzellen
		E8.0: im Endo- und Myokard sowie im präkardialen Mesoderm während der Bildung des Herzschlauchs
		E9.0: während der Septierung in den Vorhöfen und Ventrikeln sowie dem <i>Septum transversum</i>
		In späten fetalen Entwicklungsstadien, postnatal, adult: im Epi-, Myo- und Endokard
Gata5 ¹⁶³	<i>In-situ</i> Hybridisierung	E7.0: im präkardialen Mesoderm
		E9.5: in den Vorhöfen und Ventrikeln
		E12.5: im atrialen Endokard
		In späten fetalen Entwicklungsstadien, postnatal, adult: keine Expression
Gata6 ^{162, 171-174}	<i>In-situ</i> Hybridisierung, Northern Blot, RNase <i>protection analysis</i> , Immunhistochemie	E7.0: embryonales Mesoderm (<i>primitive streak</i>)
		E9.5: während der Septierung in den Vorhöfen und in Ventrikeln sowie dem <i>Septum transversum</i>
		In späten fetalen Entwicklungsstadien, postnatal, adult: im Myo- und Endokard

Hinweise für die funktionelle Relevanz von Gata4 während der Herzentwicklung lieferten *in vitro* Studien mit der pluripotenten, embryonalen Karzinomzelllinie P19, in welcher DMSO (Dimethylsulfoxid) die kardiale Differenzierung induziert. Durch einen *Gata4 knockdown* konnte in DMSO-behandelten Zellen keine terminale Differenzierung erreicht werden. Die präkardialen Zellen wurden apoptotisch, während eine *Gata4* Überexpression zu einer signifikant erhöhten Anzahl ausdifferenzierter, kontrahierender Kardiomyozyten führte.^{175, 176} Ferner belegen zahlreiche *in vivo* Studien die Bedeutung von *Gata4* für die Herzentwicklung.^{165, 166, 170, 177-182} Transgene Mäuse mit einer homozygoten Deletion des *Gata4* Gens (*Gata4*^{-/-}) weisen schwerwiegende Fehlbildungen auf und sterben

in utero zwischen den Entwicklungsstadien E7.0 und E10.5.^{165, 166} Deren Phänotyp einer *cardia bifida* resultiert aus der fehlenden Fusion der bilateral angelegten Endokardschläuche. Obwohl in *Gata4*^{-/-} Embryonen mittels *in situ* Hybridisierung kardiale Markergene wie *α-MHC*, *MLC1A* (*myosin light chain*) und *ANP* (*atrial natriuretic peptide*) nachgewiesen werden können, bleibt eine Kontraktion der Zellen aus.¹⁶⁶ Die Embryonen der transgenen Mäuse zeigen jedoch eine gesteigerte *Gata6* Expression, weshalb diskutiert wurde, dass *Gata6* den Ausfall von *Gata4* zumindest teilweise kompensieren kann.¹⁶⁸

Um die Letalität in frühen Embryonalstadien von *Gata4*^{-/-} Mäusen zu umgehen, wurden mittels *Cre-Lox* Rekombination konditionelle *Gata4 knockout* Mäuse generiert.¹⁸² *Gata4* wurde dabei entweder zu einem frühen Zeitpunkt (E9.5) durch eine *Nkx2.5* Promotor-induzierte *Cre*-Rekombinase (*G4*^{NK}), oder zu einem späteren Zeitpunkt (E11.5) durch eine *α-MHC* Promotor-induzierte *Cre*-Rekombinase (*G4*^{MC}) deletiert. *G4*^{NK} und *G4*^{MC} Mausmutanten waren in den Entwicklungsstadien E11.5 beziehungsweise E14.5 letal und zeigten eine gestörte Herzentwicklung. Während die frühe Deletion der *G4*^{NK} Mutante zu einer Verdünnung des Myokards und einer Hypoplasie des rechten Ventrikels führte, fiel in den Embryonen der *G4*^{MC} Linie neben einer verringerten Proliferation der Kardiomyozyten eine Fehlbildung des rechten Ventrikels auf. Zudem resultierte die späte Deletion des *Gata4* Gens in einem dünneren Myokard.

Um die Rolle von *Gata4* im adulten Herzen zu charakterisieren, wurden mittels *Cre-Lox* Rekombination zwei weitere konditionelle Mausmutanten entwickelt, die bis ins Erwachsenenalter überleben. Die *β-MHC* oder *α-MHC* Promotor-gesteuerten *Cre*-transgenen Tiere (*Gata4fl/fl*^{β-MHC-Cre} und *Gata4fl/fl*^{α-MHC-Cre}) weisen eine herzspezifische *Gata4* Depletion auf 5% beziehungsweise 30% des normalen *Gata4* Proteingehalts auf.¹⁸⁰ Interessanterweise zeigen die adulten *Gata4fl/fl*^{β-MHC-Cre} Mäuse, jedoch nicht die *Gata4fl/fl*^{α-MHC-Cre} Tiere, unter Normalbedingungen eine progressive Verschlechterung der Herzfunktion, welche zu einer dilatativen Kardiomyopathie führt. *Gata4* hat demzufolge einen dosisabhängigen Effekt. In beiden transgenen Linien ist eine kompensatorische Myokardhypertrophie nach erhöhter Druckbelastung des Herzmuskels deutlich eingeschränkt.

Beim Menschen sind *GATA4*-Haploinsuffizienzen oder *GATA4* Mutationen, welche eine gestörte Interaktion mit *GATA4*-Kofaktoren zur Folge haben, mit angeborenen Herzfehlern assoziiert (vor allem Fallot-Tetralogie, Vorhof- und Ventrikel-Septumdefekte).¹⁸³⁻¹⁸⁶

1.3.3. Proteinstruktur und Regulation von Gata4

Das murine Gata4 Protein ist 440 Aminosäuren lang. Abbildung 7 zeigt ein Schema der Proteinstruktur.

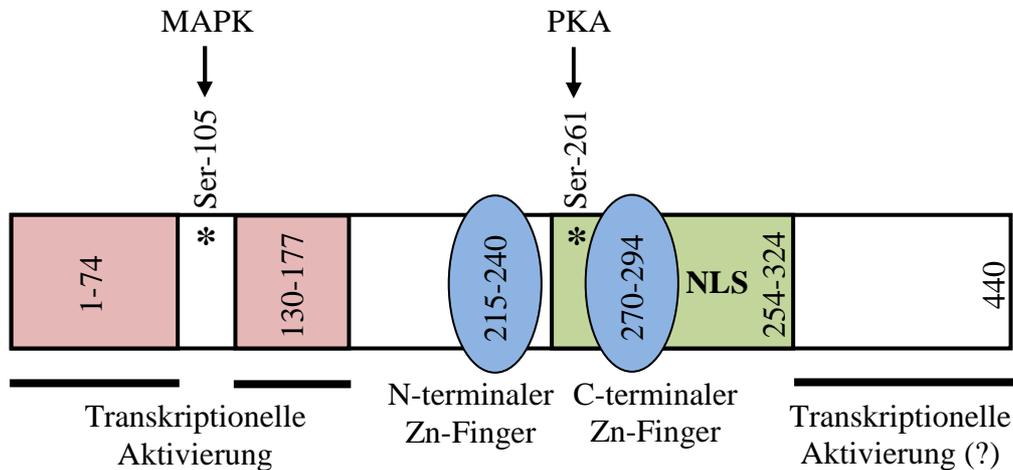


Abbildung 7. Schema der Proteinstruktur des murinen Gata4. Transkriptionelle Aktivierungsdomänen sind rot, Zinkfinger (Zn)-Motive blau, und das Kernlokalisations-Signal (NLS, *nuclear localization sequence*) grün markiert. Nummern geben die Position der Aminosäuren wieder. Ser-105 und Ser-261 sind Phosphorylierungsstellen für MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) bzw. PKA (*protein kinase A*). Die Abbildung wurde nach Pikkarainen *et al.* modifiziert.²

Zentraler Bestandteil des Gata4 Proteins sind die zwei hochkonservierten Zinkfinger. Der N-terminale Zinkfinger ist selbst nicht in der Lage DNA zu binden, beeinflusst aber die Stabilität und Spezifität der DNA-Bindung.^{187, 188} Der C-terminale Zinkfinger bildet zusammen mit der angrenzenden stark basischen Region die DNA-Bindungsdomäne. Diese Domäne ist bei den drei nicht-hämatopoietischen Gata-Transkriptionsfaktoren zu 90% homolog.¹⁶⁸ Beide Zinkfinger interagieren mit Kofaktoren. In Deletionsanalysen wurden drei weitere Elemente identifiziert: zwei separate Aktivierungsdomänen im N-Terminus und in der C-terminalen basischen Region eine Sequenz, welche den Transport in den Nukleus vermittelt.¹⁸⁹ Die beiden N-terminalen Aktivierungsdomänen sind teilweise auch im Gata5 und Gata6 konserviert.^{162, 163, 190}

Die vielfältigen Aufgaben von Gata4 erfordern sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene ein komplexes regulatorisches Netzwerk. Einige Studien zeigen, dass Retinsäure (RA) die Expression von *Gata4* induziert.¹⁹⁰⁻¹⁹² Transgene Mäuse mit einer homozygoten Deletion des Retinsäure-Rezeptors *RXRα* (*RXRα*^{-/-}) weisen

im Vergleich zum Wildtyp im Myokard verringerte Gata4 Level auf.¹⁹³ Da die *Gata6*^{-/-} Mausmutanten ebenfalls verminderte Gata4 Level aufweisen, wirkt Gata6 offensichtlich als positiver Regulator des *Gata4* Gens.¹⁶⁷ Gata4 und Gata6 scheinen einer gegenseitigen Regulation zu unterliegen, denn auch Gata4 defiziente Mausmutanten zeigen eine erhöhte *Gata6* Expression im Myokard.^{165, 166, 168} Dieses Phänomen könnte durch GATA-Motive im Promotor des *Gata4* und *Gata6* Gens vermittelt werden.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶

Posttranslationale Modifizierungen von Gata4 erfolgen über Phosphorylierung, Acetylierung oder Sumoylierung, welche die DNA-Bindungsaktivität, das Potential zur Transaktivierung und die Lokalisation des Proteins in der Zelle beeinflussen. Phosphorylierung spielt in Kardiomyozyten eine wichtige Rolle. Faktoren, die eine Myokardhypertrophie induzieren, beispielsweise eine erhöhte Druckbelastung des Herzens, *isoproterenol* (ISO), *phenylephrine* (PE), Endothelin-1 (Et-1), Angiotensin II (AngII) und *hepatocyte growth factor* (HGF), triggern die Phosphorylierung des Gata4 Proteins.^{96, 197-202} Eine zentrale Phosphorylierungsstelle im murinen Gata4 ist die Aminosäure Serin 105 (Ser-105, Abbildung 7). Diese ist für die transkriptionelle Aktivierung essentiell. Obwohl sie nicht in der DNA-Bindungsdomäne liegt, führt eine Mutation zur Abnahme der DNA-Bindungsaktivität von Gata4.²⁰³ Es wird postuliert, dass die Phosphorylierung am Serinrest 105 zu einer größeren Stabilität des Proteins innerhalb der Zelle führt.²⁰⁴ Zu den Kinasen, welche die spezifische Ser-105 Phosphorylierung katalysieren, gehören ERK und p38 MAPK.^{203, 205, 206} Die GTPase RhoA wurde als Vermittler der Ser-105 Phosphorylierung identifiziert.²⁰⁵ Weiterhin können die Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β), welche über Akt negativ reguliert wird, und Gata4 miteinander interagieren. Wird Gata4 durch die GSK-3 β an der N-terminalen Domäne phosphoryliert, führt dies zu einer verminderten Expression von Gata4 Zielgenen, da Gata4 durch einen Exportin Crm1-vermittelten Transport aus dem Nukleus ins Zytoplasma gelangt.²⁰⁷ Der Serinrest 261 (Ser-261, Abbildung 7) wurde in gonadalen Zellen als Phosphorylierungstarget der Proteinkinase A (PKA) identifiziert, was zur Rekrutierung des transkriptionellen Koaktivators CBP (*CREB protein-binding protein*) führt.²⁰⁸ Als weitere posttranslationale Modifikation von Gata4 spielt Acetylierung eine wichtige Rolle. Die Acetylierung von Lysinresten wird von der Histonacetyltransferase p300 katalysiert, einem Interaktionspartner von Gata4, welcher mit Gata4 gemeinsame Zielgene synergistisch aktiviert.²⁰⁹ Weiterhin scheint die Acetylierung von Gata4 während hypertropher Wachstumsprozesse eine Rolle zu spielen, denn *phenylephrine* induziert in neonatalen Kardiomyozyten eine erhöhte *p300* Expression und die Acetylierung von Gata4.²⁰⁹ Auch transgene Mäuse mit einer herzspezifischen

ektopischen *p300* Expression entwickeln eine Myokard-Hypertrophie mit erhöhter Gata4 Acetylierung und DNA-Bindungsaktivität.²¹⁰ Im murinen Gata4 wurden 4 Lysinreste zwischen den Aminosäuren 311 und 322 als p300 Acetylierungstargets identifiziert.²¹¹ Ferner wird die Aktivität von Gata4 durch Sumoylierung verstärkt. Dabei wird der Lysinrest 366 durch SUMO-1 (*small ubiquitin-like modifier-1*) modifiziert.²¹²

1.3.4. Kardiale Gata4 Zielgene

Die funktionelle Relevanz von Gata4 während der Embryonalentwicklung spiegelt sich auch in den Zielgenen wider. Die Gene vieler Transkriptionsfaktoren, welche entwicklungsabhängige Expressionsmuster regulieren, sind durch GATA-Motive in ihren Promotoren gekennzeichnet. Der Promotor von *Nkx2.5* zum Beispiel, ein herzspezifischer Transkriptionsfaktor, der während der frühen Embryogenese kardiale Vorläuferzellen spezifiziert, enthält zwei funktionelle GATA-Elemente.^{213, 214} Auch im Promotor von *dHand* (*heart- and neural crest derivatives-expressed protein*) befinden sich zwei GATA-Boxen. Der Transkriptionsfaktor dHand ist für die Entwicklung des rechten Ventrikels essentiell.²¹⁵ Gata4 reguliert auch Gene für sarkomere Proteine wie zum Beispiel α -MHC, kardiales Troponin C und I sowie die *MLC3* (*myosin light chain 3*).²¹⁶⁻²²¹ Darüber hinaus werden auch Gene für *ANP*, *BNP* (*B-type natriuretic peptide*) und *Corin*, ein Enzym, welches natriuretische Peptide prozessiert, durch Gata4 aktiviert.²²²⁻²²⁶ Weitere kardiale Gata4 Zielgene sind die Gene für $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher und für den Acetylcholin-Rezeptor M2.²²⁷⁻²²⁹

Das Spektrum der Zielgene belegt die weitläufigen Funktionen von Gata4 in ausdifferenzierten adulten Kardiomyozyten. Durch die positive Regulation von *bcl-2* und *bcl-x(L)* via Gata4 werden zudem antiapoptotische Prozesse reguliert.^{92, 94}

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Zahlreiche *in vitro* und tierexperimentelle *in vivo* Studien belegen, dass der EpoR für eine kardioprotektive Wirkung von rekombinantem Epo (rEpo) essentiell ist. Transkriptionelle Mechanismen der *EpoR* Regulation im Herzen sind bisher nicht bekannt, aufgrund der kardioprotektiven Effekte von ESA (*Erythropoiesis Stimulating Agents*) jedoch von großem klinischem Interesse.

Ziel der Arbeit ist es deshalb, die spezifischen molekularen Mechanismen der transkriptionellen Aktivierung des *EpoR* Promotors in Kardiomyozyten zu identifizieren. Des Weiteren soll die *EpoR* Expression im medikamentösen Schädigungsmodell der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie sowie unter hypoxischen Bedingungen analysiert werden.

2. Material

2.1. Material und Hersteller

2.1.1. Chemikalien

Nicht aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden über folgende Firmen bezogen: Becton Dickinson, Sigma, Invitrogen, J.T. Baker, Serva, Merck oder Roth. Spezielle Chemikalien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4. Chemikalien

Produkt	Hersteller
5-Aza-2-Deoxycytidin	Sigma
BSA (<i>bovine serum albumin</i> , 10 mg/ml)	New England Biolabs
Complete und Complete Mini Protease-Inhibitoren-Cocktail (Tabletten)	Roche Diagnostics
Distilled Water DNase, RNase Free	Invitrogen
dNTP Set (100 mM)	Invitrogen
Doxorubicin-Hydrochlorid	Calbiochem
ECL Detection Reagents	Pierce
<i>Herring Sperm</i> DNA (10 mg/ml)	Promega
K7174 (Gata-Inhibitor)	Kowa, Tokyo, Japan
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen
L-Mimosin	Sigma
Oligo(dT)15 Primer (0,5 µg/µl)	Promega
P ³² γATP	MP Biomedicals
Poly[d(I-C)]	Roche
Protein Assay Reagent	Bio-Rad Laboratories
RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	Promega

2.1.2. Enzyme

Tabelle 5. Enzyme

Enzym	Hersteller
CIAP (1 U/ μ l)	Invitrogen
Expand Long Template Polymerase Mix	Roche
GoTaq TM DNA Polymerase (5 U/ μ l)	Promega
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Invitrogen
RNaseA (100 mg/ml)	Qiagen
Restriktionsenzyme (BglII, KpnI, SalI)	New England Biolabs
T4 DNA Ligase (1 U/ μ l)	New England Biolabs
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μ l)	New England Biolabs
ZymoTaq TM PreMix	Zymo Research

2.1.3. Puffer und Lösungen

Tabelle 6. Enzypuffer

Produkt	Hersteller
10x DNA Ligase Buffer	New England Biolabs
5x First Strand Buffer	Invitrogen
5x Green GoTaq TM Buffer	Promega
10x Pol-Mix Buffer 1,2,3	Roche
10x NEBuffer 1 - 4	New England Biolabs
10x T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer	New England Biolabs

Tabelle 7. Zusammensetzung von Standardpuffern

Puffer	Zusammensetzung
1x Ladepuffer (DNA)	0.002% w/v Bromphenol Blue-Xylene Cyanole; 5% v/v Glycerin
1x PBS	137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1.2 K ₂ HPO ₄ ; pH 7.3
1x TAE	40 mM Tris; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 8.0
1x TBE	89 mM Tris pH 8.3; 2.5 mM EDTA; 89 mM Borsäure
1x TBS	30 mM TrisHCl pH 7.6; 150 mM NaCl
TBST	1x TBS; 0.1 % v/v Tween [®] 20
TE-Puffer	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7.4 oder 8.0

2.1.4. Kommerzielle Assay-Systeme und Kits

Tabelle 8. Kommerzielle Assay-Systeme und Kits

Produkt	Hersteller
Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay	Upstate
DNeasy [®] Blood & Tissue Kit	Qiagen
Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System	Promega
EpiTect [®] Bisulfite Kit	Qiagen
Luciferase Assay System	Promega
QIAprep [®] Spin Midiprep Kit	Qiagen
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen
Silencer [®] siRNA Construction Kit	Ambion
QuikChange [®] XL Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems

2.1.5. DNA- und Protein-Marker

Tabelle 9. DNA- und Protein-Marker

Produkt	Hersteller
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
Precision Plus Protein Standards Dual Color	Bio-Rad Laboratories

2.1.6. Oligonukleotide

Alle Primer und Oligonukleotide mit Ausnahme der Real-time PCR Primer wurden entweder von der Firma TIBMolBiol (www.tib-molbiol.de) oder MWG (www.eurofinsdna.com) synthetisiert.

2.1.6.1. PCR Primer

Tabelle 10. Primer für Amplifikation revers transkribierter mRNA mit Annealing-Temperatur und Produktgröße.

Gen	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')	Annealing- Temperatur	Produkt- länge
<i>α-MHC</i>	aagtcagagaaggaacgcctaga	ttagctggaagatcacccgg	60 °C	783 bp
<i>β-Aktin</i>	actgctctggctcctagcac	acatctgctggaaggtggac	60 °C	115 bp
<i>EpoR</i>	agcccgcgtcactactgacc	gtcctgggcatgctcactgc	62 °C	386 bp
<i>Epo</i>	gtacatcttagaggccaagg	caggccttgccaaacttcta	60 °C	160 bp
<i>Fog2</i>	gcaagctcagacacagage	ccagctcggacatcttcgc	60 °C	276 bp
<i>Gata1</i>	gagtccagacctcctgacgc	cagtggagtagccgttgctc	60 °C	220 bp
<i>Gata4</i>	gatgggacgggacactacctg	acctgctggcgtcttagatt	60 °C	288 bp
<i>Gata5</i>	gccaccactttgaaggcaga	tcatggacgaggaggtgaag	60 °C	160 bp
<i>Gata6</i>	gcacgctttccctactcgc	cgagtaggtcgggtgatgg	60 °C	222 bp
<i>Sp1</i>	ggatgaagtgcagctgtgg	gaagagatgatctgccagcc	60 °C	318 bp
<i>Vegf</i>	ggagactcttcgaggagcactt	ggcgatttagcagcagatataagaa	60 °C	132 bp
<i>Wt1</i>	agagccagcctaccatccgc	ggctgcctgtgcaactgtca	60 °C	221 bp

2.1.6.2. TaqMan[®] Gene Expression Assays und Real-time PCR Oligonukleotide

Tabelle 11. Murine TaqMan[®] Gene Expression Assays von Applied Biosystems

Gen	Assay ID
<i>β-Aktin</i>	4352933E
<i>Erythropoietin receptor</i>	Mm00833882_m1
<i>GATA binding protein 4</i>	Mm00484689_m1

Tabelle 12. Murine *Epo* Real-time Primer und Sonde.

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')
mEpo FW	gtactgggagctcagaaggaattg
mEpo RV	cagacctctcccgtgtacagc
mEpo Sonde	6FAM-cgcctccagataccacccacct

2.1.6.3. ChIP-Primer

Tabelle 13. Primer für den ChIP-Assay mit Annealing-Temperatur und Produktgröße.

Promotor	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')	Annealing- Temperatur	Produkt- länge
<i>EpoR</i>	tgaccacattagcaaagcca	ccctgagttgtccatgatg	60 °C	329 bp
<i>Gapdh</i>	tcctccctgtccagagacgg	tggaactcaccggtcacacc	60 °C	351 bp

2.1.6.4. Oligonukleotide zur Herstellung der Reporterengenkonstrukte

Tabelle 14. Primer zur Klonierung der pGL-Reporterengenkonstrukte für die 5'-flankierende Region oder des ersten Introns des murinen *EpoR* Gens aus genomischer DNA bzw. aus bereits vorliegenden Konstrukten. Die artifiziell eingebrachten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Primer	Sequenz (5' - 3')	Schnittstelle
mEpoRpro RV1	cc <u>ggt</u> acc ^{ccc} ac ^c ctctccttcccttctcttcc	KpnI
mEpoRpro RV2	cc <u>gtc</u> gac ^{ccc} ac ^c ctctccttcccttctcttcc	Sall
mEpoRpro FW	gg <u>gtc</u> gac ^{gt} gctaggatttaaactctggtcctc	Sall
Δ1 mEpoRpro FW	gc <u>ggt</u> ac ^c ctgagctatctctccagcccattttagc	KpnI
Δ2 mEpoRpro FW	gc <u>ggt</u> ac ^c ctgatgtcagcttgggatacactgtctcc	KpnI
Δ3 mEpoRpro FW	gc <u>ggt</u> ac ^c agcaggctggattcacagatgcccggac	KpnI
Δ4 mEpoRpro FW	gc <u>ggt</u> ac ^c agcaggctggattcacagatgcccggac	KpnI
Δ5 mEpoRpro FW	at <u>ggt</u> ac ^{ccc} agcctgcaagctgccccgcccctg	KpnI
Δ6 mEpoRpro FW	gc <u>ggt</u> ac ^c agaagctcctggtcagctgtgtccggca	KpnI
mEpoR-Intron1 FW	gc <u>ggt</u> ac ^c gtaagaactgtacatgggcaatgctgtg	KpnI
mEpoR-Intron1 RV	gc <u>gat</u> ctctagaaaagggatagccatggcggggg	BglII

2.1.6.5. Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese

Tabelle 15. Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese der pGL-Reporterengenkonstrukte. Die mutierten Nukleotide sind hervorgehoben.

Mutation	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')
mutGATA (-53/-50)	gtggctgtagcttaactgtccccagcctg	caggctggggacag ^{tt} aagctacagccac
mutGC-Box (-29/-20)	ctgcaagctggcct ^{ttt} ccccctggaagga	tcctccagggg ^{aaa} aggccagcttgcag
mutCACCC (-124/-116)	tgctgtctgccctactcctacactggtt	aaccagttaggg ^{agt} agggcagacagca
mutCACCC (-151/-146)	attagcaaagctactcgaacaaaactct	agagttttgttc ^g agt ^g acttttcta
mutCACCC (-340/-336)	ttccactcacata ^t ctcagttgctagttgt	acaactagcaact ^g agt ^t atgtgagtgga

mutNkx2.5 (-4/+2)	gaaggagctgccacc cc agaagctcctggt	accaggagcttct gggt ggcagctcctc
mutNkx2.5 (-178/-173)	acaacataagtcac ggg tccctgaccaca	tgtggtcacgg acc ctgacttatgttgt
mutE-Box (-379/-374)	aaacaccatag tg cgtatctgtcagcta	tagcgtgacagata cg cactatggtgtt
mutYY (-162/-160)	cttgctcgtgaccat att agcaagccac	gtggcttgcta aat atggtcacggacaag
mutYY (-185/-183)	agacgggtgaaaca at ataagtcactgtc	gacaagtgacttat att gtttcaccgtct
mutYY (-400/-398;-384/-382)	taatt tg taaacagaaa act ctagaac	gttctag agt gttttctgtttaca aat
mutETS (+874/+876)	gcttgctaggag gtc gacgggggaggggga	tccccgcccc gtc gacctcctagcaagc
mutGC-Box (+883/+889)	ggaggaggaaggg gtt gggggacacggttg	caaccgtgtcccc aa ccccttctctctcc
mutHRE (+893/+896)	gggggaggggg act ttgttggcgctatcgg	ccgatagcgcca aa agccccgcccc
mutGATA (+905/+908)	cacggttggcgct ccc gggggacagccggg	cccggctgtcccc ggg agcgccaaccgtg
mutGATA (+937/+940)	gcctgcgggaacc ggg aggaggccgagttc	gaactcggcctct ccc ggtcccgcaggc

2.1.6.6. Oligonukleotide zur Herstellung von siRNA Duplexen

Tabelle 16. Oligonukleotide zur Herstellung der siRNA Duplexe mit Hilfe des Silencer[®] siRNA Construction Kits. Die Sequenz der siRNA Duplexe ist hervorgehoben, die komplementäre Sequenz des T7 Primers ist unterstrichen.

siRNA	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')
siScram	Aat gtccgttcggttggcagac <u>ctgtctc</u>	aat ctgccaaccgaacggacac <u>ctgtctc</u>
siGata4	Aaggagggg attcaaac <u>cagacctgtctc</u>	aat ctggttgaatccctccc <u>ctgtctc</u>

2.1.6.7. Oligonukleotide zur Amplifikation von Bisulfit-konvertierter DNA

Tabelle 17. Oligonukleotide zur Amplifikation Bisulfit-konvertierter DNA. Das Design der Primer erfolgte mit Hilfe der MethPrimer-Software (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>).

Primer	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')	Produktlänge
BS_mEpoPro	ttgtttttgttttaggtg	cctcttcctaatccttaaaaaatc	502 bp
BS_mEpo-3'	ttgtattggataatagagggttaagg	aaaaattcccaaaataatacccatc	582 bp

2.1.7. Vektoren

Tabelle 18. Expressions- und Reportergenvektoren

Vektor	Charakteristika
pcDNA3.1(+)	Expressionsvektor, CMV-Promotor, Neomycin- und Ampicillin-Resistenz, 5428 bp, Invitrogen
pcDNA3.1(+), mGata4	mGata4 Expressionsvektor, NM_008092, bp 608-1933 in EcoRI kloniert
pcDNA3.1(+), mSp1	mSp1 Expressionsvektor, NM_013672, bp 101-2446 in XhoI/EcoRI kloniert
pCMVTag3B/Gata6	mGata6 Expressionsvektor, CMV-Promotor, c-myc Tag, Kanamycin-Resistenz, zur Verfügung gestellt von Edward E. Morrisey ²³⁰
pBS/U6-shScram	Expressionsvektor für scrambled <i>short hairpin</i> RNA, pBluescript-Derivat mit U6-Promotor, Ampicillin-Resistenz, zur Verfügung gestellt von Grace Gill ²³¹
pBS/U6-shSp1-2	Expressionsvektor für murine Sp1 <i>short hairpin</i> RNA, pBluescript-Derivat mit U6-Promotor, Ampicillin-Resistenz, zur Verfügung gestellt von Grace Gill ²³¹
pGL2 <i>basic</i>	Promotorloser <i>firefly</i> Luziferasevektor für Promotorstudien, Ampicillin-Resistenz, 5598 bp
pGL3 <i>promoter</i>	<i>Firefly</i> Luziferasevektor mit SV-40 Promotor für Enhancerstudien, Ampicillin-Resistenz, 5010 bp
phRL-TK	Vektor mit synthetischer <i>Renilla</i> Luziferase (hRluc), HSVTK-Promotor, Ampicillin-Resistenz, 4045 bp

2.1.8. Antikörper

Tabelle 19. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-acetyl-Histone H3 rabbit polyclonal IgG (1 µg/µl)	Upstate
β-Actin AC-15 mouse monoclonal IgG	Sigma
β-Tubulin (B-7) sc-5286 mouse monoclonal (0.2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
FOG-2 (M-247) sc-10755 rabbit polyclonal IgG (0.2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
GATA-3 (HG3-31) sc-268x mouse monoclonal (0.2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
GATA-4 (C-20) sc- 1237x goat polyclonal IgG (2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
GATA-4 (H-112) sc- 9053 rabbit polyclonal IgG (0.2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
GATA-4 p[S105] rabbit polyclonal IgG	Biosource
GATA-6 (C20) sc-7244 goat polyclonal IgG (0.2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
goat anti-mouse IgG HRP sc-2005 (0.4 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
goat anti-rabbit IgG HRP sc-2004 (0.4 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
HIF1α (C-Term) rabbit polyclonal IgG	Cayman Chemical
Nkx2.5 (A-16) sc-12514x goat polyclonal IgG (2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
p300 (C-20) sc-585x rabbit polyclonal IgG (2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
rabbit-anti-goat IgG HRP sc-2768 (0.4 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
RNA-Pol II (N-20) sc-899 rabbit polyclonal IgG (0.2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
Smad3 (FL-425) sc-8332x rabbit polyclonal IgG (2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
Sp1 (PEP2) sc-59 rabbit polyclonal IgG (0.2 bzw. 2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
Stat5A (H-134) sc-28685x rabbit polyclonal IgG (2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
USF1 (C-20) sc-229 rabbit polyclonal IgG (0.2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
USF2 (C-20) sc-862 rabbit polyclonal IgG (0.2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology
YY1 (C-20) sc-281 rabbit polyclonal IgG (0.2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology

2.1.9. Computerprogramme

Tabelle 20. Computerprogramme

Programm	Hersteller
Chromas 1.45	Technelysium
iCycler IQ 3.1.7050	Bio-Rad Laboratories
Quantity One 4.5.2	Bio-Rad Laboratories
TRANSFAC [®] Professional 6.1 acad.	Biobase

2.1.10. Geräte

Tabelle 21. Geräte und sonstige Materialien

Gerät/Material	Hersteller
Brutschrank B6	Heraeus
CO ₂ -Inkubator CB210 mit N ₂ /O ₂ -Regulierung	Binder
Gel Casting System 20 x 20 cm	Fisher Scientific
Gene Flash	Syngene Bio Imaging
Gyro-Rocker [®] STR9	Stuart Scientific
Hoefer [™] Stab Gel Dryer GD2000	Amersham Biosciences
Kaltlichtquelle 2500LCD	Leica
Lumat LB9501	Berthold
Magnetrührer TMC 2072	Schott
Mini-PROTEAN Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories
PerfectBlue Semi-Dry Elektrobplotter	PeqLab Biotechnologie GmbH
PowerPac 200 und 3000	Bio-Rad Laboratories
Schüttelinkubator 3033	GFL
SmartSpec [™] 3000	Bio-Rad Laboratories
Sonifier 150	Branson Ultrasonics
Stereomikroskop MZSL3	Leica

Thermocycler T3000	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
UV-Transilluminator FT-28/254 312	Fisher Scientific
Vertical Electrophoresis System 20 x 20 cm	Fisher Scientific
Video Graphic Printer UP-890CE	Sony
Zentrifugen 5415D, 5417R und 5810R	Eppendorf

2.1.11. Sonstige Materialien

Tabelle 22. Sonstige Materialien

Produkt	Hersteller
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare
Autoradiography Cassette	Fisher Scientific
Blotting Paper, 46 x 57 cm, 237 Grade	BioWORLD
Chromatography Paper 20 x 20 cm, 3 mm Chr	Whatman International
Intensifying Screen	Fisher Scientific
Kodak BioMax MS Film	Kodak
MicroSpin™ G-25 Columns	Amersham Biosciences
Protran® Nitrocellulose Membran 0.2 µm	Whatman International

2.2 Bakterien, Zelllinien, Tiere

2.2.1. Bakterien

Zur Klonierung von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente TOP10 *E.coli* (ursprünglich One Shot® TOP10 von Invitrogen) mit folgendem Genotyp verwendet: F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*.

Tabelle 23. Nährmedien für *E.coli*

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	Für 1 Liter: 10 g Trypton; 5 g Hefextrakt; 5 g NaCl
LB-Agar	1 Liter LB-Medium, 15 g Agar
SOC-Medium	2% w/v Trypton; 0.5% w/v Hefextrakt; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose

2.2.2. Zelllinien

Für alle *in vitro* Studien wurden murine HL-1 Kardiomyozyten verwendet. Diese Zelllinie wurde von William Claycomb etabliert und zur Verfügung gestellt.²³²

Tabelle 24. Nährmedien und Substrat-Lösungen für HL-1 Zellen

Produkt	Hersteller
D-MEM + 4500 mg/l Glukose + L-Glutamin-Pyruvat	Invitogen
FBS Superior	Biochrom
Fibronectinlösung (0.1%, von bovinem Plasma)	Sigma
Gelatine	Merck
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom
(+)-Natrium L-Ascorbat	Sigma
(±)-Norepinephrine(+)-Bitartrat	Sigma
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom
TNS Trypsin Inhibitor (0.05%; 0.1% BSA)	PromoCell
Trypsin/EDTA	Cambrex

2.2.3. Tiere

C75BL/6 Mäuse und CD1 Swiss Webster Mäuse wurden von der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité, Universitätsmedizin Berlin bezogen. Das Studienprotokoll für die Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin genehmigt (IRB Protokoll Nr. G0224/06). Die Tötung der CD1 Swiss Webster Mäuse wurde beim LAGeSo zur Anzeige gebracht.

3. Methoden

3.1. Zellkulturtechniken

3.1.1. Kultivierung von myokardialen HL-1 Zellen

HL-1 Zellen wurden in Claycomb Medium bei 37 °C und einer Begasung von 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Um ein adhärentes Wachstum zu gewährleisten, wurden die HL-1 Zellen in Kulturflaschen, welche über Nacht mit 6 ml/T75 Fibronectin beschichtet wurden, kultiviert. Für das Passagieren der Zellen wurden diese zunächst mit vorgewärmten (37 °C) 1x PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA inkubiert. Nach dem tryptischen Verdau wurde die Reaktion durch Zugabe von TNS inhibiert, und die Zellen wurden in vorgewärmtem Waschmedium aufgenommen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 500 x g und Raumtemperatur wurde das Zellpellet in Claycomb Medium aufgenommen und in neue, mit Fibronectin beschichtete Kulturflaschen aufgeteilt.

Claycomb Medium:	10% FBS 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin 0.1 mM Adrenalin
Waschmedium:	5% FBS 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
Fibronectin:	2.5 µg/ml Fibronectin in 0.02% Gelatine

3.1.2. Einfrieren und Auftauen von HL-1 Zellen

Zum Einfrieren wurden die HL-1 Zellen analog zum Passagieren trypsiniert, in Waschmedium aufgenommen, zentrifugiert (500 x g; 5 min; RT) und in fetalem Kälberserum mit 5% DMSO bei -80 °C in einem Isopropanol-Bad eingefroren (Absenkung der Temperatur von 1 °C/min). Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Die gefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Waschmedium überführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, um das DMSO schnellstmöglich zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet in Claycomb Medium resuspendiert und die Zellen in eine Fibronectin-beschichtete Kulturflasche überführt.

3.1.3. Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in HL-1 Zellen

4 – 6 x 10⁵ HL-1 Zellen wurden pro 6-Well ausgesät. 24 h später wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 60% mit dem jeweiligen Plasmid mittels LipofectaminTM2000 (Invitrogen) in einem Verhältnis von 1:2 DNA:Lipofectamin in Penicillin/Streptomycin-freiem Medium transfiziert. 6 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt. 24 h, 48 h oder 72 h später wurden die Zellen geerntet.

3.1.4. Transfektion von siRNA Duplexen in HL-1 Zellen

2 x 10⁵ HL-1 Zellen wurden pro 12-Well ausgesät. 4 Stunden später wurde 0.9 µg/well (63 nM) der jeweiligen siRNA mittels LipofectaminTM2000 (Invitrogen) in einem Verhältnis von 1:6.4 siRNA:Lipofectamin in Penicillin/Streptomycin-freiem Medium transfiziert. 24 h später wurde das Medium gewechselt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet um RNA oder Protein aufzureinigen.

3.2. Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.2.1. RNA-Techniken

3.2.1.1. Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

Die RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen wurde mittels TRIzol[®] Extraktion nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm, wobei OD₂₆₀ = 1.0 einer Konzentration von 40 µg/ml entsprach. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert. RNA aus Geweben wurde ebenfalls mit Hilfe von TRIzol[®] extrahiert, wobei die Gewebeprobe zuvor mit einem Skalpell und anschließend mit einer Spritzenkanüle (21G) homogenisiert wurde.

3.2.1.2. Reverse Transkription

2 µg RNA wurden mit 1 µl Oligo(dT)₁₅ Primer und 1 µl 10 mM dNTPs für 5 min bei 65 °C in einem Thermomixer denaturiert und für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe eines Mixes aus 4 µl 5x *First-Strand Buffer*, 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl 40 U/µl RNasin sowie 0.5 µl

200 U/μl M-MLV-Reverse Transkriptase wurde die Probe für 50 min bei 37 °C und für 15 min bei 70 °C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.1.3. Real-time PCR

Für die Quantifizierung der RNA wurde eine TaqMan Real-time PCR mit kommerziell erhältlichen Primern (TaqMan[®] Gene Expression Assays, Tabelle 11) und dem TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (20 μl-Ansatz, 40 Zyklen, je 20 sec 95 °C, 1 min 60 °C). Die RNA-Mengen des Zielgens wurden im Verhältnis zur Menge der mRNA des Referenzgens (*β-Aktin*) mittels Ct-Methode errechnet.

3.2.2. DNA-Techniken

3.2.2.1. Isolierung hochmolekularer DNA aus Zellen: *Quick-HMW-DNA*

Konfluent gewachsene Zellen einer 6-Well Platte wurden mit PBS gewaschen und mit 0.5 ml der Proteinase K-Lösung versetzt. Nach Überführen der Lösung in 1.5 ml Reaktionsgefäße folgte eine Inkubation über Nacht bei 55 °C. Anschließend wurde die DNA durch die Zugabe von 1 ml 100% Ethanol mit 75 mM Natriumacetat ohne Schütteln 2-3 h bei RT präzipitiert. Durch vorsichtiges Schwenken und einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1800 rpm wurde die DNA pelletiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend zweimal mit 1 ml 70% Ethanol für 30 min gewaschen, zentrifugiert und nach Trocknung (10 min, RT) in 20-30 μl TE aufgenommen. Zum vollständigen Resuspendieren der DNA wurde das Gemisch für etwa 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die erhaltene HMW-DNA konnte direkt für die PCR eingesetzt werden.

Modified Bradleys: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
2 mM EDTA
10 mM NaCl
0.5% SDS
1 mg/ml Proteinase K

3.2.2.2. Isolierung hochmolekularer DNA aus Geweben mittels DNeasy® Blood & Tissue Kit

Zur Isolation von DNA aus primären Geweben wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen) genutzt. Dafür wurden 20 g des entsprechenden Gewebes abgewogen und nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

3.2.2.3. Bisulfitkonvertierung genomischer DNA mittels EpiTect® Bisulfite Kit

Die Bisulfitsequenzierung ist eine Methode um Methylierungen an CpG-Motiven nachzuweisen. Dabei werden durch die Konvertierung der DNA mittels Bisulfit nur un-methylierte Cytosinreste zu Uracilresten umgewandelt. Anschließend wird der zu analysierende DNA-Bereich amplifiziert und das PCR-Produkt sequenziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden immer 2 µg DNA mittels des EpiTect® Bisulfite Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers konvertiert.

3.2.2.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus cDNA, HMW-DNA oder Bisulfit-konvertierter DNA

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine einfache, effiziente Methode zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Segments *in vitro* aus einem Gemisch unterschiedlichster DNA-Sequenzen (z.B. Plasmide, genomische DNA, cDNA). Die Reaktionsansätze für PCR-Reaktionen auf cDNA für Untersuchungen der Genexpression beziehungsweise HMW-DNA für Klonierungen setzten sich folgendermaßen zusammen:

cDNA-Template:	1-2 µl cDNA 0.5 µl Primer A [10 pmol/µl] 0.5 µl Primer B [10 pmol/µl] 0.5 µl dNTPs [10 mM] 5 µl GoTaq™ Puffer 0.2 µl GoTaq™ Polymerase ad 25 µl H ₂ O
HMW-Template:	1 µl HMW-DNA 1.5 µl Primer A [10 pmol/µl] 1.5 µl Primer B [10 pmol/µl] 2.5 µl 10x Puffer 1, 2 oder 3 (Roche Expand Long Template) 0.5 µl dNTPs [2.5 mM] 0.25 µl PolMix ad 25 µl H ₂ O

Bisulfit-DNA: 4-8 µl Bisulfit-konvertierte DNA
 1 µl Primer A [10 pmol/µl]
 1 µl Primer B [10 pmol/µl]
 12.5 µl ZymoTaq™ PreMix
 ad 25 µl H₂O

Die Proben wurden im T3000 Thermocycler (Biometra) mit spezifischen Primern amplifiziert. Dabei wurde das Template in einem initialen Schritt für mindestens 2 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden je nach Gen und Probe zwischen 17 und 40 Zyklen durchlaufen (45 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 1 min Annealing bei für die jeweiligen Primern optimierter Temperatur, Elongation bei 72 °C), gefolgt von einem abschließenden Elongationsschritt (10 min bei 72 °C). Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anhand eines Markers auf die korrekte Produktgröße überprüft.

3.2.2.5. Ortsgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)

Alle im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Mutationen in DNA-Motive wurden in einer PCR-Reaktion unter Verwendung von sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Tabelle 14) hergestellt. Das Design der Oligonukleotide und die Durchführung der ortsgerechten Mutagenese erfolgten mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Anleitung des Herstellers.

3.2.2.6. Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für ein 1%iges (w/v) Agarosegel wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgelöst. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 50 °C wurden 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben. Die PCR-Produkte enthielten durch den 5x GreenGoTaq™ Buffer bereits einen Ladepuffer, während andere DNA-Proben mit 10x Ladepuffer versetzt wurden. Der 1 kb Plus DNA Marker (Invitrogen) wurde als Größenmarker verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 10 V/cm für 0.5-1 h durchgeführt und die aufgetrennte DNA unter UV-Licht durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

3.2.2.7. *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)*

Der EMSA ist eine sensitive Methode zum *in vitro* Nachweis von Nukleinsäure-Protein Interaktionen. Das System basiert auf der Tatsache, dass Proteinbindung an DNA- oder RNA-Fragmente zu einer verminderten elektrophoretischen Mobilität dieser Fragmente in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel führt.

a) *Labeling der Sonden*

Um die benutzten Oligonukleotide nach dem Gellauf durch Autoradiographie sichtbar zu machen, wurden diese zunächst mit ^{32}P markiert.

Hierzu wurden 100 ng des Einzelstrang-Oligonukleotids mit 1 μl 10x Kinase-Puffer, 3 μl γ [^{32}P]dATP (30 μCi) und 1 μl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U) versetzt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 μl durchgeführt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch eine 5-minütige Erwärmung auf 65 °C gestoppt. Um doppelsträngige DNA herzustellen, wurden 400 ng des komplementären Oligonukleotids dazugegeben und der Ansatz mit H_2O auf 100 μl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 5 min bei 95 °C aufgeköcht, bevor er für einen Zeitraum von etwa 2-3 h im Thermoblock bis RT abgekühlt wurde. Anschließend wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide mit Hilfe von MicroSpinTM G-25 Säulen (Amersham Biosciences) gereinigt. Die Lagerung der radioaktiv-markierten Oligonukleotide erfolgte bei -20 °C.

b) *Herstellung der Kompetitoren*

Nicht markierte Wildtyp- beziehungsweise mutierte Kompetitoren wurden folgendermaßen hergestellt: 10 μl des Einzelstrang-Oligonukleotids [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] wurden mit 40 μl des komplementären Oligonukleotids [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] vermischt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend für 2-3 h bei Raumtemperatur hybridisiert. Die Kompetitoren wurden bei -20 °C aufbewahrt.

c) *Durchführung des EMSA*

Die eigentliche Bindungsreaktion setzte sich standardmäßig aus 5 μl Kernextraktproteinen, 5 μl 5x Bindungspuffer (50 mM HEPES, pH 8.0; 25 mM MgCl_2 ; 250 mM KCl; 10% Ficoll (w/v); 0.025% Bromphenolblau (w/v); 0.025% Xylencyanol (w/v)); 1 μg Poly[d(I-C)], 1 μl der markierten DNA-Sonde (*supershift*) zusammen. Bei Bedarf wurden der Reaktion Antikörper oder nicht-markierte Wildtyp- beziehungsweise mutierte Oligonukleotide in

200-fachem Überschuss dazugegeben. Der Gesamtreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25 μ l wurde stets für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Das Gel wurde vor dem Auftragen der Proben bei 50 V einem Vorlauf unterzogen. Der eigentliche Gellauf variierte je nach Sondenlänge und Prozentigkeit des Gels und betrug beispielsweise für 30 bp lange Sonden in einem 5%igem Gel etwa 4 h bei konstanten 140 V. Das Gel wurde danach auf 2 Lagen Whatmann-Filterpapier transferiert, mit Frischhaltefolie blasenfrei abgedeckt und für 1 h 15 min bei 80 °C auf einem Geltrockner getrocknet. Abschließend wurde das Gel in eine Expositionskassette überführt und über Nacht auf einem Röntgenfilm exponiert. Zur Intensivierung des Signals wurde das Gel gegebenenfalls auch mit einem *Intensifying Screen* (Fisher Scientific) bei -80 °C exponiert.

5% Polyacrylamidgel:	7.5 ml 40% Acrylamid 12 ml 5x TBE add. 60 ml H ₂ O + 600 μ l 10% APS + 60 μ l TEMED
Laufpuffer:	0.25x TBE

3.2.3. Klonierungstechniken

3.2.3.1. Präparativer Restriktionsverdau

Um die für eine Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen zu generieren, wurden 3 μ g einer Plasmid-DNA und das entsprechende, aus einem Agarosegel eluierte, PCR-Produkt mit 20 U des jeweiligen Restriktionsenzym unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel. Die Banden mit der korrekten Produktgröße wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert.

3.2.3.2. Aufreinigung der DNA via QIAquick[®] Gel Extraction und PCR Purification Kit

Die QIAquick[®] Gel Extraction und PCR Purification (Firma Qiagen) sind einfache und schnelle Methoden, um aus Agarosegelen DNA-Fragmente mit einer Größe von 0.1-10 kb zu isolieren beziehungsweise PCR-Fragmente aus PCR-Ansätzen zu reinigen. Die zu iso-

lierende DNA wurde aus einem Agarosegel ausgeschnitten oder der PCR-Ansatz wurde verdünnt und nach Herstellerangaben über eine Silica-Säule gereinigt.

3.2.3.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA-Enden

Um bei einer Ligation eine Religation des verwendeten Klonierungsvektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase (*calf intestine alkaline phosphatase*; CIAP) dephosphoryliert. Dabei wurde die bereits verdaute und isolierte Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 µl CIAP (1 U/µl) für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 µl EDTA (250 mM) und Erhitzen auf 65 °C für 15 min gestoppt.

3.2.3.4. Ligation

Für die Ligation überstehender, kompatibler Enden wurden in einem 10 µl Ansatz 0.1-0.2 pmol eines gegebenenfalls zuvor dephosphorylierten Vektors mit 0.2-0.4 pmol eines DNA-Fragments, 1 µl 10x Ligase-Puffer und 400-2000 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde anschließend für mindestens 1 h bei RT oder bei 16 °C über Nacht inkubiert.

3.2.3.5. Herstellung CaCl₂-kompetenter *E.coli* Bakterien und Transformation

Eine Übernachtskultur CaCl₂-kompetenter *E.coli* (TOP10) wurde in SOC-Medium (2 x 300 ml) bis zu einer Absorption von 600 nm (A_{600}) von 0.5 angezogen und durch Zentrifugation sedimentiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C). Die Zellpellets wurden anschließend in je 20 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation der Zellen (5000 rpm, 10 min, 4 °C) wurden diese in 3 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und für weitere 3 h auf Eis inkubiert. Die CaCl₂-kompetenten Bakterien wurden nach Zugabe von 15% (v/v) Glycerin in 50 µl-Portionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 2-10 µl Ligationsansatz zu 50 µl kompetenten Zellen gegeben. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Nach 45 sec Hitzeschock bei 42 °C wurden die Bakterien 3 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurde der Transformationsansatz für 45 min bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt.

Abschließend wurden die Zellen mit einem Drigalski-Spatel auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.3.6. Minipräparation und analytischer Restriktionsverdau

Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für alle *E.coli* Laborstämme. Vorteile liegen in der schnellen Durchführung und in der hohen Qualität der DNA, welche sequenzierfähig und transfizierbar ist (basiert auf der *Boiling Prep* nach Holmes und Quigley, 1981).

Eine 2 ml LB-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde für 6-18 h bei 37 °C geschüttelt. Nach dem Umfüllen in 2 ml Eppendorfgefäße wurde die Suspension für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden in 500 µl STET-Puffer aufgenommen, mit 50 µl LTE versetzt und gemischt. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei RT wurden die Proben für 90 sec in einem Thermomixer bei 95 °C erhitzt. Danach wurde 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und dann das zähflüssige Pellet mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt. Anschließend wurden 50 µl 8 M NH₄Acetat und 500 µl Isopropanol zum Überstand gegeben, gemischt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 30-50 µl TER aufgenommen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30 °C im Thermomixer konnte die Plasmid-DNA einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen werden. Dabei wurden 5 µl der Mini-Präparation mit geeigneten Restriktionsendonukleasen nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden anschließend mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels auf positive Klone analysiert.

STET-Puffer:	8% Sucrose 0.5% Triton X-100 50 mM EDTA 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
--------------	---

LTE:	10 mg Lysozym/1 ml TE
------	-----------------------

TER:	10 µg RNase A/1 ml TE
------	-----------------------

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle positiven Klone mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger bei der Firma GATC (www.gatc-biotech.com) sequenziert.

3.2.3.7. Präparative Plasmidisolierung mittels QIAprep[®] Plasmid Midi Kit

Für eine Maxipräparation der Plasmid-DNA wurden 100 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin) angeimpft und in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37 °C für 12 - 16 h inkubiert. Zur Reinigung der Plasmid-DNA wurde das QIAprep[®] Spin Midiprep Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

3.2.3.8. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit einem Photometer. Dabei wurden die Lichtabsorptionen bei 260 nm im Vergleich zum reinen Lösungsmittel gemessen, wobei eine optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) von 1.0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt; dieser Wert sollte bei 1.8 liegen.

3.2.3.9. Anlegen von Glyzerinstocks

Ein kurzfristiges Aufbewahren (bis zu 6 Wochen) von auf Agarplatten ausgestrichenen Bakterienkolonien erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C. Eine langfristige Lagerung ist als Stammkultur möglich. Hierzu wurde Einfriermedium im Verhältnis 1:1 mit einer Übernachtskultur gemischt und bei -80 °C gelagert.

Einfriermedium:	65 ml 99% Glycerin
	2.4 g $MgSO_4$
	2.5 ml 1 M Tris-HCl
	add. 100 ml H_2O
	pH 8.0

3.2.4. Proteinbiochemische Arbeitstechniken

3.2.4.1. Aufreinigung von Proteinen aus Zellen und Organen

Die Aufreinigung von Proteinen sowohl aus HL-1 Zellen als auch aus primärem Gewebe erfolgte mittels RIPA-Puffer. Für die Extraktion aus der Zellkultur wurden die Zellen zunächst mit kaltem 1x PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 100 µl RIPA/6-Well wurden die Zellen abgeschabt und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein abschließender Zentrifugationsschritt (10 min,

14000 rpm, 4 °C), um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Aufreinigung von Proteinen aus primären Geweben wurde dieses mit einem Skalpell zunächst zerkleinert und in 5x Volumen RIPA-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Ultraschallbehandlung, um die Zellverbände weiter aufzuschließen. Um die Proteine zu schonen, wurden die Proben dabei auf Eis gekühlt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand schockgefroren.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.4
 150 mM NaCl
 10 mM EDTA
 1% IGEPAL
 0.25% Na-Deoxycholat
 0.1% SDS
 Complete Protease Inhibitoren (Roche Diagnostics)
 1 mM PMSF

3.2.4.2. Herstellung von Kernextrakten aus HL-1 Zellen

1×10^7 Zellen wurden nach ihrer Ernte einmalig in 10 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 400 µl kaltem Puffer A resuspendiert und 10 min auf Eis einer hypotonischen Lyse unterzogen. Nach Vortexen für 10 sec bei *full speed* wurden die Nuclei für 3 min bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Für eine Hochsalzextraktion wurde das Pellet in 100 µl kaltem Puffer C durch mehrmaliges auf- und abpipettieren resuspendiert und 20-30 min auf Eis gestellt. Nach einer letzten Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C wurde der Überstand (Kernextrakt) zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80 °C gelagert.

Puffer A: 10 mM HEPES, pH 7.9
 1.5 mM MgCl₂
 10 mM KCl
 0.5 mM DTT
 0.2 mM PMSF
 inkl. Proteaseinhibitormix

Puffer C: 20 mM HEPES, pH 7.9
1.5 mM MgCl₂
0.2 mM EDTA
25% Glycerin
420 mM NaCl
0.5 mM DTT
0.2 mM PMSF
inkl. Proteaseinhibitormix

3.2.4.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationen der Ganzzellprotein-Extrakte wurden mit dem Protein Assay Reagent von Bio-Rad Laboratories nach der Bradford-Methode anhand des Protokolls des Herstellers ermittelt.

3.2.4.4. Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel. Das Natrium-Dodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine und führt durch seine stark negative Ladung dazu, dass die Proteine negativ geladen vorliegen.

Die Proteine wurden mit Probenpuffer (8x Probenpuffer: 0.25 M Tris-HCl pH 6.8; 8% SDS; 40% Glycerin; 20% β -Mercaptoethanol) versetzt und vor dem Auftragen für 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um höhere Strukturen aufzubrechen. Zelltrümmer und andere Aggregate wurden mittels Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min entfernt, bevor die Proben auf das Gel geladen wurden. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 30-40 mA in 1x Elektrophoresepuffer (3 g Tris/Base; 14.4 g Glycin; 1 g SDS auf 100 ml H₂O) durchgeführt. Als Marker für das Molekulargewicht wurde der Precision Plus Protein Standard Dual Color (Bio-Rad Laboratories) verwendet.

Standardrezeptur für zwei 10%ige Gele (8 cm x 6 cm):

Trenngel: 4 ml H₂O
2.5 ml Trenngelpuffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS)
3.3 ml Polyacrylamid (30%)
100 μ l 10% SDS
40 μ l 25% APS
10 μ l TEMED

Sammelgel: 2.25 ml H₂O
0.95 ml Sammelgelpuffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS)
0.45 ml Polyacrylamid (30%)
38 µl 10% SDS
15 µl 25% APS
8 µl TEMED

1x Laufpuffer: 25 mM Tris pH 8.6
192 mM Glycin;
0.1% w/v SDS

3.2.4.5. Reportergenanalysen

Um das Transaktivierungspotential von Promotoren zu charakterisieren, wurden im Verlauf dieser Studie Reportergenanalysen durchgeführt. Bei dieser Methode werden Plasmide, welche das Reportergen (Luziferasegen) unter der Kontrolle des zu studierenden Promotors enthalten, in geeignete Zellen transfiziert. Die anschließend gemessene Luziferaseaktivität ist direkt proportional mit der Aktivität des untersuchten Promotors.

Um die basalen Luziferaseaktivitäten der Reportergenkonstrukte zu messen, kam das Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) zum Einsatz. Dessen Prinzip beruht auf dem Einsatz einer weiteren Luziferase. Diese *Renilla* Luziferase, die auf dem Plasmid phRL-TK kodiert ist, wird konstitutiv exprimiert und dient der Normalisierung der Transfektionseffizienz des *firefly* Konstrukts. Für diesen Assay wurden HL-1 Zellen mit 4 µg des Reportergenkonstrukts und 20 ng phRL-TK transient kotransfiziert und 24 h später geerntet. Dazu wurden die Zellen mit kaltem 1x PBS gewaschen, mit 200 µl *passive lysis buffer* (PLB) abgeschabt und in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Lysate 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Überstände in neue 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Messung am Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold) wurde folgendermaßen durchgeführt: In einem Luminometerröhrchen wurden 100 µl Substratlösung vorgelegt, und nach Zugabe von 20 µl des Zelllysats wurden die *relative light units* (RLU) der *firefly* Luziferase für 10 sec gemessen. Nach der RLU-Messung wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl *stop and glow buffer* (SGB) gestoppt. Die Aktivität der *Renilla* Luziferase wurde anschließend über 10 sec gemessen. Nach der RLU-Messung erfolgte eine Proteinkonzentration nach Bradford.

3.2.5. Immunologische Arbeitstechniken

3.2.5.1. Western Blot

Das Prinzip des *Western Blots* besteht darin, die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf einer Membran (zum Beispiel Nitrocellulose) zu immobilisieren, um Proteine für Antikörper zugänglich zu machen und das entsprechende Antigen sensitiv nachzuweisen.

Hierfür wurden Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.4.4.). Danach erfolgte der Blot nach dem *Semi-Dry*-Verfahren: Die Membran sowie 6 Lagen Filterpapier (*Whatman*) pro Blot wurden in Transferpuffer vorbehandelt. Anschließend erfolgte der (luftblasenfreie) Aufbau der Transferapparatur beginnend mit der Kathode. Darauf wurden 3 Lagen Filterpapier, die Membran, das Gel und weitere 3 Lagen Filterpapier gelegt. Den Abschluss bildete die Anode. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für 1 Stunde bei 1 mA/cm^2 Gelfläche. Um die Proteine nach dem Blotten auf der Membran zur Kontrolle des Transfers sichtbar zu machen, wurde eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit H_2O gespült. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1-2 Stunden in *Blocking*-Lösung (5% Milchpulver in 1x TBST) inkubiert.

Transferpuffer: 25 mM Tris
 200 mM Glycin
 20% Ethanol

Ponceau: 0.1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure

Nach dem Waschen in 1x TBST (3 x 10 min) wurde die Membran mit dem primären Antikörper für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran in 1x TBST gewaschen (3 x 10 min) und mit dem sekundären HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Antikörper für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschsritten (3 x 10 min) wurden die Proteine mit ECL Detection Reagents (Pierce) detektiert.

Tabelle 25. Antikörperkombinationen und -verdünnungen für *Western Blot* Analysen. Die Antikörper wurden in 5% (w/v) Magermilch in 1x TBST verdünnt.

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
β-Aktin mouse monoklonal (Sigma) 1:5000	goat anti-mouse IgG HRP sc-2005 1:10.000
β-Tubulin (B-7) sc-5286 mouse monoclonal 1:500	goat anti-mouse IgG HRP sc-2005 1:10.000
Gata4 (C-20) sc-1237x goat polyclonal, 1:5000	rabbit anti-goat IgG HRP sc-2768 1:10.000
Gata4 p[S105] Biosource rabbit polyclonal, 1:1000	goat anti-rabbit IgG HRP sc-2004 1:10.000
Gata6 (C20) sc-7244 goat polyclonal, 1:1000	rabbit anti-goat IgG HRP sc-2768 1:10.000
Sp1 (PEP2) sc-59 rabbit polyclonal, 1:500	goat anti-rabbit IgG HRP sc-2004 1:10.000
HIF1α (C-Term) rabbit polyclonal, 1:1000	goat anti-rabbit IgG HRP sc-2004 1:10.000

3.2.5.2. Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatinimmunopräzipitation dient dem Nachweis der Proteinbindung an die DNA in intakten Zellen. Der Assay wurde nach dem Protokoll des ChIP-Kits (Millipore) durchgeführt. Dafür wurden die Herzen von 3 adulten, männlichen C57BL/6 Mäusen entnommen, zügig zerkleinert und in DMEM mit Formaldehyd in einer Konzentration von 1% aufgenommen und 10 min bei 37°C inkubiert, was zum *crosslinking* der Proteine an die DNA führt. Anschließend wurde das Gewebe zweimal mit kaltem PBS gewaschen; die Zellen wurden lysiert und die DNA mittels Ultraschall geschert. Die Größe der DNA-Fragmente wurde in einem Ethidiumbromid-Agarosegel überprüft und lag bei ca. 500 bp. Um unspezifisch an die Agarose bindende Proteine zu entfernen, wurde das Gemisch zunächst 30 min mit Protein A Agarose inkubiert (*preclearing*). Die DNA-Protein-Komplexe wurden anschließend mit spezifischen Antikörpern (je 10 µg/Ansatz) über Nacht inkubiert. Die eigentliche Reinigung der Komplexe über Protein A Agarose erfolgte danach für 2 Stunden bei 4 °C. Nach mehreren Waschschrinen wurden die Komplexe eluiert, und nach einer Aufhebung des *crosslinks* erfolgte die DNA-Reinigung mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit. Die eluierten DNA-Fragmente wurden anschließend mit spezifischen Primern amplifiziert.

3.3. Tierexperimentelle Analysen

3.3.1. Verpaarung von CD1-Mäusen und Gewinnung von primären Geweben

Für die Genexpressionsanalysen wurden CD1 Wildtyp Mäuse verpaart; der Vaginalplug nach der Verpaarung wurde als E0.5 definiert. Anschließend wurden die trächtigen Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Herzen der Embryonen in unterschiedlichen Embryonalstadien präpariert. Des Weiteren wurden Mäuse am postnatalen Tag 1 (P1) und adulte Mäuse getötet und die Herzen für die RNA-Isolation entnommen.

3.3.2. Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie in C57BL/6 Mäusen

Die Kardiomyopathie wurde durch eine einmalige intraperitoneale Gabe von 15 mg/kg Doxorubicin-HCl in 10 Wochen alten, männlichen C57BL/6 Mäusen induziert (n = 9). Den Kontrolltieren wurde ein äquivalentes Volumen 0.9% NaCl-Lösung injiziert (n = 6). Die Mäuse wurden jeweils nach 24 Stunden (n = 6) oder 5 Tagen (n = 3) getötet und die Herzen für RNA- und Proteinisolation entnommen.

3.4. Statistische Analysen

Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mittelwerten der verschiedenen Gruppen wurde mittels ANOVA und Bonferroni-Test als *post hoc* Korrektur bei multiplen Vergleichen durchgeführt. Der Student's t-Test wurde bei dem Vergleich von zwei Mittelwerten benutzt. Ein p-Wert < 0.05 wurde als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. *EpoR* Genregulation in Kardiomyozyten

4.1.1. Identifizierung regulatorischer Domänen des murinen *EpoR* Promotors in HL-1 Kardiomyozyten

Mit Hinblick auf die bereits bekannten regulatorischen Elemente im *EpoR* Promotor hämatopoietischer Zellen^{1, 5-7, 9, 123, 127}, sollten zunächst *cis*-regulatorische Elemente im *EpoR* Promotor von Kardiomyozyten identifiziert werden. Für die *in vitro* Studien wurden murine HL-1 Kardiomyozyten gewählt. Diese Zelllinie ist von der murinen atrialen Tumorzelllinie AT-1 abgeleitet worden. Sie besitzt den genetischen Hintergrund des C57BL/6 Maus-Laborstammes und hat die morphologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften von Kardiomyozyten beibehalten.^{232, 233} Dazu gehört vor allem die Fähigkeit zur Kontraktion und die Expression essentieller kardialer Gene, wie zum Beispiel von α -MHC, α CA (*cardiac actin*) und ANP. Diese Eigenschaften sowie gute Transfizierbarkeit machen die HL-1 Kardiomyozyten zu einem bevorzugten Zellkulturmodell für die Analyse von Mechanismen kardialer Genregulation.

Um regulatorische Domänen im *EpoR* Promotor zu identifizieren, wurde zunächst ein 5000 bp langes Promotorfragment aus genomischer HL-1 DNA amplifiziert und in das pGL2 *basic* Luziferase Reporterplasmid kloniert (*mEpoRpro*). Wie in Abbildung 8 A dargestellt, umfasst dieses Konstrukt die Nukleotide -4900 bis +100 relativ zum Transkriptionsstart und enthält den in hämatopoietischen Zellen identifizierten distalen Enhancer und ein Inhibitor-Element sowie den als „minimalen Promotor“ definierten Bereich. Das Ausgangskonstrukt *mEpoRpro* wurde zum Transkriptionsstart hin um jeweils den Enhancer und Inhibitor verkürzt. Die daraus resultierenden Promotorkonstrukte $\Delta 1$ *mEpoRpro* (-1742/+100) und $\Delta 2$ *mEpoRpro* (-674/+100) sind ebenfalls in Abbildung 8 A dargestellt. Um die basale Aktivität der einzelnen Reportergenkonstrukte zu untersuchen, wurden diese zusammen mit dem für die *Renilla* Luziferase kodierenden phRL-TK Vektor transient in HL-1 Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Aktivitäten der *firefly* Luziferase gemessen und gegen die korrespondierenden *Renilla* Luziferaseaktivitäten sowie die Proteinkonzentrationen abgeglichen. Die Aktivität des Ausgangskonstruktes *mEpoRpro* wurde gleich 100% gesetzt (Abbildung 8 B).

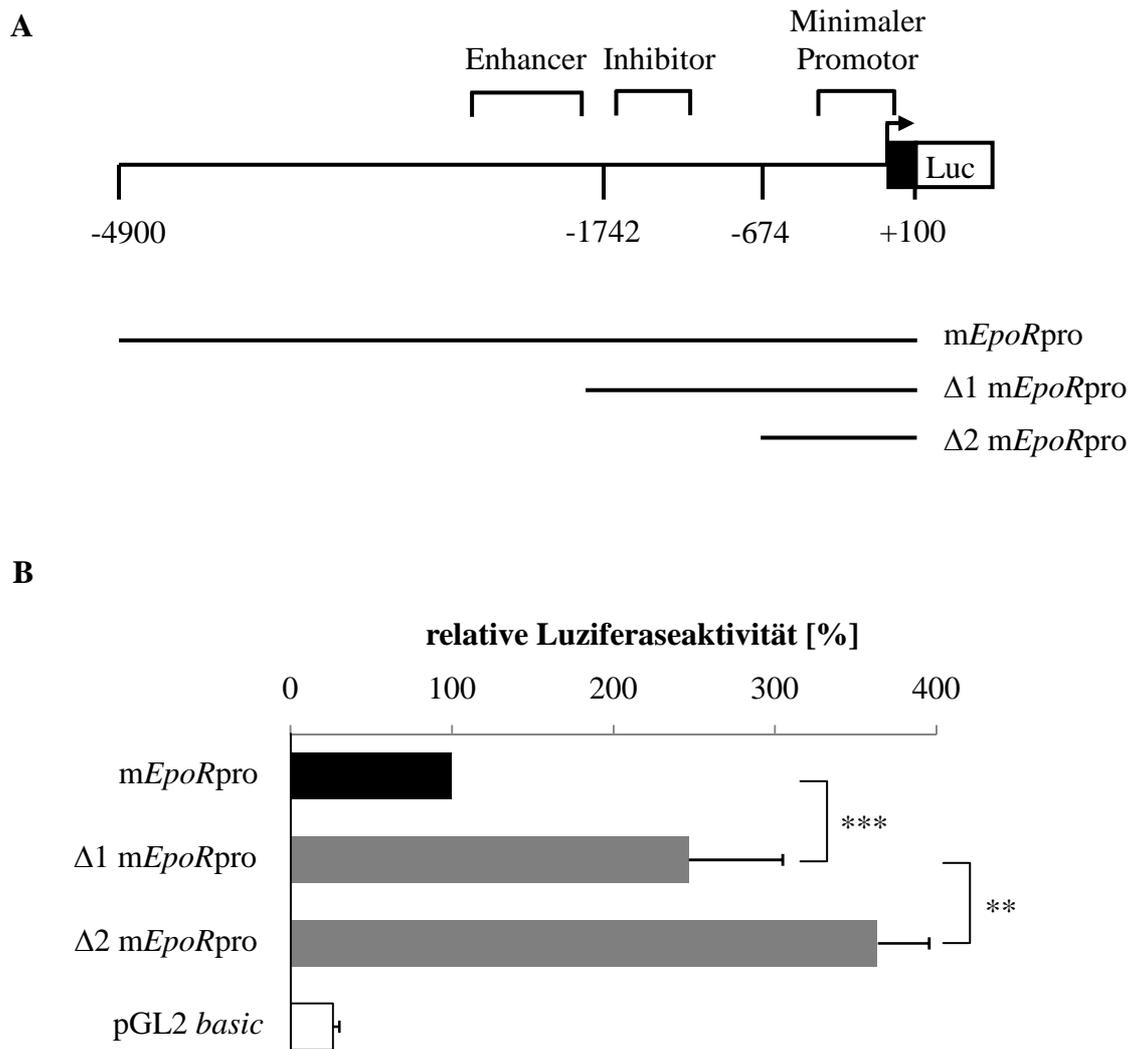


Abbildung 8. Regulatorische Domänen im distalen *EpoR* Promotor in Kardiomyozyten. (A) Schematische Darstellung der Positionen des Enhancers, Inhibitors sowie des minimalen Promotors im murinen *EpoR* Genlocus.¹ Die Zahlen beziehen sich auf die Position der Nukleotide relativ zum Transkriptionsstart und geben die Länge der Promotorkonstrukte wieder. Das *mEpoRpro*-Konstrukt umfasst die Nukleotide -4900 bis +100. Die Konstrukte $\Delta 1$ *mEpoRpro* (-1742/+100) und $\Delta 2$ *mEpoRpro* (-674/+100) wurden durch Verkürzungen generiert. (B) Relative Luziferaseaktivitäten nach Transfektion der jeweiligen Reporterengenkonstrukte in HL-1 Kardiomyozyten. Die relativen Lichteinheiten der *firefly* Luziferase wurden gegen die korrespondierenden *Renilla* Luziferaseaktivitäten und Proteinkonzentrationen abgeglichen (n = 4; ***p < 0.001; **p < 0.01).

Die Ergebnisse der Reporterengenassays in Abbildung 8 B zeigen, dass das 5000 bp lange *mEpoRpro*-Konstrukt im Vergleich zum Leervektor eine transkriptionelle Aktivierung vermittelt. Überraschenderweise steigt die Luziferaseaktivität signifikant auf $246.6 \pm 58.1\%$ (p < 0.001), wenn das Konstrukt um den Enhancer verkürzt wird ($\Delta 1$ *mEpoRpro*).

Die Verkürzung des Promotors um den Inhibitor ($\Delta 2$ *mEpoRpro*) führte zu einem weiteren signifikanten Anstieg der Luziferaseaktivität auf $363.6 \pm 31.8\%$ ($p < 0.01$). Aus den Ergebnissen dieser Reporteranalysen ist zu folgern, dass der im Promotorbereich gelegene Enhancer in Kardiomyozyten keine transkriptionelle Aktivierung vermittelt und dessen Funktion möglicherweise auf hämatopoietische Zellen beschränkt ist. Im Gegensatz dazu könnte der Inhibitor auch in den HL-1 Zellen eine Relevanz zu besitzen. Da das Aktivierungspotential des *EpoR* Promotors hauptsächlich von einem Bereich bis -674 bp auszugehen scheint, wurde im weiteren Verlauf auf die Analyse dieses DNA-Bereichs fokussiert.

Wie in Abbildung 9 A dargestellt, umfasst das Konstrukt $\Delta 2$ *mEpoRpro* die Nukleotide -674 bis +100 relativ zum Transkriptionsstart und enthält den minimalen Promotor (-440/+16). Dieser Bereich umfasst bereits bekannte regulatorische Elemente: eine GC-Box (nt -29/-20), ein GATA-Motiv (nt -53/-50) und drei CACCC-Motive (nt -124/-116, nt -151/-146 und nt -340/-336).^{1, 9} Zusätzliche, potentiell regulatorische Elemente wurden durch die TRANSFAC-Software annotiert. Dieses Programm enthält Daten zu Transkriptionsfaktoren und deren experimentell bestätigten DNA-Bindestellen. Aufgrund dieser Informationen ist eine Vorhersage potentiell regulatorischer Elemente in unbekanntem Promotoren möglich. Zu den annotierten Transkriptionsfaktorbindestellen gehören zwei DNA-Motive für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 (nt -4/+2 und nt -178/-173) und eine E-Box, welche in der Lage ist, unter anderem Homo- oder Heterodimere aus USF1 und USF2 (*upstream stimulating factor*) zu binden (nt -379/-374).²³⁴ Außerdem befinden sich vier *Core*-Motive der Transkriptionsfaktorfamilie YY (Yin Yang) im *EpoR* Promotor (nt -162/-169, nt -185/-183, nt -384/-382 und nt -400/-398). Alle annotierten und bereits bekannten DNA-Bindestellen sind schematisch in Abbildung 9 A wiedergegeben. Das Konstrukt $\Delta 2$ *mEpoRpro* wurde unter Berücksichtigung dieser Motive zum Transkriptionsstart weiter verkürzt ($\Delta 3$ *mEpoRpro*, -234/+100; $\Delta 4$ *mEpoRpro*, -135/+100; $\Delta 5$ *mEpoRpro*, -44/+100 und $\Delta 6$ *mEpoRpro*, -8/+100, Abbildung 9 A).

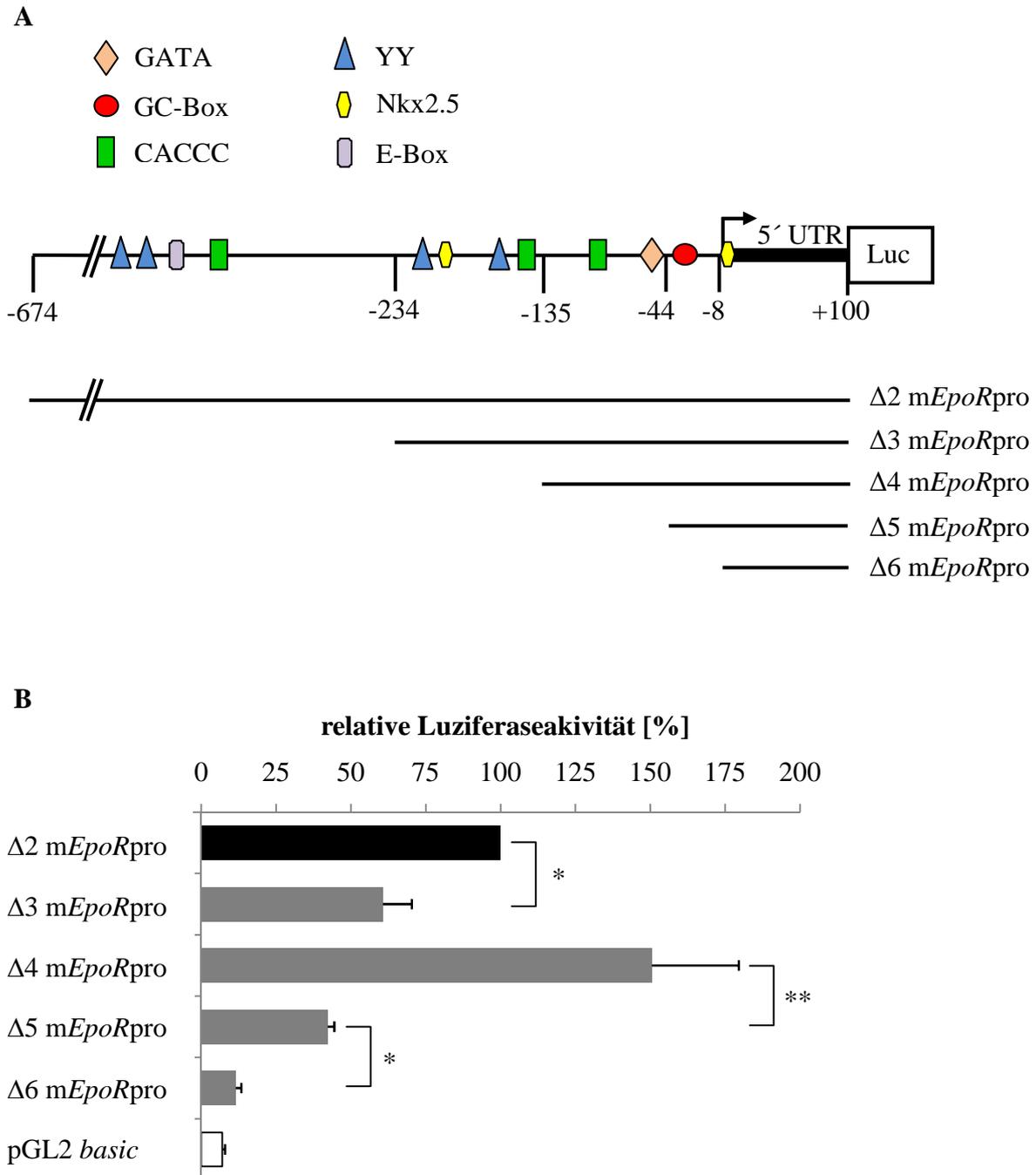


Abbildung 9. Regulatorische Domänen im proximalen *EpoR* Promotor von Kardiomyozyten. (A) Lage der potentiellen regulatorischen Transkriptionsfaktorbindestellen im Promotorkonstrukt $\Delta 2$ mEpoRpro. Die Zahlen beziehen sich auf die Position der Nukleotide relativ zum Transkriptionsstart und geben die Länge der verschiedenen Promotorkonstrukte wieder. (B) Relative Luziferaseaktivitäten nach Transfektion der Konstrukte in HL-1 Kardiomyozyten. Die relativen Lichteinheiten der *firefly* Luziferase wurden gegen die korrespondierenden *Renilla* Luziferaseaktivitäten und Proteinkonzentrationen abgeglichen (n = 3; **p < 0.01; *p < 0.05).

Um das Aktivierungspotential der einzelnen Reportergenkonstrukte zu charakterisieren, wurden Reportergenassays analog zu den vorhergehenden Experimenten durchgeführt. Die Aktivität des Konstrukts $\Delta 2$ *mEpoRpro* wurde gleich 100% gesetzt (Abbildung 9 B). Durch eine Verkürzung des Konstrukts $\Delta 2$ *mEpoRpro* um 440 bp ($\Delta 3$ *mEpoRpro*) nahm die Luziferaseaktivität signifikant um $40 \pm 9.7\%$ ab ($p < 0.05$). In dem verkürzten Bereich liegen die E-Box, ein CACCC-Motiv sowie zwei potentielle Bindestellen für YY-Proteine. Durch eine weitere Verkürzung um ein CACCC-Motiv, zwei YY-Motive, sowie eine Nkx2.5-Bindestelle ($\Delta 4$ *mEpoRpro*), nahm die Luziferaseaktivität überraschenderweise wieder zu und stieg über den Wert des Ausgangskonstrukts $\Delta 2$ *mEpoRpro* auf $150 \pm 29\%$. Dies lässt vermuten, dass die deletierten DNA-Bereiche repressorische Aktivitäten vermitteln. Die Verkürzung um das am weitesten proximal liegende CACCC-Motiv (nt -124/-116) und die GATA-Box ($\Delta 5$ *mEpoRpro*) führte schließlich wieder zu einer signifikanten Reduktion der Luziferaseaktivität auf $42 \pm 2.2\%$ ($p < 0.01$). Dieser DNA-Bereich scheint also eine starke transkriptionelle Aktivierung zu vermitteln. Die Luziferaseaktivität des Konstrukts $\Delta 6$ *mEpoRpro*, welches keine GC-Box und nur die 5' UTR (*untranslated region*) enthielt, nahm weiter signifikant ab ($11.5 \pm 1.9\%$; $p < 0.05$). Die relative Luziferaseaktivität dieses Konstrukts ist ähnlich der des pGL2 *basic* Vektors allein ($7.1 \pm 0.8\%$), was darauf schließen lässt, dass die 5' UTR keine relevanten regulatorischen Elemente enthält.

Aus der Messung der basalen Reportergenaktivitäten der *EpoR* Promotorkonstrukte in HL-1 Zellen lässt sich schlussfolgern, dass der Promotorbereich bis -135 bp essentielle DNA-Bereiche enthält und in HL-1 Kardiomyozyten die stärkste transkriptionelle Aktivierung vermittelt.

4.1.2. Identifizierung essentieller Transkriptionsfaktorbindestellen im murinen *EpoR* Promotor

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, unterschiedliche DNA-Motive hinsichtlich ihrer Relevanz für die transkriptionelle Aktivierung des *EpoR* Promotors näher zu charakterisieren. Hierfür wurden die einzelnen DNA-Motive im $\Delta 2$ *mEpoRpro*-Konstrukt durch ortsgerichtete Mutagenese substituiert (Abbildung 10 A). Die resultierenden Konstrukte wurden mit dem phRL-TK Vektor in HL-1 Zellen kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurde der Reportergenassay durchgeführt, wobei die Luziferaseaktivität des Wildtyp-Ausgangskonstruktes gleich 100% gesetzt wurde.

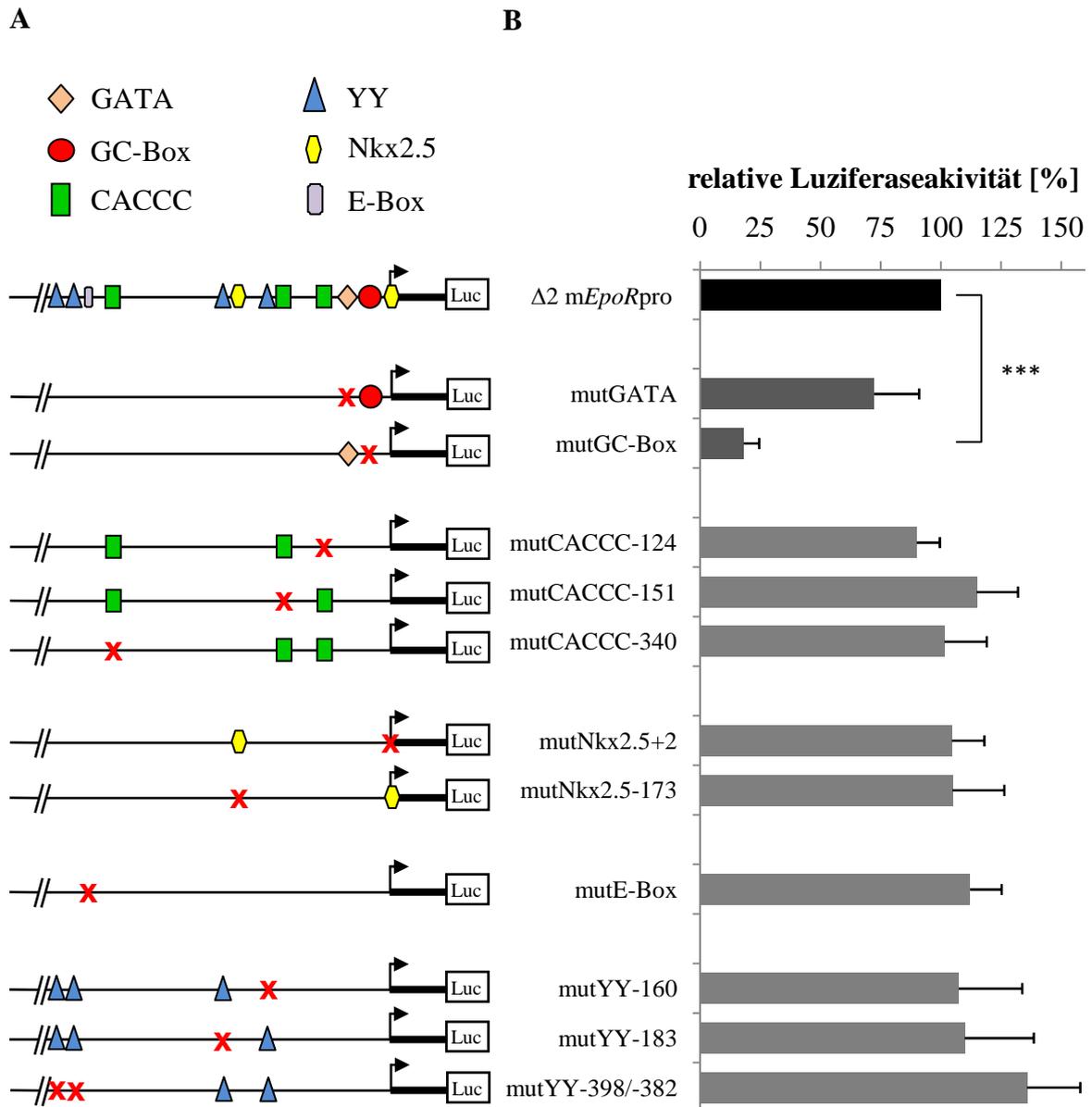


Abbildung 10. Mutationsanalysen des *EpoR* Promotors (A) Im 774 bp langen Reportergenkonstrukt ($\Delta 2$ mEpoRpro) wurden potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen mutiert (hier mit einem roten Kreuz markiert). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung aller Motive in den einzelnen Abbildungen verzichtet. **(B)** Relative Luziferaseaktivitäten nach Transfektion der Konstrukte in HL-1 Kardiomyozyten. Die Aktivitäten der *firefly* Luziferase wurden gegen die korrespondierenden *Renilla* Luziferaseaktivitäten und Proteinkonzentrationen abgeglichen (n = 3; ***p < 0.001).

Wie Abbildung 10 B zeigt, kam es durch die Mutationen der CACCC-, Nkx2.5- und YY-Motive sowie durch die Mutation der E-Box zu keinen Änderungen der Luziferaseaktivitäten. Die Mutation der GATA-Box hingegen, führte zu einer moderaten

Abnahme ($72.3 \pm 18.6\%$), die Mutation der GC-Box zu einem signifikanten Rückgang der Luziferaseaktivität ($18 \pm 6.4\%$; $p < 0.001$).

Aus den Reporteragenassays mit verkürzten oder mutierten *EpoR* Promotoren lässt sich folgern, dass auch in Kardiomyozyten der minimale Promotor für eine transkriptionelle Aktivierung verantwortlich ist. Hierbei sind vor allem die GC- und GATA-Box relevant. Darüber hinaus zeigen aber vor allem die Deletionsanalysen, dass im distalen Promotor zusätzliche inhibitorische DNA-Bereiche liegen (Abbildung 8 B).

4.1.3. Expressionsanalyse potentieller Transkriptionsfaktoren im Herzen sich entwickelnder und adulter CD1-Mäuse sowie in HL-1 Kardiomyozyten

Ausgehend von den Reporteragenexperimenten, welche die GC- sowie die GATA-Box als hauptsächliche Vermittler der transkriptionellen Aktivierung identifizierten, wurden Expressionsprofile der potentiellen Transkriptionsfaktoren im sich entwickelnden und adulten Herzen der Maus sowie in HL-1 Kardiomyozyten erstellt. Die Auswahl der untersuchten Transkriptionsfaktoren basierte auf den publizierten Daten zur *EpoR* Regulation in hämatopoietischen Zellen.^{1, 123, 127} Für die Expressionsanalysen wurde RNA aus den Herzgeweben der verschiedenen Entwicklungsstadien beziehungsweise aus HL-1 Zellen extrahiert; die Transkripte wurden mittels RT-PCR nachgewiesen.

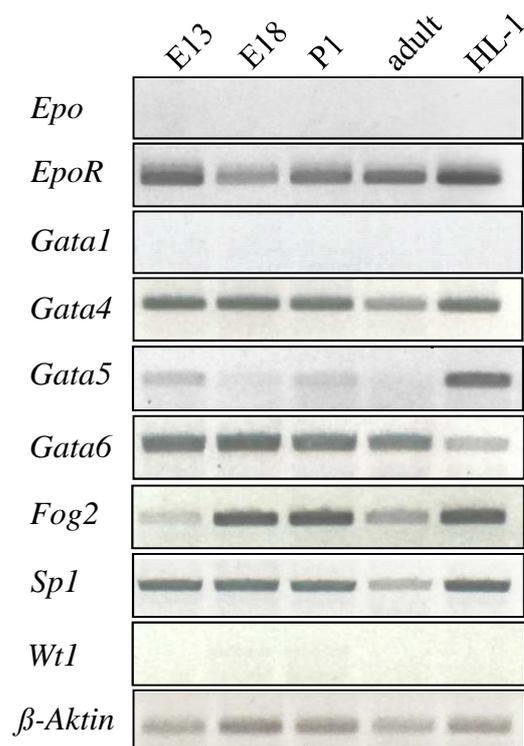


Abbildung 11. Expressionsprofil von *Epo*, *EpoR* und potentiell *EpoR* regulierenden Transkriptionsfaktoren im Herz der sich entwickelnden und adulten Wildtyp-Maus (CD1) sowie in murinen HL-1 Kardiomyozyten. Das Expressionsprofil von *Epo*, *EpoR*, *Gata1*, *Gata4*, *Gata5*, *Gata6*, *Fog2*, *Sp1* und *Wt1* mRNA wurde in den Embryonalstadien E13 und E18, sowie postnatal am Tag 1 (P1), im adulten Herzen und in HL-1 Zellen analysiert. β -Aktin diente als PCR-Ladekontrolle. Die Fotografien der Agarosegele wurden zur besseren Visualisierung der PCR-Produkte invertiert.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, konnte eine *Epo* Genexpression im sich entwickelnden und im adulten Herzen nicht nachgewiesen werden. *EpoR* Transkripte wurden jedoch in allen Entwicklungsstadien, im adulten Herzen und auch in HL-1 Kardiomyozyten detektiert. Alle Gewebe und HL-1 Zellen wurden auf den hämatopoietischen Transkriptionsfaktor *Gata1* sowie *Wt1*, welcher nur in geringem Ausmaß im Epikard exprimiert wird, negativ getestet.²³⁵ Von den Transkriptionsfaktoren, welche das *EpoR* Gen in hämatopoietischen Zellen positiv regulieren, wird nur *Sp1* während der gesamten Embryonalentwicklung, im adulten Herzen und in HL-1 Zellen exprimiert. Des Weiteren wurden in Übereinstimmung mit der Literatur Transkripte von *Gata4*, *Gata6* und *Fog2* in allen Proben nachgewiesen.² *Gata5* Transkripte konnten nur sehr schwach während der Entwicklung, jedoch nicht im adulten Herzen detektiert werden. Diese Ergebnisse stimmen überein mit vorhergehenden Expressionsanalysen, in welchen *Gata5* zunächst im präkardialen Mesoderm und später in den Vorhöfen und Ventrikeln (E9.5) nachgewiesen wurde; ab dem Embryonalstadium E12.5 war die *Gata5* Expression auf das Endokard beschränkt.¹⁶³ Im Gegensatz zu *Gata4* und *Gata6*, deren Expression im adulten Herz und in den HL-1 Kardiomyozyten ähnlich ist, wird *Gata5* in den HL-1 Zellen sehr stark exprimiert.

Da die Expression von *Gata4*, *Gata6* und *Sp1*, nicht aber die von *Gata5*, mit der Expression des *EpoR* Gens koinzidieren, wurde in den weiteren Experimenten auf *Gata4*, *Gata6* und *Sp1* als potentielle, das *EpoR* Gen regulierende Transkriptionsfaktoren fokussiert.

4.1.4. *In vitro* und *in vivo* Studien zur Bindung von Gata-Transkriptionsfaktoren und Sp1 am murinen *EpoR* Promotor

Um zu klären, ob *Gata4*, *Gata6* und *Sp1* an den *EpoR* Promotor binden, wurden Protein-DNA-Bindungsstudien durchgeführt. Hierfür wurde die Bindung von Kernproteinen aus HL-1 Kardiomyozyten an 30 bp lange Oligonukleotide, welche entweder die GATA- oder die GC-Box umfassende Bereiche des *EpoR* Promotors enthielten, mittels EMSA untersucht. Hierfür wurden die Oligonukleotide mit den Kernextrakten, Kompetitor-Oligonukleotiden und spezifischen, gegen die jeweiligen Transkriptionsfaktoren gerichteten, Antikörpern inkubiert. Die Kompetitor-Oligonukleotide enthielten entweder die *EpoR* Promotor Wildtyp-Sequenz oder eine mutierte GATA- beziehungsweise GC-Box. Die

DNA-Protein-Komplexe wurden in einem 5%igem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

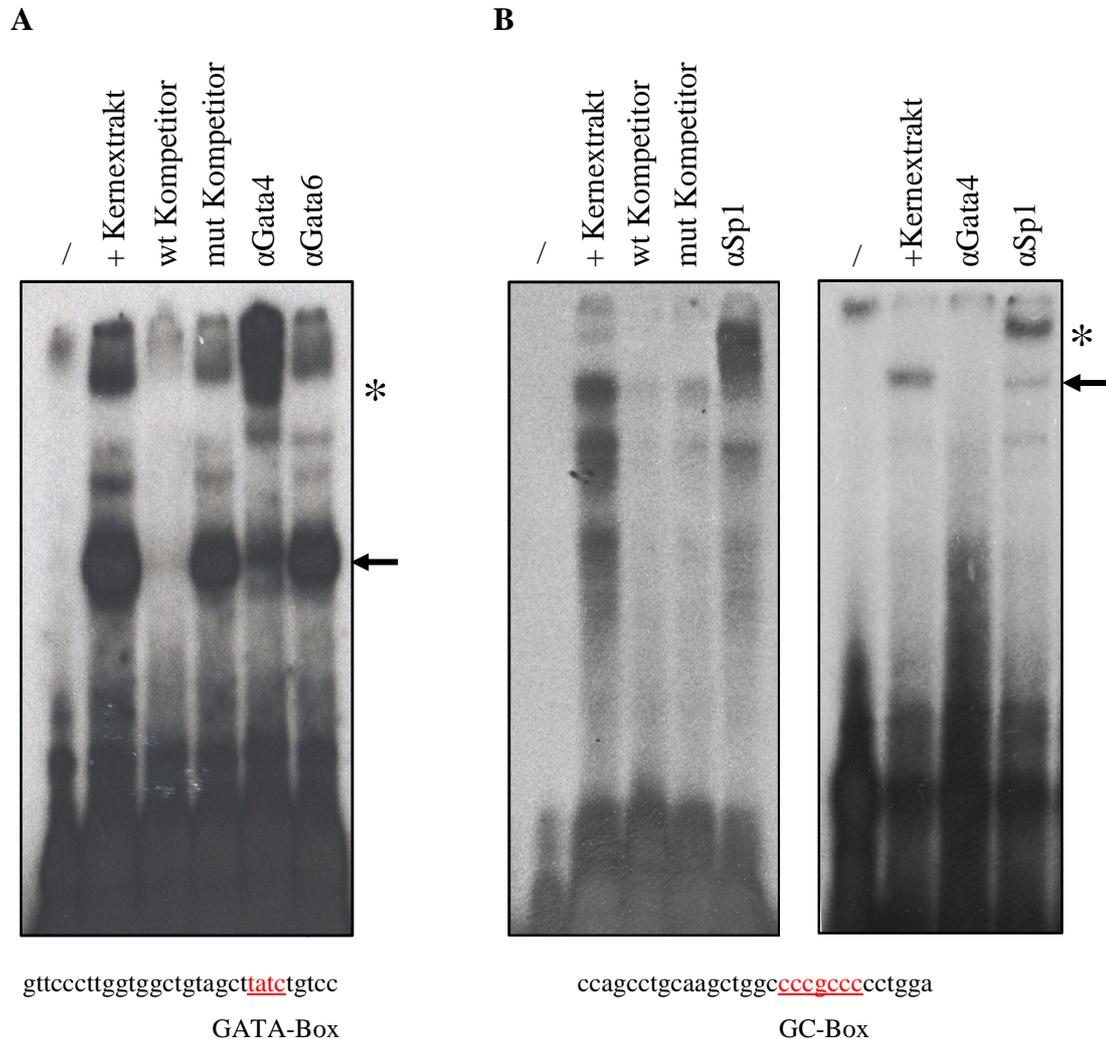


Abbildung 12. *In vitro* Bindungsstudien von Gata4 und Sp1 an den minimalen *EpoR* Promotor. (A) EMSA mit GATA-Box-Oligonukleotid (nt-74/-45). **(B)** EMSA mit GC-Box-Oligonukleotid (nt-44/-14). Beide Oligonukleotide wurden mit ^{32}P gelabelt und anschließend mit HL-1 Kernextrakten inkubiert. Experimente mit wildtyp (wt) oder mutierten (mut) Kompetitoren identifizierten einen GATA- bzw. GC-Box spezifischen *shift*. (*) Gata4 und Sp1 spezifische *supershifts*. Darüber hinaus hebt die Zugabe eines Gata4 Antikörpers den Sp1 *shift* auf.

Wie die Abbildung 12 zeigt, konnten durch eine Konkurrenz mit mutierten Oligonukleotiden GATA- und GC-Box spezifische Protein-DNA-Komplexe (*shifts*) identifiziert werden. Durch die Zugabe von Antikörpern wurde bestätigt, dass Gata4 und Sp1, nicht aber Gata6, an die GATA- beziehungsweise GC-Box binden. Interessanterweise konnte

der Sp1 spezifische *shift* durch Zugabe des Gata4 Antikörpers aufgehoben werden. Dies deutet darauf hin, dass Sp1 und Gata4 direkt miteinander interagieren und die Sp1 Bindung an die GC-Box von Gata4 abhängig ist (Abbildung 12 B).

Weiterhin wurde überprüft, ob Gata4 und Sp1 auch *in vivo* an den *EpoR* Promotor binden. Hierfür wurde eine Chromatinimmunopräzipitation von frisch isolierten Kardiomyozyten aus ca. 10 Wochen alten männlichen C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Es wurden Antikörper gegen die von TRANSFAC annotierten Transkriptionsfaktoren oder gegen Kofaktoren von Gata-Transkriptionsfaktoren gewählt. Nach der Reinigung der präzipitierten DNA Fragmente wurde der *EpoR* Promotor mit Primern, die den Bereich von -168 bis +161 bp relativ zum Transkriptionsstart umfassen (Abbildung 13 A), amplifiziert.

Die Abbildung 13 B zeigt, dass Gata4 und Sp1 in primären Kardiomyozyten an den *EpoR* Promotor binden. In der Probe mit Gata6-kopräzipitierter DNA wurde der *EpoR* Promotor nur sehr schwach amplifiziert; der Vergleich zur Amplifikation mit dem *Gapdh* Promotor weist darauf hin, dass es sich um ein unspezifisches Hintergrundsignal handelt.

Zusätzlich zu den Antikörpern gegen Gata-Transkriptionsfaktoren und Sp1 wurden Antikörper gegen weitere durch TRANSFAC annotierte (vgl. 4.1.1.) Transkriptionsfaktoren oder Gata-Interaktionspartner eingesetzt. So zeigen YY1 und p300, beides ubiquitär exprimierte Faktoren, welche mit Gata4 interagieren können, ebenfalls eine deutliche Bindung.^{209, 222, 236, 237} Eine Bindung an den *EpoR* Promotor wurde auch für Nkx2.5, einem herzspezifischen Transkriptionsfaktor, welcher mit Gata4 interagieren kann, nachgewiesen.^{223, 238, 239} Fog2, ein gut charakterisierter Kofaktor von Gata4^{178, 240-243}, bindet nicht an den *EpoR* Promotor. USF1 und USF2, zwei ubiquitär exprimierte Faktoren mit Leucin Zipper-Domänen, binden ebenfalls an den *EpoR* Promotor und könnten dabei als Homo- oder Heterodimere vorliegen.²³⁴ Demgegenüber binden Smad3 und Stat5A *in vivo* nicht am *EpoR* Promotor. Die Präzipitate der Antikörper gegen RNA Polymerase II (RNA Pol II) und acetyliertes Histon3 (AcH3) dienten als Positivkontrolle. Um die Spezifität des Gata4 Signals zu überprüfen, wurde ein gut charakterisierter Promotor ohne GATA-Box, der *Gapdh* Promotor (+8 bis +343), amplifiziert.^{151, 244} Das Sp1 Signal kann durch das Vorhandensein zweier GC-Boxen im *Gapdh* Promotor erklärt werden.

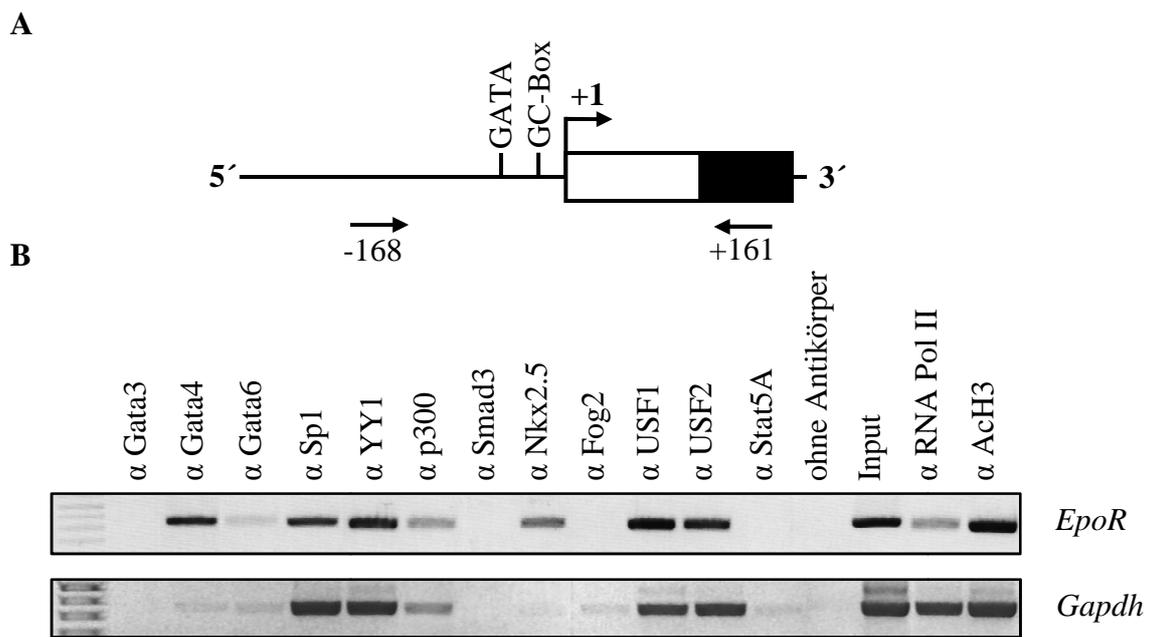


Abbildung 13. *In vivo* Bindungsstudien von Transkriptionsfaktoren an den *EpoR* Promotor im primären Herzgewebe. (A) Lage der *EpoR* Promotor umfassenden Primer. Die Transkriptionsstartstelle ist mit einem Pfeil, die 5' UTR mit einer weißen Box und Exon 1 mit einer schwarzen Box dargestellt. (B) Chromatinimmunopräzipitations-Assays wurden mit primären Kardiomyozyten aus 10 Wochen alten männlichen C57BL/6 Mäusen und den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Die präzipitierte DNA wurde anschließend mit *EpoR* Promotor-spezifischen Primern amplifiziert. Als Kontrolle für die Spezifität des Gata4 Signals diente der *Gapdh* Promotor. Die Fotografie des Agarosegels wurde zur besseren Visualisierung der PCR-Produkte invertiert.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien erlauben den Rückschluss, dass Gata4 und Sp1 sowohl *in vitro* (EMSA) als auch *in vivo* (ChIP) an den murinen *EpoR* Promotor binden. Zudem zeigen die ChIP Experimente, dass weitere Transkriptionsfaktoren (YY1, Nkx2.5, USF1 und USF2) und die Acetyltransferase p300 an der *EpoR* Regulation beteiligt sein könnten. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde auf die Transkriptionsfaktoren Gata4 und Sp1 fokussiert.

4.1.5. Einfluss ektopisch exprimierter Transkriptionsfaktoren auf die endogene *EpoR* Expression

Um im Anschluss an die Bindungsstudien auch die funktionelle Relevanz von Gata4 und Sp1 am *EpoR* Promotor nachzuweisen, wurden beide Transkriptionsfaktoren in HL-1 Zellen transient überexprimiert. Hierfür wurden die Überexpressionsvektoren einzeln oder in Kombination in HL-1 Kardiomyozyten transfiziert. Nach 48 Stunden wurde aus den Zellen RNA isoliert und die endogene *EpoR* Expression mittels Real-time PCR quantifiziert.

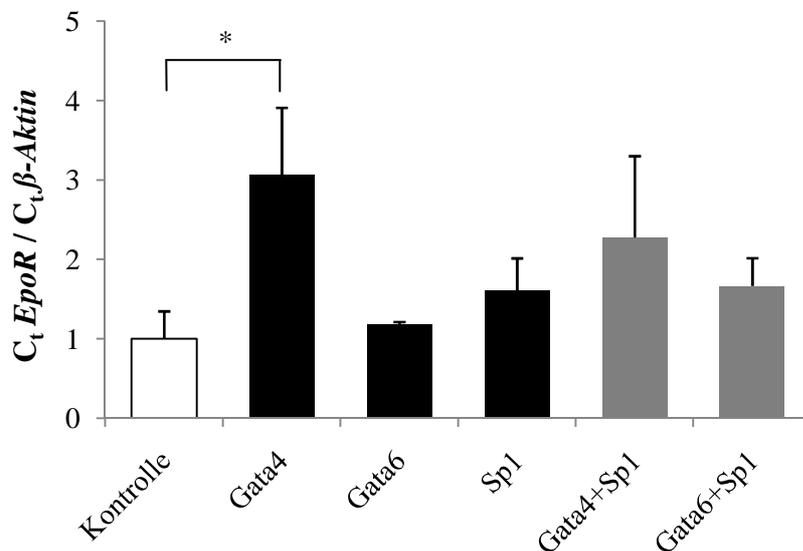


Abbildung 14. Einfluss von Gata4, Gata6 sowie Sp1 Überexpression auf die endogene *EpoR* Expression. Gata4, Gata6 oder Sp1 wurden in HL-1 Zellen transient überexprimiert. Nach 48 Stunden wurde RNA aus den Zellen isoliert und die *EpoR* Expression mittels Real-time PCR quantifiziert. Die *EpoR* Werte wurden mit β -Aktin abgeglichen (n = 3; *p < 0.05).

Wie die Grafik in Abbildung 14 zeigt, konnte nur durch eine Überexpression von Gata4, nicht aber von Gata6 oder Sp1, die endogene *EpoR* Expression signifikant um das 3-fache (± 0.8 ; p < 0.05) gesteigert werden. Die Kombination von Gata4 oder Gata6 mit Sp1 ergab keine additiven Effekte auf die *EpoR* mRNA-Level.

Derzeit kommerziell erhältliche *EpoR* Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Nordic Biosite, Täby, Schweden und Upstate, Billerica, MN, USA) reagieren unspezifisch, zum Beispiel mit

Hsp70.^{67, 68, 245} Amgen Inc. (Thousands Oaks, CA, USA) hat im Jahr 2009 einen monoklonalen EpoR-sensitiven Antikörper entwickelt, der derzeit anderen Arbeitsgruppen nicht zur Verfügung steht.²⁴⁵ Aus diesem Grund musste in der gesamten eigenen Arbeit auf den Nachweis des EpoR auf Proteinebene durch Western Blot, FACS oder Immunhistochemie verzichtet werden.

4.1.6. Einfluss von *Gata4* und *Sp1* siRNA auf die *EpoR* Expression in HL-1

Kardiomyozyten

Um den Einfluss von *Gata4* und *Sp1* auf die endogene *EpoR* Expression zu spezifizieren, wurde die siRNA Technologie genutzt, mit der die Proteinexpression beider Transkriptionsfaktoren supprimiert werden sollte. Für den *Gata4* knockdown wurden HL-1 Zellen mit *Gata4* oder als Kontrolle mit *scrambled* siRNA Duplexen unter Verwendung von Lipofectamin transfiziert. Aus Gründen der Verfügbarkeit wurden *short hairpin* Vektoren mit einer *scrambled* oder *Sp1* Sequenz für den *Sp1* knockdown genutzt.²³¹ Diese wurden ebenfalls in HL-1 Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden RNA beziehungsweise Proteine isoliert und hinsichtlich der *EpoR* mRNA sowie der *Gata4* und *Sp1* Proteinlevel untersucht (Abbildung 15).

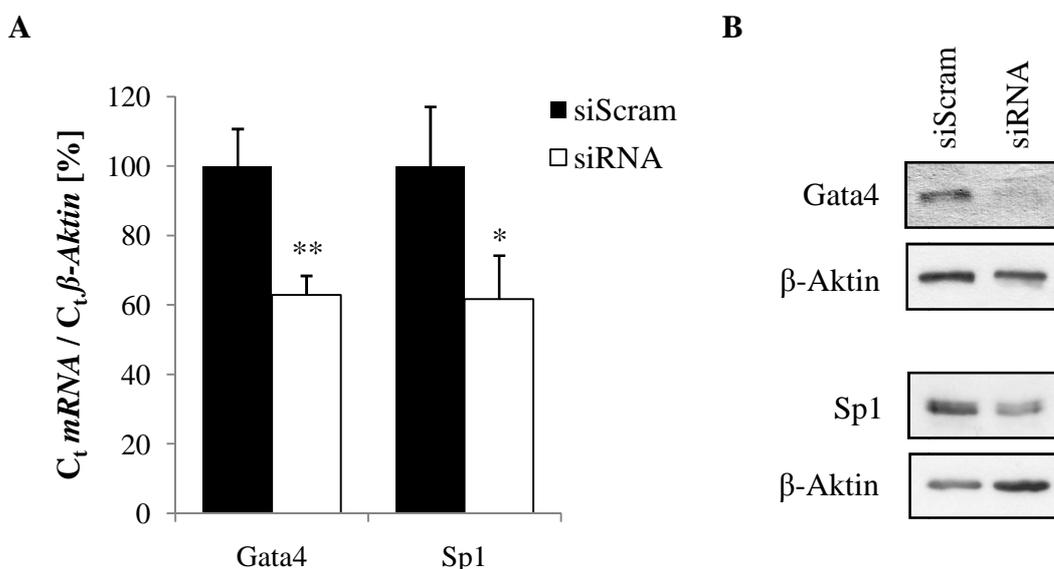


Abbildung 15. Einfluss einer *Gata4* oder *Sp1* Suppression auf die endogene *EpoR* Expression in HL-1 Kardiomyozyten. HL-1 Zellen wurden entweder mit *Gata4* siRNA Duplexen oder einem *Sp1* *short hairpin*-Vektor transfiziert (A) Quantitative Real-time PCR Analyse der *Gata4* oder *Sp1* knockdown Experimente. Die *EpoR* Werte wurden mit β -Aktin abgeglichen (n = 3; **p < 0.01; *p < 0.05). (B) Nachweis des *Gata4* und *Sp1* knockdowns mittels Western Blot Analyse. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Die quantitative Real-time PCR ergab, dass im Vergleich zu den *scrambled* Kontrollen die *EpoR* Expression durch einen *Gata4 knockdown* signifikant auf $63 \pm 5.5\%$ ($p < 0.01$), beziehungsweise durch einen *Sp1 knockdown* auf $62 \pm 12.6\%$ ($p < 0.05$) reduziert wurde (Abbildung 15 A). Parallel zu den Analysen der *EpoR* Expression wurde die Suppression der Transkriptionsfaktoren dokumentiert. Die Western Blot Analysen in Abbildung 15 B zeigen, dass die Suppression sowohl von *Gata4* als auch von *Sp1* erfolgreich war.

4.1.7. Verifizierung der *EpoR* Regulation in transgenen Mäusen mit induzierbarer *short hairpin RNA* gegen *Gata4*

Um den Einfluss der *Gata4* Suppression auf die *EpoR* Expression *in vivo* zu verifizieren, standen transgene Mäuse zur Verfügung.⁴ Diese Mäuse besitzen ein stabil integriertes, mittels Doxyzyklin induzierbares *short hairpin RNA* (shRNA) Konstrukt gegen *Gata4*. Bei diesem „Tet-on“-System befindet sich das Transgen unter der Kontrolle des H1-Promotors, welcher die Operatorsequenz des Tetrazyklin-Repressorelements (TetR) besitzt, diesen bindet und so die Transkription des Transgens verhindert. Die Expression der *Gata4* shRNA wurde durch die Gabe von 20 mg Doxyzyklin/ml Trinkwasser induziert. Doxyzyklin bindet den TetR und bewirkt eine Konformationsänderung, so dass dieser sich vom Promotor löst und die *Gata4* shRNA transkribiert werden kann. 38 Tage nach Beginn der Induktion wurden sowohl die transgenen als auch die Doxyzyklin-behandelten FvB-Wildtyp-Mäuse getötet und das Herzgewebe hinsichtlich der *Gata4* und *EpoR* mRNA-Level mittels Real-time PCR untersucht. Dieser Zeitraum war zuvor als optimales Zeitintervall für die Induktion der *Gata4* Suppression identifiziert worden.⁴

Abbildung 16 A zeigt, dass 38 Tage nach der Induktion der *Gata4* shRNA das *Gata4* mRNA Level im Myokard signifikant auf $10 \pm 4.5\%$ gesunken ist ($p < 0.01$). Diese *Gata4* Suppression wurde mittels Western Blot Analysen auf Proteinebene bestätigt (Abbildung 16 B).⁴ Parallel zur *Gata4* Suppression sank im Vergleich zu den Kontrolltieren auch die *EpoR* Expression signifikant auf $18.4 \pm 10.1\%$ des Ausgangswertes ($p < 0.05$).

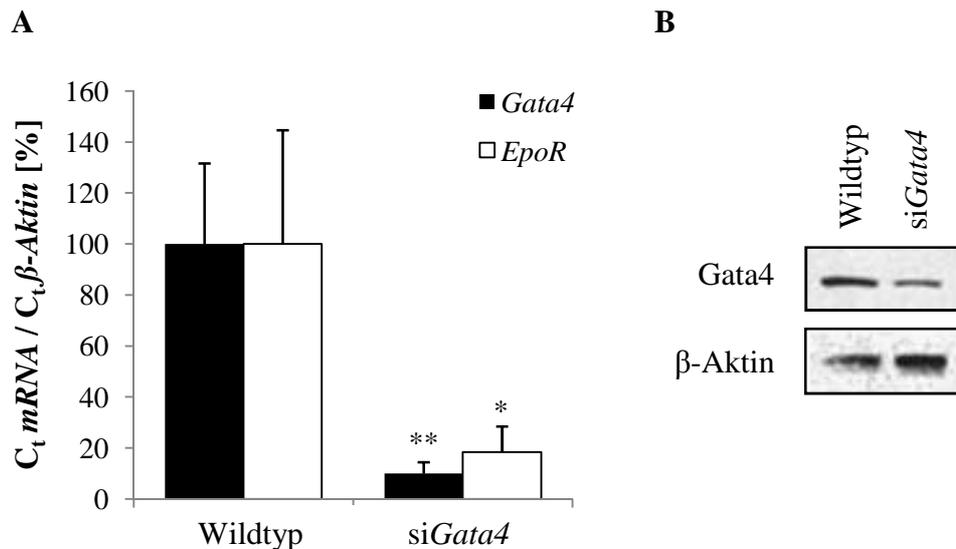


Abbildung 16. Abnahme der *EpoR* mRNA Expression im Herz von transgenen Mäusen mit *short hairpin* RNA gegen *Gata4*. Den Mausmutanten mit einem stabil integrierten Doxozyklin-induzierbaren *Gata4* shRNA Konstrukt oder Wildtyp-Mäusen wurde über 38 Tage 20 mg Doxozyklin/ml Trinkwasser verabreicht. **(A)** Quantitative Real-time PCR der kardialen *Gata4* und *EpoR* mRNA Level. Alle Proben wurden mit $\beta\text{-Aktin}$ abgeglichen (n = 4; **p < 0.01; *p < 0.05). **(B)** Nachweis des *Gata4* knockdowns mittels Western Blot Analyse. $\beta\text{-Aktin}$ diente als Ladekontrolle. Dieser Teil der Abbildung wurde auch in der Originalarbeit der Mausmutante verwendet. ⁴

Die Ergebnisse aus den Überexpressions- und *knockdown* Experimenten belegen, dass Sp1 und *Gata4* für die Transaktivierung des *EpoR* Promotors von Bedeutung sind. Ferner zeigen die *in vivo* Studien, dass *Gata4* auch im lebenden Organismus die *EpoR* Genexpression reguliert.

4.2. Veränderungen der kardialen *EpoR* Regulation bei Doxorubicin-induzierter Kardiomyopathie und unter Hypoxie

Die vorhergehenden Ergebnisse zeigen, dass neben anderen Transkriptionsfaktoren *Gata4* und Sp1 an den proximalen *EpoR* Promotor binden und im gesunden Herzen die transkriptionelle Aktivierung des *EpoR* vermitteln. Im weiteren Verlauf der Studie sollte die Modulation der kardialen *EpoR* Genregulation in Krankheitsmodellen evaluiert werden. Hierfür wurden die Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie, welche mit einer Depletion von

Gata4 assoziiert ist, und eine hypoxische Schädigung in HL-1 Kardiomyozyten näher untersucht.

4.2.1. *EpoR* Expression in Doxorubicin-induzierter Kardiomyopathie

Doxorubicin ist ein Daunorubicin-Derivat und gehört zur Stoffklasse der Anthrazykline. In der Klinik kommt Doxorubicin als Chemotherapeutikum zur Behandlung von soliden Tumoren und Leukämien zum Einsatz, wobei die Anwendbarkeit durch die Kardiotoxizität des Stoffes limitiert ist: Patienten entwickeln häufig eine Kardiomyopathie, welche mit einer Atrophie und Degeneration des Herzgewebes einhergeht und in einer Myokardfibrose mündet.⁸⁷ Im Mausmodell wurde nachgewiesen, dass die Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie mit einem dramatischen Verlust von Gata4 Protein in den Kardiomyozyten assoziiert ist.⁸⁷ Für die *EpoR* Promotor Regulation ist das Modell der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie aufgrund dieser Gata4 Depletion von Interesse. In publizierten Arbeiten wurde gezeigt, dass rEpo die Doxorubicin-vermittelte Depletion von Gata4 verhindert und das *EpoR* Proteinlevel unverändert bleibt.⁸⁷ In der eigenen Arbeit wurde das Modell der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie genutzt, um den Verlauf der *EpoR* und *Gata4* Expression nach der Gabe von Doxorubicin zu untersuchen. Dafür wurde 10 Wochen alten männlichen C57BL/6 Mäusen 15 mg/kg Körpergewicht Doxorubicin-Hydrochlorid intraperitoneal injiziert. Der Kontrollgruppe wurde das äquivalente Volumen einer 0.9%igen NaCl-Lösung i.p. verabreicht. Nach 24 Stunden oder 5 Tagen wurden die Mäuse getötet, RNA und Protein aus den Herzgeweben extrahiert und quantitative Real-time PCR beziehungsweise Western Blot Analysen durchgeführt.

24 Stunden nach der Doxorubicin-Injektion nahm die Gata4 Proteinkonzentration sehr stark ab, erreichte aber nach 5 Tagen wieder ein Niveau wie in den Kontrolltieren (Abbildung 17 A). Dagegen wurden weder Gata6 noch Sp1 im Verlauf der 5 Tage moduliert. Parallel zur Gata4 Depletion nach 24 Stunden sank auch die *EpoR* Expression signifikant auf $19 \pm 13\%$ des Ausgangswertes ($p < 0.01$), stieg jedoch nach 5 Tagen wieder signifikant ($\pm 51\%$; $p < 0.01$) auf das Ausgangsniveau an (Abbildung 17 B). Interessanterweise scheint die Gata4 Regeneration auf eine gesteigerte *Gata4* Expression zurückzuführen zu sein: während diese nach 24 Stunden unverändert blieb, stieg sie nach 5 Tagen hochsignifikant um das 4-fache an ($\pm 95\%$; $p < 0.001$). Die Kardiomyozyten wirken der Depletion des Gata4 Proteins offensichtlich durch einen endogenen Regulationsmechanismus entgegen.

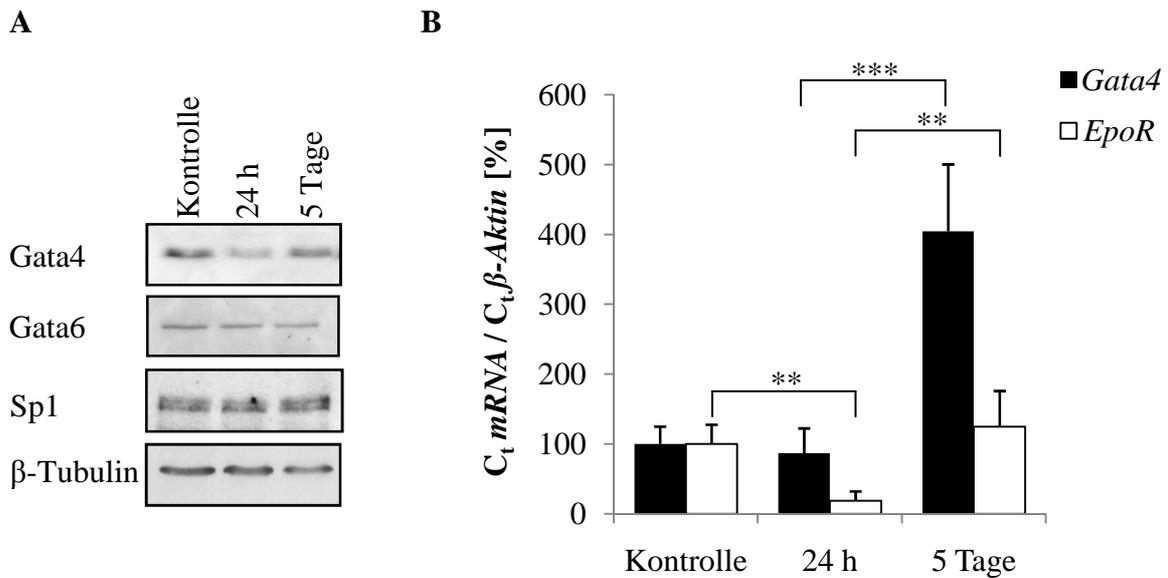


Abbildung 17. Gata4 Depletion und Regeneration sowie korrespondierende *Gata4* und *EpoR* Expression bei Doxorubicin-induzierter Kardiomyopathie in C57BL/6 Mäusen. Durch eine intraperitoneale Injektion von 15 mg/kg Körpergewicht Doxorubicin-Hydrochlorid wurde in 10 Wochen alten männlichen C57BL/6 Mäusen eine Kardiomyopathie induziert. In der Kontrollgruppe wurde das gleiche Volumen 0.9% NaCl-Lösung injiziert. (A) Western Blot Analysen von Gata4, Gata6 und Sp1 24 Stunden und 5 Tage nach Doxorubicin-Injektion. β -Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) Quantitative Real-time PCR Analyse der *Gata4* und *EpoR* Expression. *Gata4* und *EpoR* wurden mit β -Aktin abgeglichen (Kontrolle: n = 6; 24 h: n = 6; 5 Tage: n = 3; ***p < 0.001; **p < 0.01).

Gata4 und Gata6 wurden oft als sich gegenseitig ersetzende Transkriptionsfaktoren diskutiert, da sie zum Teil identische Zielgene besitzen. Allerdings binden beide Faktoren mit unterschiedlicher Affinität an deren Promotoren.^{174, 246, 247} Da aber in diesem Modell die *EpoR* Expression lediglich mit dem Gata4 Level korreliert, lässt sich schlussfolgern, dass die Gata4 Depletion im Hinblick auf die *EpoR* Expression nicht durch Gata6 kompensiert wird. Dieses Ergebnis ist mit den DNA-Bindungsstudien sowie der ektopischen *Gata6* Expression kongruent (Abbildungen 12, 13 und 14).

4.2.2. Kardiale *EpoR* Regulation unter Hypoxie

Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien belegen die Relevanz des Epo/EpoR Systems bei kardialer Ischämie und Reperfusionsschädigung. Ziel der folgenden Experimente war es deshalb, die Mechanismen der *EpoR* Regulation in hypoxischen HL-1 Kardiomyozyten zu charakterisieren.

4.2.2.1. Stimulation der endogenen *EpoR* Expression in HL-1 Kardiomyozyten durch Hypoxie

Zunächst wurde untersucht, ob die *EpoR* Expression in Kardiomyozyten unter *in vitro* Bedingungen durch Hypoxie gesteigert wird. Hierfür wurden HL-1 Zellen für 24 Stunden einer Hypoxie (1% O₂) ausgesetzt. Die endogene *EpoR* Expression wurde mittels quantitativer Real-time PCR untersucht (Abbildung 18).

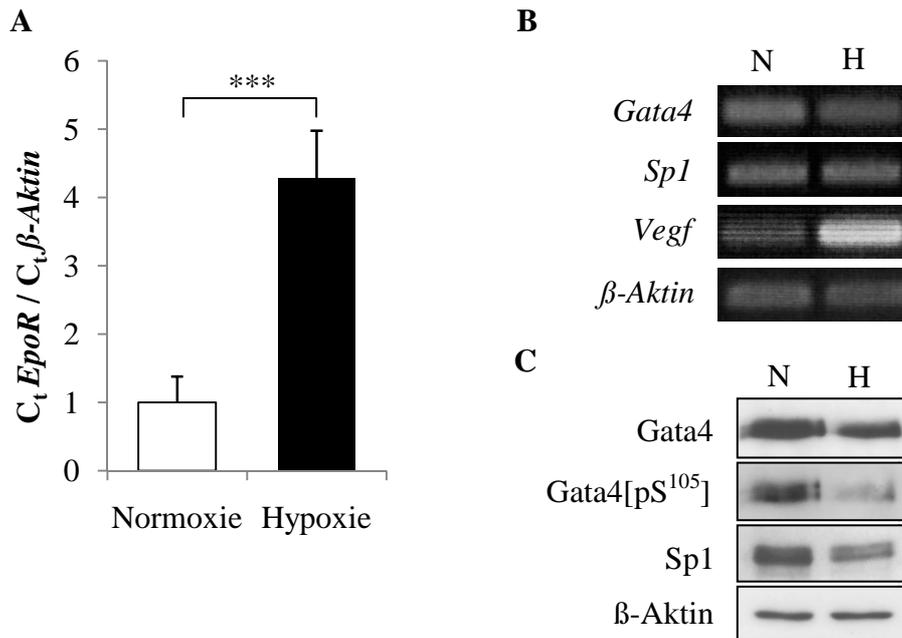


Abbildung 18. Einfluss von Hypoxie auf die *EpoR* Expression in HL-1 Kardiomyozyten. (A) HL-1 Zellen wurden 24 Stunden einer Hypoxie (1% O₂) ausgesetzt. Die Effekte auf die endogene *EpoR* Expression wurden mittels Real-time PCR quantifiziert. Die *EpoR* Werte wurden mit $\beta\text{-Aktin}$ abgeglichen. (n = 3; ***p < 0.001). (B) *Gata4* und *Sp1* Expression unter Normoxie (N) und Hypoxie (H). Als Positivkontrolle für die Hypoxie diente die gesteigerte *Vegf* Expression. $\beta\text{-Aktin}$ diente als PCR-Ladkontrolle. (C) Korrespondierende Western Blot Analysen von Gata4, Gata4[pS¹⁰⁵] und Sp1. $\beta\text{-Aktin}$ diente als Ladkontrolle.

Abbildung 18 A zeigt, dass im Vergleich zu Kontrollen die *EpoR* Expression unter hypoxischen Bedingungen signifikant um das 4-fache (± 0.69 ; p < 0.001) anstieg. Als Positivkontrolle für die Hypoxie diente die *Vegf* Expression, welche nach 24 Stunden erwartungsgemäß stark anstieg (Abbildung 18 B).⁹⁵ Um zu prüfen, ob der Anstieg der *EpoR* mRNA unter hypoxischen Bedingungen mit einer gesteigerten Expression der positiv regulierenden Transkriptionsfaktoren Gata4 und Sp1 korrelierte, wurde deren Expression analysiert. Wie Abbildung 18 B zeigt, ändert sich das Expressionsmuster

beider Faktoren unter Hypoxie jedoch nicht. Western Blot Analysen zeigten, dass die Proteinkonzentrationen von Gata4 und Sp1 unter Hypoxie tatsächlich leicht abnehmen (Abbildung 18 C). Da die Bindungsaktivität und das Transaktivierungspotential von Gata4 unter anderem durch Phosphorylierung modifiziert werden, wurde der Phosphorylierungsstatus von Gata4 am Serin 105, einer zentralen Phosphorylierungsstelle, welche sowohl DNA-Bindung als auch Aktivierung und Stabilität des Proteins beeinflusst, mittels Western Blot untersucht.^{2, 203, 204} Wie die Abbildung 18 C zeigt, ist das Chemilumineszenz-Signal der Hypoxie-Probe deutlich geringer, was aber auf die Abnahme des Gesamtproteins unter Hypoxie zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Hypoxie-induzierte Anstieg der endogenen *EpoR* Expression weder auf eine gesteigerte Expression der positiv regulierenden Transkriptionsfaktoren Gata4 und Sp1 noch auf eine ausgeprägtere Phosphorylierung von Gata4 am Serin 105 zurückzuführen ist. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass andere Mechanismen für die gesteigerte *EpoR* Expression unter Hypoxie verantwortlich sind.

4.2.2.2. Simulation einer hypoxischen Stimulation durch den PHD-Inhibitor

L-Mimosin

Ein zentraler Faktor für die Vermittlung einer Hypoxie-induzierten Genregulation ist der Transkriptionsfaktorkomplex HIF (*hypoxia inducible factor*). Die Expression zahlreicher Gene wie zum Beispiel von Erythropoietin, *Vegf* und glykolytischer Enzyme wird unter Hypoxie durch das Aktivierungspotential des HIF-Komplexes verstärkt.^{155, 248}

Um zu überprüfen, ob der Anstieg der endogenen *EpoR* Expression in HL-1 Kardiomyozyten durch den HIF-Komplex vermittelt wird, wurde ein Prolylhydroxylasen (PHD)-Inhibitor eingesetzt. Durch eine Inhibition der Prolylhydroxylasen werden die α -Untereinheiten von HIF auch unter Normoxie nicht mehr abgebaut, was zum Aufbau des vollständigen, transkriptionell aktiven HIF-Komplexes aus α - und β -Untereinheiten führt. Als Inhibitor der Prolylhydroxylasen wurde L-Mimosin verwendet. Dieses 2-Oxoglutarat-Analogon konkurriert mit dem eigentlichen Substrat um das Eisenion im aktiven Zentrum des Enzyms und verhindert so die Hydroxylierung der HIF α -Untereinheiten.²⁴⁹⁻²⁵¹ Für den Assay wurden HL-1 Zellen für 24 Stunden mit L-Mimosin in einer Konzentration von 800 μ M unter Normoxie kultiviert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem gleichen Volumen 0.1 N HCl behandelt. Anschließend wurde RNA extrahiert und die endogene *EpoR* Expression mittels Real-time PCR quantifiziert (Abbildung 19 A). Parallel zu den

PCR-Analysen wurden Western Blots mit HIF1 α -spezifischen Antikörpern durchgeführt, um die Stabilisierung der HIF α -Untereinheiten durch L-Mimosin auf Proteinebene nachzuweisen (Abbildung 19 B).

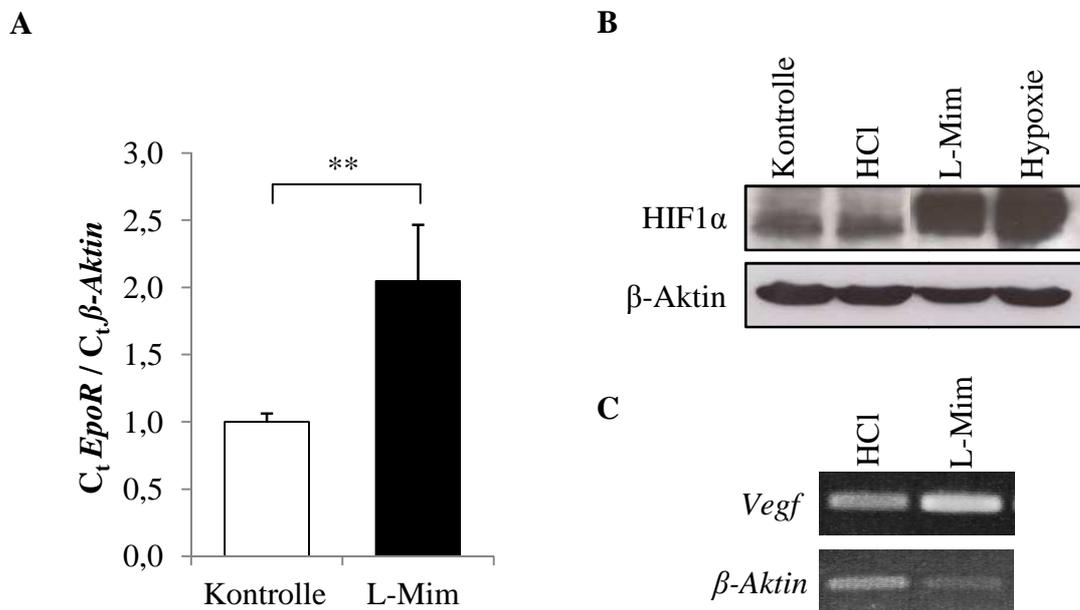


Abbildung 19. Einfluss des PHD-Inhibitors L-Mimosin auf die *EpoR* Expression in HL-1 Kardiomyozyten. HL-1 Zellen wurden für 24 Stunden mit L-Mimosin (L-Mim) oder als Kontrolle mit gleichem Volumen 0,1 N HCl unter Normoxie inkubiert. **(A)** Die Effekte auf die endogene *EpoR* Expression wurden mittels Real-time PCR quantifiziert und mit β -Aktin abgeglichen (n = 4; **p < 0,01). **(B)** HIF1 α -Western Blot zur Kontrolle der L-Mimosin-Behandlung. β -Aktin diente als Ladekontrolle. **(C)** *Vegf* Expression in L-Mimosin behandelten Kardiomyozyten und in Kontrollen. β -Aktin diente als PCR-Ladekontrolle.

Wie die Abbildung 19 A zeigt, stieg die endogene *EpoR* Expression unter L-Mimosin um das 2-fache signifikant an ($\pm 0,4$; p < 0,01). Ferner zeigt der Western Blot in Abbildung 19 C, dass die Prolylhydroxylasen durch L-Mimosin erfolgreich inhibiert wurden und das Level der HIF1 α -Untereinheit deutlich gesteigert war. Allerdings wird unter 1% Sauerstoff eine höhere Konzentration an HIF-Komplexen erreicht als durch die Inhibition allein. Als Positivkontrolle für die Funktionalität der HIF-Komplexe wurde *Vegf* amplifiziert, dessen Expression erwartungsgemäß deutlich gesteigert wurde (Abbildung 19 C).²⁵²

Die Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass die Stimulation der endogenen *EpoR* Expression direkt oder indirekt durch den HIF-Komplex vermittelt wird.

4.2.2.3. Identifizierung Hypoxie-induzierbarer DNA-Domänen im *EpoR* Genlocus

Die vorhergehenden Daten führten zu der Hypothese, dass die gesteigerte *EpoR* Expression unter Hypoxie durch den HIF-Komplex vermittelt wird. Da HIF-Transkriptionsfaktoren ihre transkriptionelle Aktivierung durch Bindung an das *hypoxia response* Element (HRE) entfalten³, sollten nachfolgend die DNA-Bereiche, welche die Hypoxie-Antwort des *EpoR* Gens vermitteln, identifiziert werden.

Vorhergehende Reporteranalysen unter Normoxie oder Hypoxie zeigten, dass sich im Promotor bis -4900 bp *upstream* keine Hypoxie-induzierbaren DNA-Bereiche befinden (Daten nicht gezeigt). Da in hämatopoietischen und nicht-hämatopoietischen Zellen DNaseI hypersensitive DNA-Bereiche auch im ersten Intron identifiziert wurden (Abbildung 4), wurde bei der Suche nach Hypoxie-induzierbaren DNA-Bereichen als nächstes auf diesen Bereich fokussiert.^{9, 132} Eine erste Sequenzanalyse ergab, dass der intronische Bereich mehrere *Core*-Konsensus-Sequenzen des HRE enthält. Daher wurden das erste Intron (+261 bis +1240) des *EpoR* Genlocus aus genomischer HL-1 DNA amplifiziert und in den pGL3 *promoter*-Vektor kloniert. Dieses Plasmid enthält einen minimalen SV40-Promotor und eignet sich daher gut zur Analyse von DNA-Elementen, welche selbst keine Promotoraktivität vermitteln. Das Konstrukt wurde anschließend in Reporteranalysen unter Normoxie und Hypoxie getestet. Dieses Experiment zeigte, dass die Luciferaseaktivität des Konstrukts unter Hypoxie signifikant gesteigert wird und folglich Hypoxie-relevante DNA-Bereiche enthält (Daten ebenfalls nicht gezeigt). Daher wurden im Folgenden Mutationsanalysen durchgeführt, um die entsprechenden regulatorischen DNA-Motive innerhalb des Introns zu identifizieren.

4.2.2.4. Vergleichende Sequenzanalyse des ersten Introns vom *EpoR* Gen

Da regulatorische DNA-Sequenzen zwischen einzelnen Spezies oft konserviert sind, war es das Ziel der vergleichenden Sequenzanalyse, die potentiell regulatorischen DNA-Bereiche und Motive im ersten Intron des *EpoR* Gens näher einzugrenzen. Hierfür wurden die Sequenzen des murinen und humanen *EpoR* Introns mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verglichen (Abbildung 20).

	ETS (nt +874/+876)	GC-Box (nt +883/+889)	HRE (nt +893/+896)	GATA (nt +905/+908)
murin +871	GGAGGAGGAAGGG-	GGCGGGGGAC	CACGGTTGGCGC	TATCGGG
human +694	GGTGGAGGGAGGGAG	GGCGGGGGG	CACGGTTGGCGC	TATCGGT
			GATA (+937/+940)	
murin	GGACAGCCGGGTGCCTGCGGGAACC	GATAGGAGGCCGAGTTC		
human	TG---GCGGGGAGCCTGCCGGGGCC	GATAGGGGGCCCGCCTC		
		CACCC-Motiv (+ 968/+972)		
murin	TCTGCGCTCACACA	CACCCGC	+974	
human	TCCGCACA	CACCCCCAGCCGC	+795	

Abbildung 20. Konservierte DNA-Bereiche im ersten Intron des murinen und humanen *EpoR* Gens. Der konservierte DNA-Bereich erstreckt sich im murinen *EpoR* Intron über 104 bp (von +871 bis +974), beim Menschen über 102 bp (von +694 bis +795). Die potentiellen Bindungsmotive sind rot markiert; die Zahlen geben deren Position relativ zum Transkriptionsstart wieder.

Die Analyse ergab, dass sich innerhalb des ersten Introns ein konservierter Bereich befindet, welcher teilweise dem in hämatopoietischen Zellen identifizierten DNaseI hypersensitiven Enhancer entspricht.¹³² Zu den potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen, welche in diesem Zusammenhang beschrieben wurden, gehören zwei GATA-Boxen (+905/+908 und +937/+940), ein ETS-Motiv (+874/+876), eine GC-Box (+883/+889) und ein CACCC-Motiv (+ 968/+972).¹³² Der homologe Bereich umfasst diese bereits charakterisierten Motive. Ferner befindet sich interessanterweise ein konserviertes *hypoxia response element* (HRE) zwischen der GC- und GATA-Box.

4.2.2.5. Funktionelle Relevanz der intronischen DNA-Motive für die hypoxische Induktion der *EpoR* Expression

Ziel war es nun, die funktionelle Relevanz der homologen DNA-Motive nachzuweisen. Dafür wurden die in Abbildung 20 A dargestellten GATA-Boxen, das HRE, das ETS-Motiv sowie die GC-Box durch ortsgerichtete Mutagenese substituiert. Die aus der Mutagenese resultierenden Plasmide (Abbildung 21 A) wurden analog zu den vorhergehenden Reporterassays transfiziert; anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Die Ergebnisse der Reporterassays sind in

Abbildung 21 B dargestellt. Die Luziferaseaktivität des unmutierten *mEpoR*-Intron1 Konstrukts unter Normoxie wurde gleich 100% gesetzt.

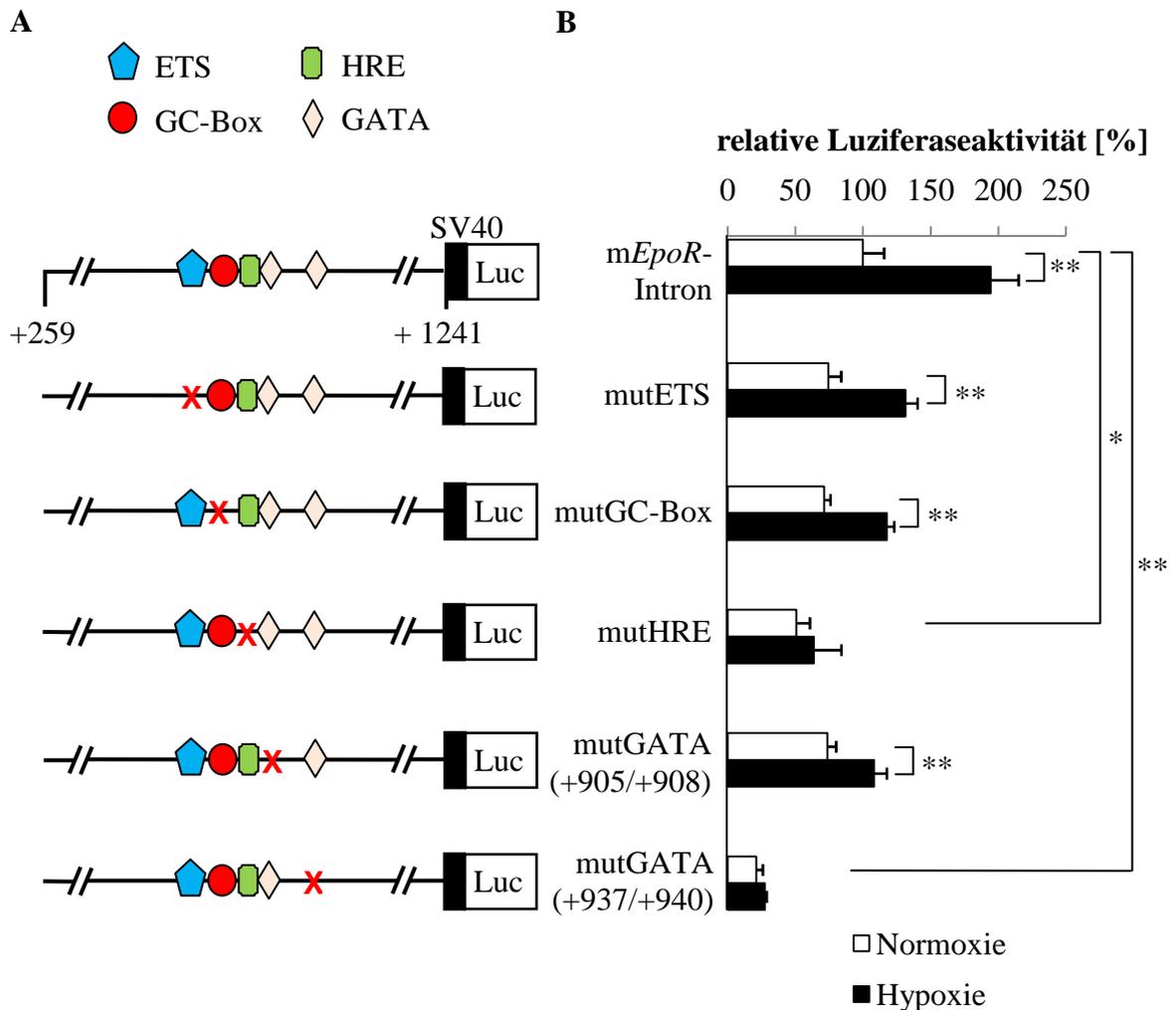


Abbildung 21. Mutationsanalysen des *EpoR* Introns unter Normoxie und Hypoxie. (A) Im ersten Intron des *EpoR* wurden potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren mutiert (mit einem roten Kreuz markiert). (B) HL-1 Kardiomyozyten wurden mit diesen Plasmiden transfiziert und für 24 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Die relativen Lichteinheiten der *firefly* Luziferase wurden gegen die jeweiligen *Renilla* Luziferaseaktivitäten und Proteinkonzentrationen abgeglichen (n = 3; **p < 0.01, *p < 0.05).

Die Luziferaseaktivität des Konstrukts *mEpoR*-Intron1 lässt sich unter Hypoxie signifikant auf das 2-fache ($\pm 16\%$; p < 0.01) stimulieren. Durch die Mutationen des ETS-Motivs oder der GC-Box sinken unter Normoxie die Luziferaseaktivitäten moderat, aber nicht signifikant auf $74.5 \pm 9.4\%$ beziehungsweise $71.3 \pm 4.7\%$. Unter Hypoxie lässt sich

die Luziferaseaktivität beider Konstrukte jedoch signifikant auf $131.4 \pm 8.9\%$ und $117.7 \pm 5.4\%$ steigern ($p < 0.001$). Im Gegensatz dazu führt die Mutation des *hypoxia response elements* unter Normoxie zu einer signifikanten Reduktion der Luziferaseaktivität auf $51 \pm 9.8\%$ ($p < 0.05$). Ferner sind die Luziferaseaktivitäten des Konstrukts mit mutiertem HRE unter Normoxie und Hypoxie ähnlich. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das HRE für eine Induktion des intronischen Enhancer-Elements unter Hypoxie essentiell ist. Die Mutation der GATA-Box +905/+908 führte unter Normoxie zu einer moderaten, jedoch nicht signifikanten Reduktion der Luziferaseaktivität auf $73.8 \pm 6.3\%$. Unter hypoxischen Bedingungen lässt sich die Luziferaseaktivität des Konstrukts nicht relevant stimulieren ($108.3 \pm 9.3\%$). Durch die Mutation der weiter *downstream* liegenden GATA-Box (+937/+940) nahm die Luziferaseaktivität bereits unter Normoxie signifikant auf $21.2 \pm 4.7\%$ ab ($p < 0.01$). Ähnlich wie bei der Mutation des HRE konnte auch hier das mutierte Konstrukt durch Hypoxie nicht stimuliert werden.

Die Ergebnisse der Reporterassays zeigen, dass vor allem das HRE sowie eine der beiden GATA-Boxen (+937/+940) sowohl für das Transaktivierungspotential unter Normoxie als auch für die Induktion des *EpoR* Gens unter Hypoxie relevant sind.

4.3. Untersuchungen zur myokardialen *Epo* Genregulation

Im Kontext der kardioprotektiven Effekte von ESA ist - neben der *EpoR* Biologie - das Verständnis der Genregulation von endogenem *Epo* von großer Bedeutung. Bislang publizierte Daten zur *Epo* Expression in Kardiomyozyten sind allerdings zum Teil widersprüchlich: Während im humanen embryonalen Herzen geringe *Epo* mRNA-Level detektiert wurden, gibt es keine Hinweise für eine signifikante *Epo* Expression in adulten Kardiomyozyten.⁸ Demgegenüber konnten in tierexperimentellen Studien die *Epo* mRNA-Expression in Infarktarealen, und mittels ELISA ein deutlich erhöhtes *Epo* Proteinlevel in hypoxie-konditioniertem Herzgewebe nachgewiesen werden.^{89, 90} Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb auch die myokardiale *Epo* Expression evaluiert.

Das Genexpressionsprofil in Abbildung 11 zeigt, dass *Epo* Transkripte weder während der embryonalen Entwicklungsstadien E13 und E18, noch postnatal am Tag P1 und im adulten Herz nachgewiesen werden konnten. Auch in HL-1 Zellen ließ sich keine *Epo* mRNA detektieren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass unter normoxischen Bedingungen keine wesentliche Expression des *Epo* Gens in Kardiomyozyten erfolgt.

4.3.1. Einfluss von Gata-Transkriptionsfaktoren auf die *Epo* Expression

In vitro und *in vivo* Studien zeigen, dass Gata2 und Gata3 in Hepatozyten beziehungsweise in der murinen Niere die Expression des *Epo* Gens reprimieren.²⁵³⁻²⁵⁵ Im Gegensatz dazu aktivieren GATA4 und Wt1(-KTS) die *Epo* Expression in der fetalen Leber.^{193, 256, 257} Da Gata4 in Kardiomyozyten vorhanden ist, war es Ziel, die Rolle der Gata-Transkriptionsfaktoren, insbesondere von Gata4, für die *Epo* Genregulation in HL-1 Kardiomyozyten zu untersuchen.

Zunächst wurden die *Gata4 knockout* Proben (siehe 4.1.6.) mittels quantitativer Real-time PCR hinsichtlich ihrer endogenen *Epo* Expression untersucht (Abbildung 22).

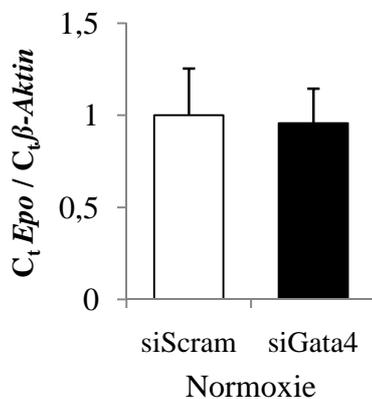


Abbildung 22. Einfluss einer Gata4 Suppression auf die endogene *Epo* Expression in HL-1 Kardiomyozyten. HL-1 Zellen wurden mit *Gata4* siRNA Duplexen transfiziert. Effekte auf die endogene *Epo* Expression wurden mittels quantitativer Real-time PCR analysiert. Die *Epo* Werte wurden mit β -Aktin abgeglichen (n = 3).

Diese Untersuchung ergab, dass Gata4 keinen Einfluss auf die endogene *Epo* Expression unter Normoxie besitzt. Generell gilt für Untersuchungen der *Epo* mRNA mittels Real-time PCR, dass der Schwellenwert-Zyklus (C_t) hier relativ hoch liegt (ca. 30-36 Zyklen), was darauf schließen lässt, dass verhältnismäßig wenig Transkripte in den Zellen vorliegen.

Im folgenden Experiment sollte der Effekt aller in den HL-1 Zellen exprimierten Gata-Transkriptionsfaktoren auf die endogene *Epo* Expression analysiert werden. Wie in Abbildung 11 gezeigt, exprimiert diese Zelllinie neben Gata4 auch Gata5 und Gata6. Des Weiteren wird Gata2, und zu einem geringen Ausmaß Gata3, exprimiert. Für diese Analysen wurden die HL-1 Zellen für 2 Stunden mit dem Gata-Inhibitor K7174 in einer Konzentration von 20 μ M inkubiert und anschließend für 24 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. K7174 ist ein Inhibitor, der die Bindung von Gata-Transkriptionsfaktoren an die GATA-Box hemmt.²⁵⁸ Die Quantifizierung der *Epo* mRNA ist in Abbildung 23 A abgebildet.

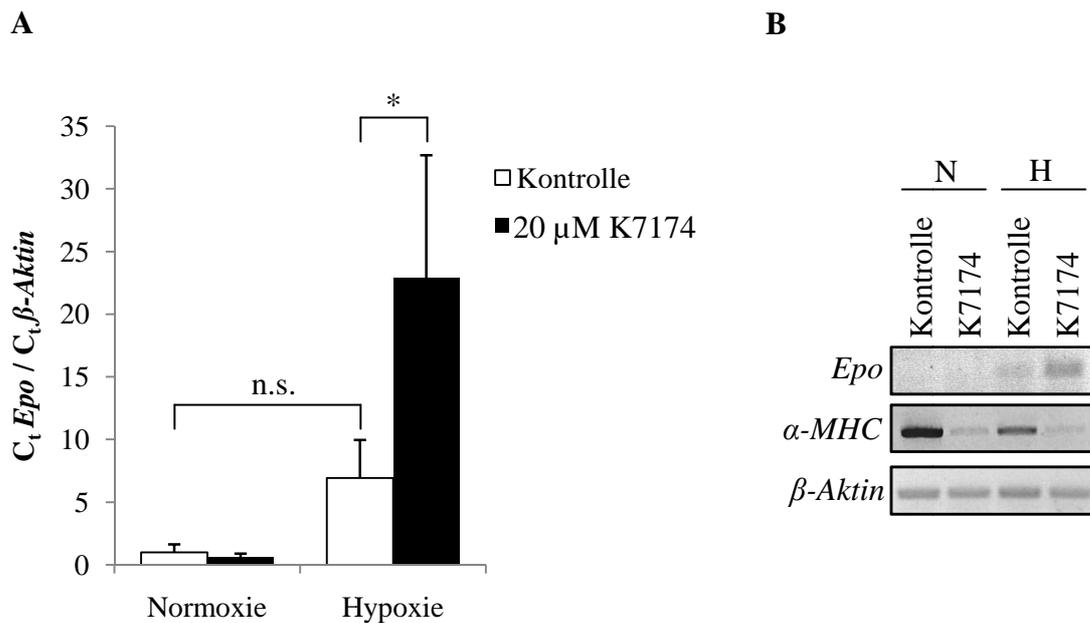


Abbildung 23. Einfluss des Gata-Inhibitors K7174 auf die *Epo* Expression unter Normoxie und Hypoxie. HL-1 Zellen wurden mit K7174 behandelt und weitere 24 Stunden unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) kultiviert. (A) Effekte auf die endogene *Epo* Expression wurden mittels quantitativer Real-time PCR analysiert. *Epo* Werte wurden mit β -Aktin abgeglichen. (n = 5; *p < 0.05; n.s. nicht signifikant). (B) Bestätigung der *Epo* Real-time PCR mittels RT-PCR (33 Zyklen). Als Positivkontrolle für die K7174 Behandlung diente die α -MHC Expression. β -Aktin diente als PCR-Ladekontrolle. Die Fotografien der Agarosegele wurden zur besseren Visualisierung invertiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass in unbehandelten HL-1 Zellen die *Epo* Expression unter Hypoxie um das 7-fache (± 2.9) zunahm. Durch die Zugabe des Inhibitors K7174 änderte sich die *Epo* Expression unter normoxischen Bedingungen nicht (Abbildung 23 A). Unter Hypoxie jedoch, stieg das *Epo* mRNA-Level um das 23-fache signifikant an (± 9.5 ; p < 0.05). Die additiven Effekte des Gata-Inhibitors unter hypoxischen Bedingungen könnten darauf hinweisen, dass Gata-Transkriptionsfaktoren die hypoxische Induktion der *Epo* Expression in Kardiomyozyten inhibieren. Des Weiteren wurde die quantitative *Epo* Real-time PCR durch eine konventionelle PCR bestätigt. Das Gata4 Zielgen α -MHC diente als Positivkontrolle für die K7174-Behandlung der Zellen (Abbildung 23 B).

4.3.2. Einfluss von DNA-Methylierung auf die kardiale *Epo* Expression

Einige Studien weisen darauf hin, dass die Repression des *Epo* Genlocus durch DNA-Methylierung vermittelt wird. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in nicht *Epo*-produzierenden HeLa-Zellen einzelne CpG-Motive im Promotor und alle CpG-Motive in der 5' UTR methyliert sind, während in *Epo*-exprimierenden Hep3B Zellen die DNA ausschließlich unmethyliert vorlag.²⁵⁹ Des Weiteren scheint die Induktion des *Epo* Gens unter Hypoxie von einem unmethylierten HRE abhängig zu sein.^{260, 261} Ziel der nachfolgenden Experimente war es deshalb, den Einfluss der DNA-Methylierung auf die kardiale *Epo* Genregulation zu untersuchen. Hierfür wurden zunächst HL-1 Kardiomyozyten für 48 Stunden mit 5-Aza-2-Deoxycytidin (Aza) in einer Konzentration von 2.5 μ M kultiviert. Diese Cytidin-ähnliche Substanz wird während der Replikation in den neu synthetisierten DNA-Strang aufgenommen und hemmt Methylasen. Im Zuge der Proliferation kommt es dadurch zu einer Demethylierung der DNA. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert und die endogene *Epo* Expression quantifiziert (Abbildung 24).

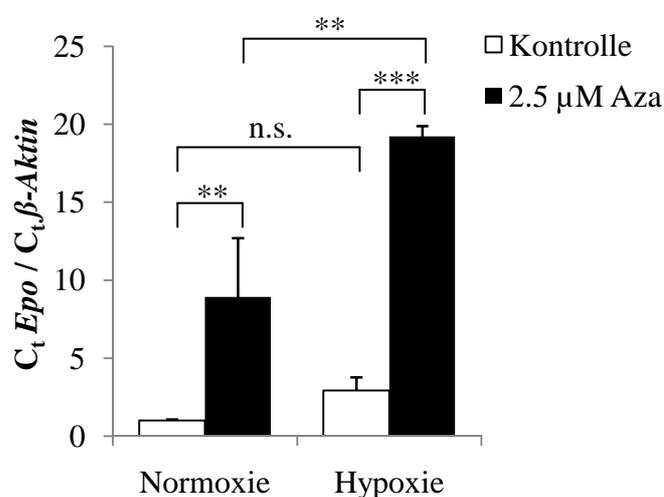


Abbildung 24. Einfluss von Demethylierung durch 5-Aza-2-Deoxycytidin (Aza) auf die endogene *Epo* Expression in HL-1 Zellen. HL-1 Zellen wurden 48 Stunden mit Aza behandelt und weitere 24 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Die Effekte auf die endogene *Epo* Expression wurden mittels Real-time PCR quantifiziert. *Epo* Werte wurden gegen β -Aktin abgeglichen. (n = 3; ***p < 0.001; **p < 0.01; n.s. nicht signifikant)

Die Ergebnisse in Abbildung 24 zeigen, dass Methylierung einen deutlichen Effekt auf die *Epo* Expression in HL-1 Kardiomyozyten hat: Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie stiegen die *Epo* mRNA-Level durch Demethylierung um das 8-fache (\pm 3.8; p < 0.01) beziehungsweise das 20-fache (\pm 0.7; p < 0.001) signifikant an.

Da sich aus den Ergebnissen schlussfolgern lässt, dass DNA-Methylierung für die Repression des *Epo* Gens in Kardiomyozyten von Bedeutung ist, wurden anschließend Bisulfitsequenzierungen des murinen *Epo* Genlocus in HL-1 Zellen und im primären Herzgewebe durchgeführt. Aufgrund von publizierten Daten wurde bei diesen Analysen auf den Promotor, die 5' UTR, sowie den Enhancer 3' des Stoppcodons fokussiert.²⁵⁹⁻²⁶¹ Abbildung 25 A zeigt einen Ausschnitt des *Epo* Genlocus von -271 bis +101 relativ zum Transkriptionsstart mit allen in diesem Bereich lokalisierten CpG-Motiven.

A

```

-271      GACCCAGGTGGCCCCACCTCTGGCGACCCCTCACGCACACACAGCTTCACCCCCACCCC
          1      2
-210      CACC345CACGCACGCACACATGCTGATAACATCCC678CGGAGCCACAGTGTCCCGGGACC
          10      11 12      13 14
-143      AACCTGGCCGGTGGCTGTGTCTCACTGTGTTCGAAACGGACCCTTGGCCAGGGCCACCGCGTCCC
          15 16
-76      CACTCTGCCCGGCCCCCTGGACAGTGACCACTTTCTTCCAGGCTAGTGGGGTGATCTGGCCCTACA
          17      18 19      20
-9      GAACTTCCAAGGATGAAGACTTGCAGCGTGGACACTGGCCAGCCCCGGGTCTGCTAAGGAGCTCCGG
          21 22      23
+59      CAGCTAGGCCGCGGAGATGGGGGTGCCCGGTGAGTACTCACAGG
  
```

B

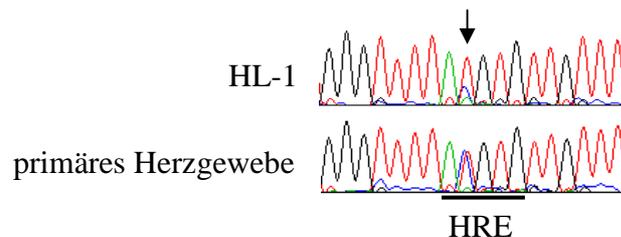


Abbildung 25. Methylierungsanalysen des murinen *Epo* Genlocus. (A) Sequenz des *Epo* Genlocus von -271 bis +101 relativ zum Transkriptionsstart (mit einem Pfeil markiert). Die Gata-Box sowie das ATG Startcodon sind rot hervorgehoben, CpG-Motive sind grau hinterlegt. (B) Ausschnitte aus Chromatogrammen des 3' Enhancers (+3676 bis +3693 relativ zum Transkriptionsstart). Das HRE ist unterstrichen, das CpG-Motiv mit einem Pfeil markiert. Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz, Adenin: grün.

Sowohl in HL-1 Zellen als auch in primärem Herzgewebe sind die CpG-Motive 20-23 überwiegend methyliert. Demgegenüber erschienen im Herzgewebe alle anderen CpG-

Motive des Promotors und der 5' UTR weitestgehend unmethyliert, während diese in den HL-1 Zellen methyliert waren. Schließlich wurde der Methylierungsstatus des HRE im 3' Enhancer analysiert (Abbildung 25 B). Im primären Gewebe lag eine Hemimethylierung des CpG-Motivs vor. In HL-1 Zellen dagegen, war das Motiv unmethyliert; dieser Befund ist kongruent mit der hypoxischen Induktion der *Epo* Expression in HL-1 Zellen.

5. Diskussion

Die molekularen Mechanismen der Regulation des *EpoR* Gens in hämatopoietischen Vorläuferzellen und neuronalen Zellen sind nur teilweise charakterisiert. Es ist bekannt, dass der *EpoR* Promotor in linienspezifischen erythrozytären Vorläuferzellen (BFU-E und CFU-E) durch den hämatopoietischen Transkriptionsfaktor Gata1 und den ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktor Sp1 aktiviert wird.^{1, 7, 123} Zudem wurde in frühen hämatopoietischen Vorläuferzellen (CD117+) die transkriptionell aktive Spleißvariante des Tumorsuppressors Wt1(-KTS) als positiver Regulator identifiziert.¹²⁷ Der *EpoR* wird aber auch in nicht-hämatopoietischen Geweben, unter anderen im zentralen Nervensystem und dem Herz exprimiert, wo er zahlreiche neuro- beziehungsweise kardioprotektive Effekte von rEpo/ESA vermittelt. Während in der neuronalen Tumorzelllinie NT2 GATA3 und Sp1 als positive Regulatoren des *EpoR* Gens identifiziert wurden, führte eine Überexpression oder ein *knockdown* von GATA2, -3 oder -4 zu keiner Änderung der *EpoR* mRNA-Level.^{44, 133} Da die Transkriptionsfaktoren Gata1, Gata2, Gata3 und Wt1 nicht von Kardiomyozyten exprimiert werden, stellte sich die Frage, über welchen Mechanismus die *EpoR* Expression im Herzen reguliert wird. Ziel der Arbeit war es deshalb, die molekularen Mechanismen der basalen transkriptionellen Aktivierung des *EpoR* Gens in Kardiomyozyten zu identifizieren. Weiterhin sollte die Modulation in der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie sowie unter Hypoxie untersucht werden.

5.1. Transkriptionelle Aktivierung des *EpoR* Promotors in Kardiomyozyten durch Gata4 und Sp1

Als *in vitro* Modell wurden murine HL-1 Kardiomyozyten gewählt. Obwohl diese Zelllinie von der atrialen Tumorzelllinie AT-1 abgeleitet wurde, hat sie die morphologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Merkmale von Kardiomyozyten beibehalten.^{232, 233} Darüber hinaus besitzen HL-1 Zellen ein sehr ähnliches Genexpressionsprofil wie primäre Kardiomyozyten (persönliche Information von Dr. Silke Sperling, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin), zeichnen sich aber durch eine relativ gute Transfizierbarkeit aus. Auch im Rahmen dieser Studie wurden Expressionsanalysen der potentiell *EpoR* regulierenden Transkriptionsfaktoren im Herzgewebe durchgeführt und diese mit dem Expressionsprofil von HL-1 Kardiomyozyten verglichen (Abbildung 11). Die Analyse zeigte, dass *EpoR*, *Gata4*, *Gata6*, *Fog2* und *Sp1* mRNA sowohl in den HL-1 Zellen, als

auch in allen Entwicklungsstadien des murinen Herzens exprimiert wird. Für den Transkriptionsfaktor *Gata4* wurde in der Literatur beschrieben, dass dieser in Mausembryonen erstmals ab einem Stadium E7.0 detektiert werden kann und während der weiteren Kardiogenese und postnatal im Endo- und Myokard exprimiert wird.¹⁶⁹ Für *Gata6* wurde ein ähnliches Expressionsprofil wie für *Gata4* beschrieben; so konnte *Gata6* mRNA während der murinen Entwicklung zunächst im präkardialen Mesoderm, im Herzschlauch und im adulten Herzen nachgewiesen werden.^{162, 171-173, 176} Die Expressionsanalysen des Gata-Kofaktors *Fog2* deckt sich ebenfalls mit der Literatur.²⁴¹ Auffällig in den eigenen Analysen ist die Expression von *Gata5* in den HL-1 Zellen. *Gata5* wird laut Literatur zunächst im präkardialen Mesoderm, ab einem Entwicklungsstadium E12.5 nur noch im Myokard und während der späteren fetalen Entwicklung sowie im adulten Herzen überhaupt nicht mehr exprimiert wird.¹⁶³ Da allerdings die Expression des *EpoR* Gens mit der Expression der Transkriptionsfaktoren *Sp1*, *Gata4* und *Gata6*, nicht aber mit der Expression von *Gata5* koinzidiert, hat dieser Befund für die eigenen Experimente keine Relevanz.

Im Rahmen dieser Studie wurden *Gata4* und *Sp1* als positive Regulatoren für die basale transkriptionelle Aktivierung des *EpoR* Promotors unter Normoxie identifiziert. Diese Schlussfolgerung wird durch zahlreiche Daten unterstützt. Zum einen wurden mittels Reporterassays in HL-1 Kardiomyozyten DNA-Bereiche im proximalen Promotor des *EpoR* Genlocus identifiziert, welche eine transkriptionelle Aktivierung vermitteln. Durch Mutationen einzelner Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wurden die GATA-Box, vor allem aber die GC-Box als essentielle Motive identifiziert (Abbildung 9 und 10). Zum anderen belegen *in vitro* und *in vivo* Bindungsstudien (EMSA- und ChIP-Experimente) eine Bindung beider Faktoren an den murinen *EpoR* Promotor (Abbildung 12 und 13). Interessanterweise wird *in vitro* durch die Zugabe eines *Gata4* Antikörpers auch die *Sp1* Bindung an die GC-Box aufgehoben (Abbildung 12). Dies legt nahe, dass beide Faktoren nicht nur funktionell, sondern auch physikalisch miteinander interagieren. Die Interaktion zwischen *Gata4* und dem N-terminalen Zinkfinger von *Sp1* wurde bereits am Beispiel der *P450c17*-Genregulation nachgewiesen.²⁶² Darüber hinaus scheint die Interaktion mit *Sp1* ein generelles Charakteristikum der Gata-Transkriptionsfaktoren zu sein, denn auch für *Gata1*, *Gata2*, *Gata3* und *Gata6* wurden physikalische Interaktionen mit *Sp1* gezeigt, und für *Gata5* und *Sp1* konnte zumindest eine funktionelle Wechselwirkung nachgewiesen

werden.²⁶²⁻²⁶⁴ Als Sp1 Interaktionsdomäne konnte beispielsweise für Gata1 der C-terminale Zinkfinger identifiziert werden.²⁶³

Weiterhin zeigen *knockdown* Experimente mit *Gata4* siRNA Duplexen und *Sp1* shRNA Expressionsvektoren, dass die Suppression der jeweiligen Transkriptionsfaktoren in HL-1 Kardiomyozyten eine signifikante Abnahme der *EpoR* mRNA zur Folge hat (Abbildung 15).²³¹ Dies beweist, dass beide Faktoren für die transkriptionelle Aktivierung des *EpoR* Promotors in Kardiomyozyten essentiell sind. Dieses Ergebnis steht scheinbar im Widerspruch zu den Reporteranalysen, in denen eine Mutation der GATA-Box nur einen moderaten, aber nicht signifikanten Rückgang der Luziferaseaktivität bewirkte (Abbildung 10). Dies könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, dass Gata4 sein Transaktivierungspotential hauptsächlich über die Bindung an Sp1 entfaltet. In diesem Fall würde die Interaktion von Gata4 und Sp1 durch die räumliche Nähe des GATA-Motivs zur GC-Box begünstigt. Das Vorhandensein einer intakten GATA-Box ist jedoch nicht Grundvoraussetzung für die Kooperativität beider Faktoren. Dies wird durch die Reporterassays deutlich, in denen die Mutation der GC-Box eine deutlichere Auswirkung auf die Luziferaseaktivität hat als die Mutation des GATA-Motivs (Abbildung 10). Ein solches Phänomen konnte ebenfalls in SL2-Zellen (Schneider-2 Zellen aus *Drosophila*) beobachtet werden, wo trotz fehlender GATA-Box Sp1 noch in der Lage ist, Gata1 zu rekrutieren. Für die transkriptionelle Kooperativität beider Transkriptionsfaktoren scheint zudem der Abstand ihrer DNA-Motive ausschlaggebend zu sein. Meist sind beide Motive ca. 20 bp (das entspricht 2 Drehungen der DNA-Helix) voneinander entfernt, so dass beide Transkriptionsfaktoren auf einer Seite der DNA-Helix binden können und in räumliche Nähe zueinander gelangen.²⁶³ Auch bei der transkriptionellen Aktivierung des *P450c17*-Promotors interagieren Gata4 oder Gata6 mit Sp1 an der GC-Box.²⁶²

Weiterhin wurden Gata4, Gata6 und Sp1 einzeln oder in Kombination in HL-1 Kardiomyozyten überexprimiert. Hier führte nur die ektopische Expression von Gata4 zu einem signifikanten Anstieg der *EpoR* mRNA Level (Abbildung 14). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Sp1 als ubiquitärer Transkriptionsfaktor in HL-1 Zellen relativ stark exprimiert wird und mit hoher Affinität an die GC-Box des proximalen Promotors bindet. Eine ektopische Expression von Sp1 hat in diesem Fall keine zunehmende transkriptionelle Aktivierung des Promotors zur Folge. Im Gegensatz dazu ist es möglich, dass eine Überexpression von Gata4 zu einer verstärkten Rekrutierung an Sp1 und damit zu einer erhöhten Transkription führt.

Gata4, Gata5 und Gata6 sind während der Kardiogenese, insbesondere der Spezifikation des Myokards sowie der Differenzierung zu Kardiomyozyten sich teilweise substituierende Transkriptionsfaktoren.^{246, 247} Dennoch wurden Promotoren identifiziert, welche Gata4 oder Gata6 mit unterschiedlicher Affinität binden: während zum Beispiel die Promotoren von α -MHC und β -MHC vorwiegend über Gata4 reguliert werden, können die Promotoren von ANP und BNP in gleichem Maße von Gata4 oder Gata6 aktiviert werden.¹⁷⁴ Der *EpoR* Promotor wird offensichtlich nur durch Gata4, nicht aber durch Gata5 oder Gata6, aktiviert. Diese Schlussfolgerung wird durch mehrere Ergebnisse gestützt: weder *in vitro* noch in intakten Kardiomyozyten konnte eine Bindung von Gata6 an den *EpoR* Promotor nachgewiesen werden (Abbildung 12 und 13). Außerdem nahm das *EpoR* mRNA-Level in *Gata4 knockdown* Experimenten signifikant ab (Abbildung 15). Da HL-1 Zellen aber sowohl *Gata5* als auch *Gata6* exprimieren (Abbildung 11), kann man davon ausgehen, dass diese Transkriptionsfaktoren den *Gata4 knockdown* nicht kompensieren. Dieser Sachverhalt wurde durch die Analyse transgener Mäuse mit induzierbarer *Gata4 short hairpin* RNA (Abbildung 16) und im *in vivo* Modell der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie (Abbildung 17) bestätigt. In beiden Fällen korreliert die *EpoR* mRNA mit den Gata4, nicht aber mit Gata6 Proteinkonzentrationen.

Der *EpoR* Promotor enthält keine klassischen Motive zur Transkriptionsinitiation wie zum Beispiel eine TATA- oder CAAT-Box.¹ In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde in EMSA-Experimenten bislang auch keine direkte Interaktion des Promotors mit TFIID (Transkriptionsfaktor II D) gefunden.¹²¹ Dieser Proteinkomplex bildet zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren den RNA-Polymerase II Präinitiationskomplex und besteht aus TBP (TATA *binding protein*) und verschiedenen TAF's (TBP *associated factors*). An TATA-losen Promotoren übernimmt in den meisten Fällen das Initiator (INR)-Element die Positionierung des TFIID. Die Konsensus-Sequenz dieses Elements ist Py₂CAPy₅. Sie liegt in einer Region von etwa -3 bis +5 bp um die Transkriptionsstartstelle und wird von verschiedenen TAF's erkannt.^{265, 266} Der Transkriptionsstart des *EpoR* Gens enthält keine solche INR-Sequenz. Hier könnte Sp1 für die Rekrutierung des TFIID-Proteinkomplexes sowie für die Stimulation der Transkriptionsinitiation verantwortlich sein, denn eine Interaktion von Sp1 mit TBP sowie TAF4 und TAF7 wurde bereits nachgewiesen.²⁶⁷⁻²⁷³

5.2. Weitere an der kardialen *EpoR* Regulation beteiligte Transkriptionsfaktoren

Zahlreiche Studien zeigen, dass Gata4 an den meisten Zielgenen seine transkriptionelle Aktivierung nicht allein, sondern in Kombination mit Kofaktoren oder weiteren Transkriptionsfaktoren vermittelt. Tabelle 26 zeigt eine Zusammenfassung der Interaktionspartner von Gata4 sowie deren Zielgene in Kardiomyozyten.

Tabelle 26. Gata4 Kofaktoren und Interaktionspartner sowie ihre kardialen Zielgene. Aufgelistet sind Gata4 Kofaktoren und Transkriptionsfaktoren, die zusammen mit Gata4 die Promotoren der Zielgene aktivieren (+) oder supprimieren (-). Zusätzlich sind die Gata4 Domänen angegeben, welche mit den entsprechenden Proteinen interagieren.

Kofaktor	Interaktionsdomäne von Gata4	Zielgen
AP-1 (<i>activator protein 1</i>)	nicht bekannt	+ <i>AT1aR</i> ²²⁸
CBP (<i>CREB binding protein</i>)	C-terminaler Zinkfinger	+ <i>BNP</i> ²²²
c-Fos (<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>)	N-terminale Aktivierungsdomäne	+ <i>ANP</i> ²⁷⁴
dHAND (<i>Heart- and neural crest derivatives-expressed protein</i>)	C-terminaler Zinkfinger	+ <i>ANP</i> ²³⁶ , + <i>BNP</i> ²³⁶ , + α - <i>MHC</i> ²³⁶
Fog2 (<i>friend-of-gata 2</i>)	N-terminaler Zinkfinger, Aminosäure 217 (Valin)	- <i>ANP</i> ²⁴¹ , - <i>BNP</i> ²⁴¹ , - α - <i>MHC</i> ²⁴¹
Gata6	N- und C-terminaler Zinkfinger und angrenzende basische Domäne	+ <i>ANP</i> ¹⁷⁴ + <i>BNP</i> ¹⁷⁴
KLF13 (<i>kruempel-like factor 13</i>)	N-terminaler Zinkfinger	+ <i>ANP</i> ¹³⁰ , + <i>BNP</i> ¹³⁰ , + β - <i>MHC</i> ²⁷⁵ , + α <i>CA</i> ¹³⁰
Mef2 (<i>myocyte enhancer factor 2</i>)	C-terminaler Zinkfinger und angrenzende basische Domäne	+ <i>ANP</i> ²⁷⁶ , + <i>BNP</i> ²⁷⁶ , + α - <i>MHC</i> ²⁷⁶
NFAT3 (<i>nuclear factor of activated T-cells</i>)	C-terminaler Zinkfinger	+ <i>BNP</i> ²⁷⁷
NFATc4 (<i>nuclear factor of activated T-cells</i>)	C-terminaler Zinkfinger	+ <i>BNP</i> ²⁷⁷
Nkx2.5	C-terminaler Zinkfinger	+ <i>ANP</i> ²³⁸ , + <i>BNP</i> ²²³ , + α <i>CA</i> ²⁷⁸
p300	C-terminaler Zinkfinger	+ <i>ANP</i> ²⁰⁹ + β - <i>MHC</i> ²⁰⁹
RxRa (<i>retinoid x receptor α</i>)	C-terminaler Zinkfinger und angrenzende C-terminale Domäne	- <i>ANP</i> ²⁷⁹
Smad1/4 (<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>)	C-terminaler Zinkfinger und angrenzende basische Domäne	+ <i>Nkx2.5</i> ²⁸⁰

SRF (<i>serum response factor</i>)	C-terminaler Zinkfinger und angrenzende basische Domäne	+ <i>BNP</i> ²⁸¹
Tbx5 (<i>T-box transcription factor</i>)	N-terminale basische Domäne, Aminosäure 296 (Glycin)	+ <i>ANP</i> ¹⁸³
YY1 (Yin Yang 1)	C-terminaler Zinkfinger	+ <i>BNP</i> ²²²

Abkürzungen: ANP, *atrial natriuretic peptide*; AT1 α R, Angiotensin 1 α -Rezeptor; BNP, *B-type natriuretic peptide*; α CA, *cardiac actin α* ; α/β -MHC, *α/β myosin heavy chain*

Wie in Tabelle 26 dargestellt, besitzt Gata4 in Kardiomyozyten ein breites Spektrum an Interaktionspartnern. So kann das Protein beispielsweise mit den Histonacetyltransferasen CBP und p300, mit herzspezifischen Transkriptionsfaktoren wie KLF13, Nkx2.5 und Tbx5, mit ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktoren wie YY1 oder dem Gata-spezifischen Kofaktor Fog2 interagieren.

In der eigenen Studie wurden bei den ChIP-Analysen (Chromatinimmunopräzipitation) verschiedene Antikörper genutzt, um einige dieser Faktoren auf die Bindung ihrer Zielproteine am *EpoR* Promotor zu überprüfen. Zusätzlich zu Sp1 und Gata4 konnte in dieser Analyse die Bindung der folgenden Transkriptionsfaktoren beziehungsweise Koaktivatoren an den *EpoR* Promotor nachgewiesen werden: YY1, p300, Nkx2.5, USF1 und USF2 (Abbildung 13).

YY1 (Yin Yang 1) ist ein ubiquitär exprimiertes Zinkfingerprotein mit vier klassischen Cys₂-His₂ Zinkfingern, welches in der Lage ist, über seinen C-Terminus als Aktivator oder seinen N-Terminus als Repressor zu agieren. YY1 bindet an ein -CCAT-core-Motiv, von dem sich auch einige im minimalen Promotor des *EpoR* Gens befinden (Abbildung 9 A).²⁸² Das später identifizierte YY2 weist vor allem im DNA-bindenden C-terminalen Zinkfinger eine starke Homologie zu YY1 auf, so dass beide Transkriptionsfaktoren an das gleiche DNA-Motiv binden.^{283, 284} Da zum Zeitpunkt der Durchführung der ChIP-Analysen kein YY2 Antikörper kommerziell verfügbar war, wurde das Experiment mit einem YY1 Antikörper durchgeführt. In unserem Labor durchgeführte EMSA-Analysen weisen jedoch darauf hin, dass dieser YY1 Antikörper mit YY2 kreuzreaktiv ist (persönliche Mitteilung von Dr. Martin Klar). Eine genauere Verifizierung, ob am murinen *EpoR* Promotor YY1 oder YY2 beziehungsweise beide Faktoren kompetitiv binden, ist deshalb notwendig. Obwohl eine Bindung von YY Faktoren *in vivo* eindeutig nachgewiesen wurde, zeigten Mutationen der YY-core-Motive im Reporterassay keine Veränderungen der Luziferaseaktivität (Abbildung 10). Dies könnte auf eine Koopera-

tivität der DNA-bindenden Faktoren hinweisen, so dass die Komplexbildung auch bei mutierten YY-*core*-Motiven noch möglich ist. Es wurde bereits gezeigt, dass YY1 sein Transaktivierungspotential beispielsweise auch über eine physikalische Interaktion mit Sp1 an der GC-Box, ohne das Vorhandensein eines YY-Motivs, vermitteln kann.²⁸⁵ Für YY2 konnte in unserem Labor ebenfalls eine direkte Interaktion mit Sp1 nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von Dipl.-Ing. David Drews und Dr. Martin Klar).

Eine RNA-Polymerase II vermittelte Transkription wird zu einem großem Teil auf der Ebene des Chromatins reguliert. Die Aktivität von Histonacetyltransferasen, welche die N-terminalen Domänen der Kernhistone acetylieren und das Chromatin damit für Transkriptionsfaktoren zugänglich machen, ist somit essentiell. Die Histonacetyltransferasen p300 und CBP (*CREB binding protein*) sind Paraloge, welche eine zentrale Rolle bei der Koordinierung und Integration vieler Signalkaskaden mit dem Transkriptionsapparat spielen. Darüber hinaus können sie eine Brückenfunktion zwischen der basalen Transkriptionsmaschinerie und weiter *upstream* bindenden Transkriptionsfaktoren übernehmen oder als *scaffold* für den Aufbau eines Multikomponentenkomplexes zur transkriptionellen Aktivierung dienen.²⁸⁶⁻²⁸⁸ Auch im Falle des *EpoR* Promotors könnte eine Brückenfunktion über Gata4 und weiter *upstream* bindende Transkriptionsfaktoren, in diesem Falle zum Beispiel USF1/USF2 oder YY1/YY2, möglich sein. Für den kardialen *BNP* Promotor wurde beispielsweise gezeigt, dass YY1 mit seiner DNA-Bindungsdomäne über CBP/p300 indirekt mit Gata4 interagiert und das *BNP* Gen synergistisch aktiviert.²²² Beide Proteine (p300 und CBP) besitzen jeweils mehrere hochkonservierte funktionelle Bereiche: drei Zinkfinger, eine CREB-Bindungsdomäne (KIX) und eine Bromodomäne zur Erkennung acetylierter Lysine. Die N- und C-terminalen Bereiche der Proteine dienen als Transaktivierungsdomänen während die intrinsische Acetyltransferaseaktivität von einer zentralen Region des Proteins vermittelt wird. Gata4 ist mit beiden Zinkfingern in der Lage über den C-terminalen Zinkfinger von p300 zu interagieren.²⁰⁹ Darüber hinaus wird Gata4 während der Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie durch p300 acetyliert, was eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität von Gata4 zur Folge hat.²⁰⁹ Eine Modulation der *EpoR* Regulation unter hypertrophen Stimuli kann deshalb nicht ausgeschlossen werden und sollte in geeigneten Modellen analysiert werden.

Die Transkriptionsfaktoren USF1 und USF2 (*upstream stimulating factors*), welche im ChIP-Assay ebenfalls an den *EpoR* Promotor binden, sind ubiquitär exprimierte *basic-Helix-Loop-Helix* Leucin-Zipper, deren basische Domänen die E-Box mit der Konsensus-Sequenz -CANNTG- binden und die über ihre *Helix-Loop-Helix* und Leucin-Zipper-

Domänen Homo- oder Heterodimere ausbilden.²³⁴ USF Proteine sind an der transkriptionellen Aktivierung vieler Gene beteiligt und vermitteln ihr Aktivierungspotential über die Interaktion mit zahlreichen Kofaktoren sowie Faktoren des Transkriptionsinitiationskomplexes. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass USF-Dimere in der Lage sind mit Sp1 sowie TAF7 des TFIID zu interagieren.^{271, 289, 290} Dies könnte vor allem bei Promotoren ohne TATA-Box, wie dem *EpoR* Promotor, eine wesentliche Rolle spielen und zur Stabilisierung des Transkriptionsinitiationskomplexes beitragen. Darüber hinaus rekrutieren USF-Dimere verschiedene Acetylhistontransferasen und die DNA-Topoisomerase III, was ein Chromatin-remodelling sowie eine Modifikation der DNA-*supercoil*-Struktur zur Folge hat und damit die Genexpression wesentlich beeinflusst.^{291, 292}

Obwohl die Mutationen der Nkx2.5-Bindestellen im *EpoR* Promotor keine Änderungen der Luziferaseaktivität in HL-1 Zellen zur Folge hatten (Abbildung 10), wurde bei der ChIP-Analyse eine Nkx2.5 Bindung am *EpoR* Promotor nachgewiesen (Abbildung 13). Der evolutionär konservierte Homöobox-Transkriptionsfaktor Nkx2.5 ist ein gut charakterisierter Interaktionspartner von Gata4, der als Homo- oder Heterodimer mit anderen Nkx-Transkriptionsfaktoren an Zielsequenzen der DNA binden kann.^{223, 238, 278, 293, 294} Für die Interaktion mit Gata4 wurde ein Mechanismus postuliert, in welchem durch Bindung von Gata4 an die C-terminale Homöodomäne eine Konformationsänderung hervorgerufen wird, die eine Aktivierungsdomäne von Nkx2.5 freigibt.²²³ Interessanterweise ist diese Interaktion Gata4-spezifisch und initiiert während der Embryonalzeit die frühe Herzentwicklung.

Fog2 ist ein sehr gut charakterisierter Kofaktor von Gata4, der im Herz, aber auch in Gehirn und Hoden exprimiert wird, und dessen Interaktion mit Gata4 in Kardiomyozyten oft zu einer Repression der Zielgene (*α -MHC, ANP, BNP*) führt.^{241, 295} Im ChIP-Assay konnte keine Bindung von Fog2 an den *EpoR* Promotor detektiert werden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Epitope von Fog2 für den Antikörper im Protein-komplex nicht zugänglich waren. Zum anderen könnte dies konsistent sein mit der beschriebenen repressorischen Wirkung von Fog2. Diese ist auf eine Interaktion mit dem N-terminalen Zinkfinger von Gata4 zurückzuführen, welche die transkriptionelle Aktivität von Gata4 moduliert.^{242, 296} Als ein weiterer Mechanismus wurde die Konkurrenz von Fog2 mit Gata4 um seinen Koaktivator p300 beschrieben.²³⁷

Aus dem ChIP und den bereits bekannten Daten über die einzelnen Transkriptionsfaktoren und Histonacetyltransferasen beziehungsweise Koaktivatoren kann man mutmaßen, wie der Transkriptionsinitiationskomplex am kardialen *EpoR* Promotor aussehen

könnte: Dieser beinhaltet Gata4 und Sp1 als zentrale, an die DNA bindende Faktoren, was im Rahmen der Arbeit funktionell nachgewiesen wurde. Während Sp1 in der Lage ist RNA-Polymerasen zu rekrutieren, könnte Gata4 über p300 mit den weiter *upstream* bindenden Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise YY1/2 oder USF1/2 interagieren. Über einen solchen Mechanismus würde der Transkriptionsinitiationskomplex stabilisiert und die Effizienz der Transkriptionsinitiation erhöht.

5.3. Kardiale *EpoR* Regulation unter Hypoxie

In dieser Studie konnte ferner gezeigt werden, dass in HL-1 Kardiomyozyten die endogene *EpoR* Expression durch Hypoxie etwa um das 4-fach gesteigert wird (Abbildung 18). Dies ist konsistent mit veröffentlichten Daten, welche eine hypoxische Induktion des *EpoR* Gens in verschiedenen Geweben und Zelltypen, darunter endotheliale Vorläuferzellen und ausdifferenzierten Endothelien, primären Neuronen und die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y sowie unterschiedliche Tumorzelllinien zeigen.^{44, 133-137} Die Mechanismen, die zu einer gesteigerten Expression des *EpoR* Gens unter Hypoxie führen, sind bis jetzt nicht bekannt. Allerdings konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass - zumindest bei schwerer Hypoxie (1% Sauerstoff für 24 Stunden) - weder eine gesteigerte Expression der Transkriptionsfaktoren Gata4 und Sp1, noch eine Phosphorylierung von Gata4 an der Phosphorylierungsstelle Serin-105 für die Stimulation der *EpoR* Expression unter Hypoxie verantwortlich sind (Abbildung 18). Im Gegensatz dazu konnte bei Mäusen, die einer periodischen kurzen Hypoxie ausgesetzt wurden (5 Zyklen von 2 Minuten 10% Sauerstoff mit anschließenden 2 Minuten 21% Sauerstoff), eine Zunahme der kardialen *Gata4* mRNA beobachtet werden, was zu einer erhöhten *bcl-2* und *bcl-x* Expression führte.^{297, 298} Ferner wurde nachgewiesen, dass ischämische Konditionierung im isolierten Rattenherz die DNA-Bindungsaktivität von Gata4 durch Acetylierung erhöht, während Ischämie und anschließende Reperfusion ohne Konditionierung die *Gata4* Expression reduzierten.²⁹⁹

In dieser Arbeit konnte ein intronischer Enhancer als jener DNA-Bereich identifiziert werden, welcher die hypoxische Stimulation vermittelt (Abbildung 21). Dieser Enhancer wurde bereits von Heberlein *et al.* als DNaseI-hypersensitiver Bereich identifiziert.¹³² Dabei wurde gezeigt, dass der intronische Bereich in den erythroiden Vorläuferzellen F4-12-B2 unter Normoxie eine transkriptionelle Aktivierung vermittelt, in nicht-hämatopoietischen Zellen hingegen nicht. Die Relevanz dieses intronischen DNA-Bereichs wird durch eine vergleichende Sequenzanalyse unterstützt (Abbildung 20). Diese

ergab, dass der DNA-Bereich (+871/+974) des murinen *EpoR*-Gens mit dem humanen Äquivalent zu 76% homolog ist und neben den von Heberlein *et al.* beschriebenen ETS-Motiv (+875/+880), einer GC-Box (+883/+889), zwei GATA-Motiven (+905/+908 und +968/+972) sowie einem CACCC-Motiv (+968/+972), eine konservierte *core*-Konsensussequenz des HRE (+893/+896) enthält. Nachfolgende Reporteranalysen ergaben, dass vor allem das HRE und die *downstream* gelegene GATA-Box (+937/+940) neben der Aktivität des Enhancers unter Normoxie auch für die transkriptionelle Aktivierung unter Hypoxie verantwortlich sind (Abbildung 21). Eine Beteiligung der weiteren konservierten DNA-Bindungsstellen kann allerdings aufgrund einer möglichen Kooperativität zwischen den einzelnen Transkriptionsfaktoren nicht ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass in nicht-hämatopoietischen Zellen trotz Normoxie DNaseI-hypersensitive Bereiche identifiziert wurden, könnte dadurch erklärt werden, dass an das HRE unter normoxischen Bedingungen CREB-1 und ATF-1 (*cyclic AMP dependent transcription factor 1*) binden können.^{132, 300, 301} Die Bindung dieser beiden Faktoren an das HRE kann einen selektiven Mechanismus darstellen, welcher unter Normoxie das CpG-Motiv des HRE vor Methylierung schützt.³ Im Hypoxie-induzierbaren Enhancer 3' des *Epo* Stoppcodons konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Methylierung des HRE die Bindung des transkriptionell aktiven HIF-Komplexes und die hypoxische Aktivierung der entsprechenden Reportergenkonstrukte verhindert.^{260, 261} Zudem wurde mittels *in vivo footprint*-Analysen gezeigt, dass im 3' Enhancer des *Epo* Gens auch unter Normoxie Proteine gebunden sind.³⁰² Die Möglichkeit, dass die Hypoxie-induzierte Expression des *EpoR* Gens durch den Transkriptionsfaktor HIF vermittelt wird, wird neben den Reportergenassays mit mutiertem HRE auch durch die Analysen der PHD-Inhibition mittels L-Mimosin unterstützt (Abbildung 19). Dass L-Mimosin nur die Prolylhydroxylasen, nicht aber die Aspargylhydroxylase FIH inhibiert, ist möglicherweise ein Grund dafür, dass in diesen Experimenten die endogene *EpoR* Expression nur um das doppelte, nicht aber um das 4-fache, wie bei 1% Sauerstoff, ansteigt. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde von Lisy *et al.* postuliert und beruht auf der sequentiellen Aktivierung zweier Transaktivierungsdomänen in den HIF α -Untereinheiten durch Inhibition der PHD's während moderater Hypoxie und erst darauf folgender Inhibition von FIH unter schwerer Hypoxie.³⁰³ Welche der beiden HIF α -Untereinheiten an der *EpoR* Regulation unter Hypoxie eine Rolle spielen bleibt gegenwärtig unklar. Auch die Rolle von Gata-Transkriptionsfaktoren für die Stimulation der *EpoR* Expression unter Hypoxie konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Über eine physikalische Interaktion von Gata4 und HIF

liegen bislang keine Daten vor. Es wurde aber gezeigt, dass beispielsweise Gata2 und HIF am *Endothelin-1* Promotor miteinander interagieren.³⁰⁴ Die Interaktion von HIF und der Acetyltransferase p300 hingegen, deren Bindung an den *EpoR* Promotor unter Normoxie nachgewiesen wurde (Abbildung 13), gilt als gesichert.³⁰⁵⁻³⁰⁹ Dies könnte darauf hindeuten, dass - ähnlich wie beim *Epo* Gen - p300 als Brücke oder *scaffold* zwischen Promotor und Enhancer dient und die Interaktion der jeweiligen Transkriptionsfaktoren vermittelt.³¹⁰

Kürzlich wurde im ersten Intron des *Angiopoietin* Gens ein Hypoxie-induzierbarer Enhancer mit HIF-Bindestelle identifiziert.¹⁵⁴ Auffällig ist, dass, wie im Falle des *EpoR* Gens, die Expression durch Hypoxie nur um das 3- bis 4-fache gesteigert werden kann. Im Vergleich dazu wird die Expression von *Epo* unter Hypoxie bis zu 1000-fach gesteigert.¹⁰ Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass hier der Enhancer 3' vom Stoppcodon lokalisiert ist und es nicht zu einer sterischen Behinderung des Enhanceosoms mit dem Transkriptionskomplex kommt, wie es beim *EpoR* Gen der Fall sein könnte.

In der vorliegenden Studie wurden erstmals die DNA-Bereiche identifiziert, welche unter Hypoxie für eine gesteigerte *EpoR* Expression verantwortlich sind. Allerdings konnte aufgrund fehlender valider *EpoR* Antikörper nicht der Nachweis erbracht werden, ob durch Hypoxie auch vermehrt *EpoR* mRNA translatiert und der *EpoR* anschließend auch auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Unter Normoxie durchgeführte Studien belegen, dass nur 60% der neu translatierten *EpoR* vollständig glykosyliert werden, während unreife *EpoR* im endoplasmatischen Retikulum verbleiben.³¹¹ Zudem besitzt das reife *EpoR* Protein eine im Vergleich zu anderen Proteinen sehr kurze Halbwertszeit von 45 - 60 Minuten, so dass nur ein Bruchteil der translatierten *EpoR* auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Dass die posttranslationalen Mechanismen im *EpoR* Metabolismus eine große Rolle spielen, beweisen Untersuchungen an Blindmäusen der Gattung *Spalax*. Diese Nagetiere leben in unterirdischen, verschlossenen und hypoxischen Gängen (7% Sauerstoff) und zeigen im Vergleich zu Ratten eine deutlich höhere Hypoxie-Toleranz.⁵⁰ Neben strukturellen und funktionellen Unterschieden in den Molekülen von beispielsweise Hämoglobin, Vegf und *Epo* besitzt *Spalax* in der extrazellulären Domäne seines *EpoR* eine Aminosäure-Sequenz, die zu einer beschleunigten Reifung und zur erhöhten Expression des *EpoR* auf der Zelloberfläche führt.³¹²⁻³¹⁵ *In vivo* Experimente in Ratten zeigen zudem, dass kardiale *EpoR* Proteinlevel durch Hypoxie-Konditionierung zunächst abnehmen, durch anschließende akute Ischämie im Modell der Ischämie/Reperfusion allerdings wieder zunehmen.⁹⁰ Interessanterweise wird im gleichen Modell durch Präkonditionierung die *Epo* Expression

im Myokard induziert. Die konditionierten Ratten weisen deutlich kleinere Infarktareale und verbesserte Herzfunktionen auf als nicht-konditionierte Ratten.

Neben der Präsentation des EpoR auf der Zelloberfläche scheint der lösliche EpoR (*soluble* EpoR, sEpoR), welcher mit dem membranständigen EpoR um die Epo-Bindung konkurriert, ein weiterer Regulationsmechanismus zu sein. Der sEpoR entsteht posttranskriptionell durch alternatives Spleißen, wobei durch die Insertion eines 105 bp Fragments ein alternatives Stoppcodon entsteht und eine verkürzte, nur die extrazelluläre Domäne enthaltene Form des EpoR translatiert wird.³¹⁶ Der sEpoR wurde im Blutplasma, aber auch in Leber, Milz, Niere, Knochenmark, Gehirn und dem Herz nachgewiesen.^{316, 317} Im Gehirn von Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass Hypoxie die Expression des sEpoR reprimiert, während das Level membranständiger EpoR unverändert bleibt.³¹⁷ Diese Daten zeigen, dass die wahrscheinlich sauerstoffabhängige posttranskriptionelle und posttranslationelle Regulation des EpoR von großer Bedeutung ist. Die zukünftige Untersuchung und Identifizierung dieser Mechanismen sowie das umfassende Verständnis der Epo und EpoR Biologie unter Normoxie und Hypoxie sind daher für den gewebeprotektiven Einsatz von rEpo/ESA essentiell.

5.4. Entwicklungsabhängige und gewebespezifische Regulation des *EpoR* Gens

Das *EpoR* Gen unterliegt in hämatopoietischen Zellen einer stadienspezifischen Regulation, welche sowohl durch den minimalen Promotor als auch durch den distalen und den im ersten Intron gelegenen Enhancer erzielt wird. In frühen hämatopoietischen Vorläuferzellen wird die *EpoR* Expression nicht durch Sp1, sondern durch die transkriptionell aktive Spleißvariante Wt1(-KTS) aktiviert.¹²⁷ Eine solche differentielle Regulation an der GC-Box des minimalen *EpoR* Promotors kann für Kardiomyozyten ausgeschlossen werden, da Wt1 während der gesamten murinen Individualentwicklung weder im Myokard noch in HL-1 Zellen exprimiert wird (Abbildung 11). Zudem wurde in vorangegangenen Studien gezeigt, dass in Mäusen mit homozygoter Deletion von *Wt1* (*Wt1*^{-/-}) die kardiale *EpoR* Expression nicht verändert ist.¹²⁷

Die Dichte des EpoR nimmt im Verlauf der Differenzierung von hämatopoietischen Vorläuferzellen zu erythroiden Zellen (vor allem CFU-E) zu.³²⁻³⁶ Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Aktivität des im distalen Promotor gelegenen Enhancers zurückzuführen, welcher in erythroiden Zelllinien eine doppelt so hohe Aktivität aufweist wie in

hämatopoietischen Vorläuferzellen.^{5,9} In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Reporteranalysen nachgewiesen werden, dass dieser distale Promotorbereich in HL-1 Kardiomyozyten nicht als Enhancer, sondern als Inhibitor fungiert (Abbildung 8). Möglicherweise ist dies der Grund, warum das *EpoR* Gen in nicht-hämatopoietischen Geweben 10- bis 100-fach geringer exprimiert wird.⁶⁹ Der Inhibitor im murinen *EpoR* Promotor vermittelt in Kardiomyozyten eine sehr schwach reprimierende Aktivität (Abbildung 8). Ähnlich wie in den HL-1 Zellen nahm in einer früheren Studie die Reportergenaktivität in Fibroblasten durch die Deletion des Inhibitors nur um ein Drittel zu. Im Gegensatz dazu stieg in derselben Studie durch die Deletion des Inhibitors die Reportergenaktivität in Zellen der BFU-E und CFU-E um das Doppelte beziehungsweise um das 13-fache an.⁶ Es konnte nachgewiesen werden, dass die repressorische Wirkung des DNA-Elements von der Distanz zum Promotor sowie von der Orientierung abhängig ist. Ferner befindet sich im Inhibitor ein funktioneller Promotor, dessen Aktivität zur transkriptionellen Interferenz durch sterische Behinderung am *EpoR* Promotor selbst führt. Diese Daten führen zu der Annahme, dass der Inhibitor-spezifische Promotor - zumindest in Reporteranalysen - insbesondere durch hämatopoietische Transkriptionsfaktoren aktiviert wird. Inwieweit funktionelle Homologe des Enhancers und Inhibitors auch im Promotor des humanen *EpoR* Gens vorkommen, ist bislang nicht geklärt.

Die *EpoR*-Expression in kardialen Zellen unterliegt keiner entwicklungsabhängigen Regulation. Dies zeigen die Expressionsanalysen der embryonalen Entwicklungsstadien E13 und E18, des Stadiums P1 sowie die Analyse adulter Tiere (Abbildung 11). Auch weitere in unserem Labor durchgeführte Quantifizierungen der kardialen *EpoR* mRNA während der postnatalen Entwicklung (P7-P81) ergaben keine signifikanten Veränderungen. Allerdings muss hier eingeschränkt werden, dass die Isolierung spezieller Zelltypen aus dem Herzgewebe in den frühen Entwicklungsphasen methodisch schwierig ist, so dass einheitlich ein Homogenat aus Gewebe des gesamten Herzens verwendet wurde. Dies führt dazu, dass neben der RNA aus Kardiomyozyten auch RNA aus Zellen des Epi- und Endokards sowie von Fibroblasten und Endothelzellen quantifiziert wurde. Da aber Kardiomyozyten den größten Teil des Herzens ausmachen, und die einzelnen Proben im jeweils selben Verhältnis mit RNA anderer Zelltypen kontaminiert sind, kann man davon ausgehen, dass die mRNA-Daten größtenteils auf Kardiomyozyten zurückzuführen sind.

Die Aktivierung des kardialen *EpoR* Promotors durch Gata4 scheint ein äußerst gewebespezifischer Mechanismus zu sein. Während das *EpoR* Gen in hämatopoietischen Zellen ebenfalls nur durch ein Mitglied aus der Familie der Gata-Transkriptionsfaktoren,

Gata1, aktiviert werden kann, wurde für neuronale Zellen *in vitro* die Bindung von drei verschiedenen Gata-Transkriptionsfaktoren, GATA2, GATA3 und GATA4 nachgewiesen.^{7, 123, 133} Allerdings konnte die Aktivierung durch diese drei Faktoren nur durch Reporteranalysen in den humanen Neuroblastomzellen SH-SY5Y, nicht aber auf der Ebene der endogenen RNA nachgewiesen werden.¹³³ Zusätzlich stellt sich die Frage, ob die Expression des *EpoR* Gens im Epikard einer gewebespezifischen Regulation unterliegt, denn im Vergleich zu den Wt1-negativen Kardiomyozyten (Abbildung 11) wird die transkriptionell aktive Spleißvariante Wt1(-KTS) im Epikard exprimiert.³¹⁸⁻³²⁰ Die Expression des *EpoR* könnte hier von Bedeutung sein, weil vom Epikard abgeleitete Kardiomyozyten-Vorläuferzellen an einer Regeneration und Reparatur des Herzmuskels beteiligt sind.^{319, 320}

In der Zusammenfassung der Befunde zeigt sich, dass das *EpoR* Gen einer sehr differenziellen Regulation unterworfen ist.

5.5. Bedeutung des *EpoR* und von *Gata4* für eine Kardioprotektion durch rekombinantes Erythropoietin

Der klinische Einsatz des Chemotherapeutikums Doxorubicin, ein Anthrazyklin, welches zur Behandlung von Leukämien und solider Tumore eingesetzt wird, kann durch kardiotoxische Effekte limitiert sein. Im Rahmen dieser Studie wurde das Mausmodell einer Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie genutzt, um den Zusammenhang der damit assoziierten *Gata4* Depletion und der *EpoR* Expression zu untersuchen. Die Daten zeigen, dass die *EpoR* mRNA direkt mit dem *Gata4* Proteinlevel korreliert (Abbildung 17). Obwohl sich das experimentelle Protokoll hinsichtlich des verwendeten Mausstammes, Alters und Geschlechts der Tiere sowie der Menge des intraperitoneal applizierten Doxorubicins vom Protokoll von Li *et al.* nicht unterscheiden, sind die Daten bezüglich der *Gata4* Depletion inkonsistent.⁸⁷ Während in der publizierten Studie die kardiale *Gata4* Depletion auch 2 Wochen nach der Doxorubicin-Applikation noch nachzuweisen war, wurden in der eigenen Arbeit nach 5 Tagen wieder *Gata4* Proteinlevel detektiert, welche ähnlich denen der Kontrolltiere waren. In primären neonatalen Kardiomyozyten der Maus führte eine Behandlung der Zellen mit 300 nM Doxorubicin zu einer Abnahme der *Gata4* mRNA-Level.⁹⁴ Im Gegensatz zu diesen *in vitro* Daten nahmen die *Gata4* mRNA-Level in dieser Studie nicht ab, sondern nach 5 Tagen um das 4-fache zu. Inwieweit diese Zunahme auf posttranskriptionellen Mechanismen beruht oder auf eine tatsächliche Regulation des

Gata4 Gens zurückzuführen ist, wurde im Rahmen dieser Studie nicht hinterfragt. Wahrscheinlich kann die *Gata4* Erholung nach 5 Tagen aber durch die höhere Menge von *Gata4* mRNA erklärt werden.

Weiterhin wurde in der Studie von Li *et al.* durch Western Blot Analysen gezeigt, dass 2 Wochen nach der Applikation von Doxorubicin die *EpoR* Level reduziert waren.⁸⁷ Diese Daten müssen aufgrund der Wahl des Antikörpers zwar kritisch betrachtet werden, interessanterweise wird aber durch die gleichzeitige Gabe von rEpo mit Doxorubicin sowohl die *Gata4* als auch die *EpoR* Depletion aufgehoben. Eine Behandlung der Kardiomyozyten mit rEpo führt zu einer vermehrten Phosphorylierung von *Gata4* und damit zur höheren DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors.^{92, 93} Da sich im Promotor von *Gata4* eine GATA-Box befindet, ist es möglich, dass dieses Gen einer Autoregulation unterliegt und die Stimulation mit rEpo die Doxorubicin-induzierte *Gata4* Depletion unterdrückt. Die Regulation des *EpoR* Gens durch *Gata4* als Ergebnis dieser Arbeit könnte auch einen ausbleibenden kardioprotektiven Effekt durch rEpo auf eine bereits etablierte Kardiomyopathie erklären.⁸⁷ Die durch den *Gata4* Mangel reduzierte *EpoR* Expression könnte auch in den ersten klinischen Studien das Ausbleiben eines signifikanten kardioprotektiven Effekts von rEpo bedingen.^{115, 116}

Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse mit Doxyzyklin-induzierbarer *Gata4 short hairpin* RNA wurden vor kurzem entwickelt und standen für die *EpoR* Analysen zur Verfügung.⁴ Obwohl die *Gata4* Level nach 70 Tagen Induktion durch Gabe von Doxyzyklin über das Trinkwasser im Herz der Mäuse deutlich reduziert waren, blieb die Herzfunktion der Tiere unter Normalbedingungen (keine Hypoxie oder körperliche Belastungen) unverändert.⁴ Dies ist möglicherweise auf das Zeitintervall zwischen der Induktion durch Doxyzyklin und den funktionellen Untersuchungen zurückzuführen, denn konditionelle Mausmutanten deren *Gata4* Level durch eine β -MHC Promotor gesteuerte Cre-Rekombinase supprimiert werden (*Gata4fl/fl* ^{β -MHC-Cre}), zeigen erst nach 12-24 Wochen eine progressive Verschlechterung der Herzfunktionen.¹⁸⁰ Ferner wird *Gata4* im hier verwendeten Modell auf 20% des normalen Expressionslevels supprimiert. Bei einer anderen Mausmutante (*Gata4fl/fl* ^{α -MHC-Cre}) mit 30% der kardialen *Gata4* Level bleibt die normale Herzfunktion ebenfalls erhalten.

Diese Untersuchung zeigt, dass *Gata4* ein essentieller Faktor für den Erhalt normaler *EpoR*-Expression ist und - neben der positiven Regulation antiapoptotischer Gene - den *EpoR* auf den Zellen für die Bindung von rEpo verfügbar macht. Im Kontext von publizierten Studien zur Kardioprotektion durch rEpo macht dies deutlich, dass für die

kardioprotektiven Effekte von rEpo der Erhalt normaler Gata4 Level von grundlegender Bedeutung ist.

5.6. Myokardiale *Epo* Expression

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Epo/EpoR Biologie - gerade im Hinblick auf die kardioprotektiven Eigenschaften von Epo - ist die Frage nach der endogenen *Epo* Expression und Genregulation in Kardiomyozyten. Während im humanen fetalen Herzen geringe Level an *Epo* RNA detektiert wurden, kann im adulten normoxischen Herz keine Expression des *Epo* Gens nachgewiesen werden.⁸ In der eigenen Arbeit konnten in der Maus weder in den Entwicklungsstadien E13 und E18 noch postnatal am Tag P1 oder im Herz des adulten Tieres eine signifikante *Epo* Expression nachgewiesen werden. Auch in den HL-1 Zellen ist unter Normoxie das *Epo* Gen reprimiert (Abbildung 11 und 23 B). Unter Hypoxie jedoch wurde in den HL-1 Zellen eine geringe (4- bis 7-fache) *Epo* Expression induziert (Abbildung 23 und 24). Dieser *in vitro* Befund deckt sich mit publizierten *in vivo* Daten, in welchen eine Expression von *Epo* mRNA in Infarktarealen sowie Epo Protein im Hypoxie-konditionierten murinen Herzgeweben nachgewiesen wurde.^{89, 90}

In publizierten Studien wurden Gata2 und Gata3 als *Epo* reprimierende Faktoren beschrieben.²⁵³⁻²⁵⁵ Im Gegensatz dazu wurden Gata4 und Wt1(-KTS) als positive Regulatoren des *Epo* Gens in der fetalen Leber beschrieben.^{193, 256, 257} Da Gata4 von Kardiomyozyten exprimiert wird, stellte sich die Frage nach der Funktion von Gata4 am myokardialen *Epo* Promotor.^{189, 320} Die Ergebnisse zeigen, dass Gata-Transkriptionsfaktoren in HL-1 Kardiomyozyten zumindest unter Normoxie keinen Einfluss auf die *Epo* mRNA Expression haben (Abbildung 22 und 23). Interessanterweise wird durch Zugabe des Gata-Inhibitor K7174 die hypoxische Induktion des *Epo* Gens verstärkt. Dies bedeutet, dass GATA-bindende Faktoren offensichtlich die *Epo* Expression in Kardiomyozyten reprimieren. Da nicht bekannt ist, ob die verschiedenen Gata-Transkriptionsfaktoren durch den Inhibitor unterschiedlich stark gehemmt werden^{258, 321}, kommen für die Repression des *Epo* Gens zum Beispiel auch Gata2 und Gata3 in Frage. Für beide Transkriptionsfaktoren konnte ein solcher Effekt unter Hypoxie bereits in Hepatozyten beobachtet werden.²⁵⁴

Neben einer transkriptionellen Regulation wurde für das *Epo* Gen ein epigenetischer Regulationsmechanismus beschrieben.²⁵⁹⁻²⁶¹ In der eigenen Arbeit führte eine DNA-Demethylierung durch 5-Aza-2-Deoxycytidin in HL-1 Zellen zu einem signifikanten

Anstieg der *Epo* Expression, welcher unter Hypoxie noch verstärkt wurde (Abbildung 24). Dieser Befund wird von Bisulfitsequenzierungen gestützt, welche zeigen, dass sowohl der Promotor als auch die 5' UTR in HL-1 Zellen stark methyliert sind (Abbildung 25). Des Weiteren liegt das HRE im 3' *Epo* Enhancer in HL-1 Zellen unmethyliert, in primärem Gewebe dagegen hemimethyliert vor. In vorangegangenen Studien in Neuroblastomzellen, Hep3B und HeLa Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Hypoxie-Induktion von *Epo* von einem unmethylierten HRE abhängig ist.^{260, 261} Daher deckt sich das Methylierungsmuster am HRE mit der Induzierbarkeit des *Epo* Gens unter Hypoxie. Die Unterschiede im Methylierungsmuster des *Epo* Promotors und der 5' UTR in den HL-1 Zellen und primärem Gewebe ist möglicherweise mit epigenetischen Veränderungen transformierter Zellen im Verlauf der Kultivierung und Passagierung zu erklären. Eine mögliche autokrine oder parakrine Funktion von endogenem Epo in *in vivo* Schädigungsmodellen konnte daher nicht abschließend geklärt werden.

5.7. Schlussfolgerungen

Gata4 und Sp1 wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als positive Regulatoren der *EpoR* Expression in Kardiomyozyten identifiziert. Während der Transkriptionsfaktor Sp1 ubiquitär exprimiert wird und auch in hämatopoietischen Zellen den Promotor des *EpoR*-Gens reguliert, stellt die Aktivierung durch Gata4 einen gewebespezifischen Mechanismus dar. Ferner liefert die Studie Hinweise darauf, dass der Transkriptionsfaktor Gata4 neben der Vermittlung von antiapoptotischen Effekten auch für den Erhalt normaler EpoR Level und damit für den kardioprotektiven Einsatz von rEpo essentiell ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der für die hypoxische Induktion des *EpoR* Gens verantwortliche DNA-Bereich im ersten Intron des *EpoR* Gens identifiziert. Mutationsanalysen zeigten, dass zwei konservierte Transkriptionsfaktorbindestellen, eine GATA-Box sowie ein HRE-Motiv die hypoxische Induktion vermitteln. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass sowohl Gata-Transkriptionsfaktoren als auch HIF an der sauerstoffabhängigen Regulation der *EpoR* Expression beteiligt sind.

5.8. Ausblick

In dieser Studie wurde der für die hypoxische Induktion relevante DNA-Bereich des *EpoR* Gens identifiziert. In weiterführenden Untersuchungen sollten nun der Mechanismus und die essentiellen Transkriptionsfaktoren der hypoxischen Induktion charakterisiert werden. Dies ist durch *in vivo* und *in vitro* Bindungsstudien (EMSA- und CHIP-Analysen), unter Einsatz von Kernextrakten aus normoxischen und hypoxischen Zellen, möglich. Des Weiteren sollte durch Transfektion entsprechender siRNA's evaluiert werden, welche HIF α -Untereinheit an der hypoxischen Regulation der *EpoR* Expression beteiligt ist.

Vor dem Hintergrund der kardioprotektiven Effekte durch rEpo/ESA in Modellen der ischämischen Schädigung ist es notwendig zu verifizieren, ob die gesteigerte *EpoR* Expression auch in einem erhöhten EpoR Proteinlevel mündet. Da momentan kein geeigneter Antikörper verfügbar ist, wäre dies durch ¹²⁵I-Epo Bindungsassays möglich.

6. Zusammenfassung

Erythropoietin (Epo), der primäre Regulator für die Bildung roter Blutkörperchen, wird primär in der fetalen Leber und in den ausgereiften Nieren exprimiert. Seine Wirkung vermittelt Epo durch Bindung an seinen spezifischen Rezeptor (EpoR), welcher nicht nur in hämatopoietischen, sondern auch in nicht-hämatopoietischen Geweben, unter anderem dem Herzen, exprimiert wird. Zahlreiche experimentelle *in vitro* und *in vivo* Studien belegen, dass der EpoR auf Kardiomyozyten gewebesetzende Effekte von rekombinantem Epo (rEpo) während ischämischer oder medikamentöser Schädigung des Herzens vermittelt. Die transkriptionellen Mechanismen der *EpoR* Regulation im Herzen sind bisher nicht bekannt, aufgrund der kardioprotektiven und antiapoptotischen Effekte von rEpo jedoch von großem klinischem Interesse. Ziel der Arbeit war es deshalb, die molekularen Mechanismen der transkriptionellen Aktivierung des kardialen *EpoR* Promotors zu identifizieren. Mittels Reportergeranalysen in HL-1 Kardiomyozyten konnte eine 774 bp lange regulatorische Domäne im *EpoR* Promotor identifiziert werden, in welcher insbesondere die GC- und GATA-Box zur *EpoR* Promotoraktivität beitragen. EMSA und CHIP-Analysen belegen die Bindung von Gata4 und Sp1 an den *EpoR* Promotor. Die Funktionalität beider Transkriptionsfaktoren wurde durch Überexpressionen und *knockdown* Experimente bewiesen. Ferner wurde in transgenen Mäusen mit induzierbarer shRNA gegen *Gata4* die Funktion von Gata4 auf den *EpoR* Promotor *in vivo* bestätigt. Auch im Modell der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie korrelierte die *EpoR* Expression mit der Gata4 Depletion und einer anschließenden Erholung der Gata4 Level. Unter Hypoxie konnte in HL-1 Kardiomyozyten ein signifikanter Anstieg der endogenen *EpoR* mRNA beobachtet werden. Mittels Reportergeranalysen wurde im ersten Intron des *EpoR* Gens ein Hypoxie-induzierbares DNA-Element identifiziert. Mutationsanalysen zeigten, dass vor allem eine konservierte GATA-Box und ein *hypoxia response element* (HRE) für die hypoxische Induktion essentiell sind und neben Gata-Transkriptionsfaktoren auch der HIF-Komplex (*hypoxia inducible factor*) an der transkriptionellen Regulation unter Hypoxie beteiligt sein könnte. Die Daten zeigen, dass Gata4 und Sp1 den kardialen *EpoR* Promotor aktivieren. Dies stellt einen neuen gewebespezifischen Mechanismus dar, der sich sowohl von hämatopoietischen als auch von neuronalen Zellen unterscheidet. Zusätzlich liefert diese Studie Hinweise dafür, dass Gata4 für den Erhalt normaler EpoR Level und damit für den erfolgreichen Einsatz von rEpo zur Kardioprotektion essentiell ist.

7. Abstract

Erythropoietin (Epo), the primary regulator for erythropoiesis, is mainly produced by the fetal liver and the adult kidney. Effects of Epo are mediated by binding to its specific receptor (EpoR), which is not only expressed in hematopoietic cells, but also in non-hematopoietic tissue such as the heart. Experimental *in vitro* and *in vivo* studies show that the EpoR on cardiomyocytes mediates the tissue-protective effects of recombinant Epo (rEpo) in ischemic heart injuries or doxorubicin-induced cardiomyopathy. However, the transcriptional mechanisms of the *EpoR* gene regulation in cardiomyocytes are unknown yet, but due to the cardioprotective and antiapoptotic effects of rEpo of great clinical interest. The aim of the study was to identify tissue-specific mechanisms and transcription factors regulating the *EpoR* promoter in cardiomyocytes. Using reporter gene assays, we identified in murine HL-1 cardiomyocytes a 774 bp regulatory domain *EpoR* promoter, in which a GC- and a GATA-box mediate the promoter activity. EMSA and chromatin-immunoprecipitation experiments indicated specific binding of Gata4 and Sp1 to the *EpoR* promoter. Functional relevance of Gata4 and Sp1 for the transcriptional regulation of *EpoR* showed ectopic expression and knockdown analysis of Gata4 and Sp1. Transgenic mice with an inducible shRNA against *Gata4* confirmed the suppression of *EpoR* expression when Gata4 levels were reduced. In the model of doxorubicin-induced cardiomyopathy *EpoR* level correlated with Gata4 depletion and following restoration. Under hypoxia a significant induction of *EpoR* mRNA expression in HL-1 cardiomyocytes was observed. Reporter gene assays identified a hypoxia-inducible element in the first intron of the *EpoR*. Mutational analysis revealed a GATA-box and hypoxia response element (HRE) as essential DNA-motifs indicating participation of Gata transcription factors and the HIF-complex (hypoxia inducible factor) on the hypoxic induction of the *EpoR*. Our data indicates that Gata4 and Sp1 activate *EpoR* mRNA expression in cardiomyocytes. This is a novel mechanism that differs from *EpoR* regulation in neurons and hematopoietic cells. Additionally, the study may suggest, that Gata4 is essential for the preservation of normal EpoR levels and thereby for the cardioprotection by rEpo.

8. Referenzen

1. Youssoufian H, Zon LI, Orkin SH, et al. Structure and transcription of the mouse erythropoietin receptor gene. *Mol Cell Biol*. Jul 1990;10(7):3675-3682.
2. Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, et al. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*. Aug 1 2004;63(2):196-207.
3. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*. Oct 18 2005;2005(306):re12.
4. Thurisch B, Liang SY, Sarioglu N, et al. Transgenic mice expressing small interfering RNA against Gata4 point to a crucial role of Gata4 in the heart and gonads. *J Mol Endocrinol*. Oct 2009;43(4):157-169.
5. Youssoufian H. Further characterization of cis-acting regulatory sequences in the genomic locus of the murine erythropoietin receptor: evidence for stage-specific regulation. *Blood*. Mar 1 1994;83(5):1428-1435.
6. Youssoufian H, Lodish HF. Transcriptional inhibition of the murine erythropoietin receptor gene by an upstream repetitive element. *Mol Cell Biol*. Jan 1993;13(1):98-104.
7. Zon LI, Youssoufian H, Mather C, et al. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1 1991;88(23):10638-10641.
8. Juul SE, Yachnis AT, Christensen RD. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum Dev*. Oct 1998;52(3):235-249.
9. Youssoufian H, Longmore G, Neumann D, et al. Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood*. May 1 1993;81(9):2223-2236.
10. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev*. Apr 1992;72(2):449-489.
11. Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, et al. Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood*. Nov 1 1998;92(9):3218-3225.
12. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood*. Sep 15 1999;94(6):1864-1877.
13. Bazan JF. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 31 1989;164(2):788-795.
14. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1990;87(18):6934-6938.
15. Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, et al. A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci*. Jul 1990;15(7):265-270.
16. Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Seto Y, et al. Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Cell*. Apr 20 1990;61(2):341-350.
17. Vigon I, Mornon JP, Cocault L, et al. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 15 1992;89(12):5640-5644.
18. Constantinescu SN, Keren T, Socolovsky M, et al. Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 10 2001;98(8):4379-4384.
19. Seubert N, Royer Y, Staerk J, et al. Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer. *Mol Cell*. Nov 2003;12(5):1239-1250.

20. Lu X, Gross AW, Lodish HF. Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. *J Biol Chem*. Mar 17 2006;281(11):7002-7011.
21. Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*. Feb 12 1999;283(5404):990-993.
22. Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica*. Aug 1998;83(8):724-732.
23. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. Jul 30 1993;74(2):227-236.
24. Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, et al. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*. Mar 10 1995;80(5):729-738.
25. Chin H, Wakao H, Miyajima A, et al. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of the interleukin-3 receptor beta subunit (betaIL3) and recruitment of Stat5 to possible Stat5-docking sites in betaIL3. *Blood*. Jun 15 1997;89(12):4327-4336.
26. Hanazono Y, Sasaki K, Nitta H, et al. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of the beta chain of the GM-CSF receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 28 1995;208(3):1060-1066.
27. Jubinsky PT, Krijanovski OI, Nathan DG, et al. The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood*. Sep 1 1997;90(5):1867-1873.
28. Wu H, Klingmuller U, Acurio A, et al. Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 4 1997;94(5):1806-1810.
29. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 12 2004;101(41):14907-14912.
30. Kanellakis P, Pomilio G, Agrotis A, et al. Darbepoetin-mediated cardioprotection after myocardial infarction involves multiple mechanisms independent of erythropoietin receptor-common beta-chain heteroreceptor. *Br J Pharmacol*. Aug;160(8):2085-2096.
31. Sautina L, Sautin Y, Beem E, et al. Induction of nitric oxide by erythropoietin is mediated by the {beta} common receptor and requires interaction with VEGF receptor 2. *Blood*. Jan 28;115(4):896-905.
32. Fisher JW. Erythropoietin: physiologic and pharmacologic aspects. *Proc Soc Exp Biol Med*. Dec 1997;216(3):358-369.
33. Broudy VC, Lin N, Brice M, et al. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*. Jun 15 1991;77(12):2583-2590.
34. Sawada K, Krantz SB, Dai CH, et al. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J Cell Physiol*. Feb 1990;142(2):219-230.
35. Sinclair AM, Rogers N, Busse L, et al. Erythropoietin receptor transcription is neither elevated nor predictive of surface expression in human tumour cells. *Br J Cancer*. Mar 25 2008;98(6):1059-1067.
36. Nakazawa M, Mitjavila MT, Debili N, et al. KU 812: a pluripotent human cell line with spontaneous erythroid terminal maturation. *Blood*. May 15 1989;73(7):2003-2013.

37. Fraser JK, Tan AS, Lin FK, et al. Expression of specific high-affinity binding sites for erythropoietin on rat and mouse megakaryocytes. *Exp Hematol.* Jan 1989;17(1):10-16.
38. Orlic D, Anderson S, Biesecker LG, et al. Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 9 1995;92(10):4601-4605.
39. Shah SS, Tsang SH, Mahajan VB. Erythropoietin receptor expression in the human diabetic retina. *BMC Res Notes.* 2009;2:234.
40. Munro K, Rees S, O'Dowd R, et al. Developmental profile of erythropoietin and its receptor in guinea-pig retina. *Cell Tissue Res.* Apr 2009;336(1):21-29.
41. Depping R, Kawakami K, Ocker H, et al. Expression of the erythropoietin receptor in human heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Sep 2005;130(3):877-878.
42. Wright GL, Hanlon P, Amin K, et al. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *Faseb J.* Jun 2004;18(9):1031-1033.
43. Wu H, Lee SH, Gao J, et al. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development.* Aug 1999;126(16):3597-3605.
44. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, et al. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development.* Jan 2002;129(2):505-516.
45. Kim KH, Oudit GY, Backx PH. Erythropoietin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* Jan 2008;324(1):160-169.
46. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, et al. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem.* May 14 2004;279(20):20655-20662.
47. David RB, Sjaastad OV, Blom AK, et al. Ontogeny of erythropoietin receptor mRNA expression in various tissues of the foetal and the neonatal pig. *Domest Anim Endocrinol.* Oct 2005;29(3):556-563.
48. Ohneda O, Yanai N, Obinata M. Erythropoietin as a mitogen for fetal liver stromal cells which support erythropoiesis. *Exp Cell Res.* Sep 1993;208(1):327-331.
49. Yasuda Y, Hara S, Hirohata T, et al. Erythropoietin-responsive sites in normal and malignant human lung tissues. *Anat Sci Int.* Apr 16.
50. Shams I, Nevo E, Avivi A. Erythropoietin receptor spliced forms differentially expressed in blind subterranean mole rats. *Faseb J.* Oct 2005;19(12):1749-1751.
51. Hino M, Tojo A, Misawa Y, et al. Unregulated expression of the erythropoietin receptor gene caused by insertion of spleen focus-forming virus long terminal repeat in a murine erythroleukemia cell line. *Mol Cell Biol.* Nov 1991;11(11):5527-5533.
52. Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int.* Mar 1999;55(3):808-820.
53. Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood.* Jul 1989;74(1):103-109.
54. Fairchild Benyo D, Conrad KP. Expression of the erythropoietin receptor by trophoblast cells in the human placenta. *Biol Reprod.* Apr 1999;60(4):861-870.
55. Kim MJ, Bogic L, Cheung CY, et al. Placental expression of erythropoietin mRNA, protein and receptor in sheep. *Placenta.* May 2001;22(5):484-489.

56. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 26 1994;91(9):3974-3978.
57. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, et al. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 1990;87(15):5978-5982.
58. Feldman L, Wang Y, Rhim JS, et al. Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells. *Prostate*. Feb 1 2006;66(2):135-145.
59. Mioni R, Gottardello F, Bordon P, et al. Evidence for specific binding and stimulatory effects of recombinant human erythropoietin on isolated adult rat Leydig cells. *Acta Endocrinol (Copenh)*. Nov 1992;127(5):459-465.
60. Yamazaki T, Kanzaki M, Kamidono S, et al. Effect of erythropoietin on Leydig cell is associated with the activation of Stat5 pathway. *Mol Cell Endocrinol*. Jan 15 2004;213(2):193-198.
61. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, et al. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*. Dec 15 2000;275(50):39754-39761.
62. Yokomizo R, Matsuzaki S, Uehara S, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*. May 2002;8(5):441-446.
63. Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, et al. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem*. Sep 25 1998;273(39):25381-25387.
64. Juul SE, Anderson DK, Li Y, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res*. Jan 1998;43(1):40-49.
65. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab*. May 2002;22(5):503-514.
66. Yamaji R, Okada T, Moriya M, et al. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem*. Jul 15 1996;239(2):494-500.
67. Elliott S, Busse L, Bass MB, et al. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood*. Mar 1 2006;107(5):1892-1895.
68. Kirkeby A, van Beek J, Nielsen J, et al. Functional and immunochemical characterisation of different antibodies against the erythropoietin receptor. *J Neurosci Methods*. Aug 15 2007;164(1):50-58.
69. Sinclair AM, Coxon A, McCaffery I, et al. Functional erythropoietin receptor is undetectable in endothelial, cardiac, neuronal, and renal cells. *Blood*. Feb 2.
70. Swift S, Ellison AR, Kassner P, et al. Absence of functional EpoR expression in human tumor cell lines. *Blood*. Feb 2.
71. Ghezzi P, Bernaudinb M, Bianchi R, et al. Erythropoietin: not just about erythropoiesis. *Lancet*. Jun 19;375(9732):2142.
72. Um M, Gross AW, Lodish HF. A "classical" homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cell Signal*. Mar 2007;19(3):634-645.
73. Yu X, Lin CS, Costantini F, et al. The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse. *Blood*. Jul 15 2001;98(2):475-477.

74. Suzuki N, Ohneda O, Takahashi S, et al. Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood*. Oct 1 2002;100(7):2279-2288.
75. Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol*. Apr 2008;141(1):14-31.
76. Sterin-Borda L, Wald M, Gutnisky A, et al. Myocardial mitogenic effect of erythropoietin through the activation of Na(+)-K(+)-ATPase activity. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*. 1994;44(1-2):1-10.
77. Stuckmann I, Evans S, Lassar AB. Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol*. Mar 15 2003;255(2):334-349.
78. Nishiya D, Omura T, Shimada K, et al. Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci*. May 2006;101(1):31-39.
79. Camici GG, Stallmach T, Hermann M, et al. Constitutively overexpressed erythropoietin reduces infarct size in a mouse model of permanent coronary artery ligation. *Methods Enzymol*. 2007;435:147-155.
80. Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, et al. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 8 2005;102(6):2046-2051.
81. Li Y, Takemura G, Okada H, et al. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovasc Res*. Sep 1 2006;71(4):684-694.
82. van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, et al. Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. Jul 5 2005;46(1):125-133.
83. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 15 2003;100(8):4802-4806.
84. Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, et al. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*. Oct 1 2006;72(1):51-59.
85. Liu X, Xie W, Liu P, et al. Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci*. Apr 4 2006;78(19):2255-2264.
86. Liu X, Zhou Z, Feng X, et al. Cyclooxygenase-2 plays an essential part in cardioprotection of delayed phase of recombinant human erythropoietin preconditioning in rats. *Postgrad Med J*. Sep 2006;82(971):588-593.
87. Li L, Takemura G, Li Y, et al. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation*. Jan 31 2006;113(4):535-543.
88. Chen X, Chen Y, Bi Y, et al. Preventive cardioprotection of erythropoietin against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther*. Oct 2007;21(5):367-374.
89. Mengozzi M, Latini R, Salio M, et al. Increased erythropoietin production after myocardial infarction in mice. *Heart*. Jun 2006;92(6):838-839.
90. Lin JS, Chen YS, Chiang HS, et al. Hypoxic preconditioning protects rat hearts against ischaemia-reperfusion injury: role of erythropoietin on progenitor cell mobilization. *J Physiol*. Dec 1 2008;586(Pt 23):5757-5769.
91. Rui T, Feng Q, Lei M, et al. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res*. Feb 15 2005;65(3):719-727.

92. Kobayashi S, Lackey T, Huang Y, et al. Transcription factor gata4 regulates cardiac BCL2 gene expression in vitro and in vivo. *Faseb J*. Apr 2006;20(6):800-802.
93. Shan X, Xu X, Cao B, et al. Transcription factor GATA-4 is involved in erythropoietin-induced cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol*. May 29 2009;134(3):384-392.
94. Aries A, Paradis P, Lefebvre C, et al. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 4 2004;101(18):6975-6980.
95. Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, et al. Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J Clin Invest*. Nov 2007;117(11):3198-3210.
96. Kitta K, Day RM, Kim Y, et al. Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells. *J Biol Chem*. Feb 14 2003;278(7):4705-4712.
97. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. Feb 1 2004;103(3):921-926.
98. George J, Goldstein E, Abashidze A, et al. Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner. *Cardiovasc Res*. Nov 1 2005;68(2):299-306.
99. Hamed S, Barshack I, Luboshits G, et al. Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur Heart J*. Aug 2006;27(15):1876-1883.
100. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. Aug 15 2003;102(4):1340-1346.
101. Urao N, Okigaki M, Yamada H, et al. Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. *Circ Res*. Jun 9 2006;98(11):1405-1413.
102. Westenbrink BD, Lipsic E, van der Meer P, et al. Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization. *Eur Heart J*. Aug 2007;28(16):2018-2027.
103. Olson RD, Mushlin PS. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *Faseb J*. Oct 1990;4(13):3076-3086.
104. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med*. Sep 24 1998;339(13):900-905.
105. Iliskovic N, Singal PK. Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin-induced heart failure. *Am J Pathol*. Feb 1997;150(2):727-734.
106. Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK. Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation*. Jun 1994;89(6):2829-2835.
107. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol*. Apr 1996;27(5):1201-1206.
108. Valdes Olmos RA, ten Bokkel Huinink WW, ten Hoeve RF, et al. Assessment of anthracycline-related myocardial adrenergic derangement by [¹²³I]metaiodobenzylguanidine scintigraphy. *Eur J Cancer*. 1995;31A(1):26-31.
109. Wang YX, Korth M. Effects of doxorubicin on excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocardium. *Circ Res*. Apr 1995;76(4):645-653.

110. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, et al. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res.* Aug 15 2002;62(16):4592-4598.
111. Kluza J, Marchetti P, Gallego MA, et al. Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells. *Oncogene.* Sep 16 2004;23(42):7018-7030.
112. Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci.* Jun 2006;101(2):151-158.
113. Morimoto T, Fujita M, Kawamura T, et al. Myocardial regulation of p300 and p53 by doxorubicin involves ubiquitin pathways. *Circ J.* Sep 2008;72(9):1506-1511.
114. Ferrario M, Arbustini E, Massa M, et al. High-dose erythropoietin in patients with acute myocardial infarction: A pilot, randomised, placebo-controlled study. *Int J Cardiol.* Nov 9 2009.
115. Liem A, van de Woestijne AP, Bruijns E, et al. Effect of EPO administration on myocardial infarct size in patients with non-STE acute coronary syndromes; results from a pilot study. *Int J Cardiol.* Jan 9 2009;131(2):285-287.
116. Lipsic E, van der Meer P, Voors AA, et al. A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc Drugs Ther.* Apr 2006;20(2):135-141.
117. Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY, et al. A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *N Engl J Med.* Nov 19 2009;361(21):2019-2032.
118. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke.* Dec 2009;40(12):e647-656.
119. Fuste B, Serradell M, Escolar G, et al. Erythropoietin triggers a signaling pathway in endothelial cells and increases the thrombogenicity of their extracellular matrices in vitro. *Thromb Haemost.* Oct 2002;88(4):678-685.
120. Reddy MK, Vasir JK, Hegde GV, et al. Erythropoietin induces excessive neointima formation: a study in a rat carotid artery model of vascular injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* Sep 2007;12(3):237-247.
121. Chin K, Oda N, Shen K, et al. Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor gene by proteins binding to GATA-1 and Sp1 motifs. *Nucleic Acids Res.* Aug 11 1995;23(15):3041-3049.
122. Maouche L, Cartron JP, Chretien S. Different domains regulate the human erythropoietin receptor gene transcription. *Nucleic Acids Res.* Feb 11 1994;22(3):338-346.
123. Chiba T, Ikawa Y, Todokoro K. GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA-1 gene expression. *Nucleic Acids Res.* Jul 25 1991;19(14):3843-3848.
124. Patient RK, McGhee JD. The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev.* Aug 2002;12(4):416-422.
125. Dynan WS, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell.* Nov 1983;35(1):79-87.
126. Suske G, Bruford E, Philipsen S. Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics.* May 2005;85(5):551-556.
127. Kirschner KM, Hagen P, Hussels CS, et al. The Wilms' tumor suppressor Wt1 activates transcription of the erythropoietin receptor in hematopoietic progenitor cells. *Faseb J.* Aug 2008;22(8):2690-2701.

128. Raich N, Romeo PH. Erythroid regulatory elements. *Stem Cells*. Mar 1993;11(2):95-104.
129. Noguchi CT, Bae KS, Chin K, et al. Cloning of the human erythropoietin receptor gene. *Blood*. Nov 15 1991;78(10):2548-2556.
130. Lavalley G, Andelfinger G, Nadeau M, et al. The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *Embo J*. Nov 1 2006;25(21):5201-5213.
131. Zhang P, Basu P, Redmond LC, et al. A functional screen for Kruppel-like factors that regulate the human gamma-globin gene through the CACCC promoter element. *Blood Cells Mol Dis*. Sep-Oct 2005;35(2):227-235.
132. Heberlein C, Fischer KD, Stoffel M, et al. The gene for erythropoietin receptor is expressed in multipotential hematopoietic and embryonal stem cells: evidence for differentiation stage-specific regulation. *Mol Cell Biol*. Apr 1992;12(4):1815-1826.
133. Wallach I, Zhang J, Hartmann A, et al. Erythropoietin-receptor gene regulation in neuronal cells. *Pediatr Res*. Jun 2009;65(6):619-624.
134. Satoh K, Kagaya Y, Nakano M, et al. Important role of endogenous erythropoietin system in recruitment of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Circulation*. Mar 21 2006;113(11):1442-1450.
135. Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, et al. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood*. Oct 1 2004;104(7):2073-2080.
136. Acs G, Acs P, Beckwith SM, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res*. May 1 2001;61(9):3561-3565.
137. Mohyeldin A, Lu H, Dalgard C, et al. Erythropoietin signaling promotes invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. May 2005;7(5):537-543.
138. Lam SY, Tipoe GL, Fung ML. Upregulation of erythropoietin and its receptor expression in the rat carotid body during chronic and intermittent hypoxia. *Adv Exp Med Biol*. 2009;648:207-214.
139. Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. Feb 2002;13(1):29-37.
140. Semenza GL. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*. Oct 5 2001;107(1):1-3.
141. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J*. Aug 2002;16(10):1151-1162.
142. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. Nov 9 2001;294(5545):1337-1340.
143. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. Oct 5 2001;107(1):43-54.
144. Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, et al. Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 16 2002;296(2):343-349.
145. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, et al. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. Jun 15 2002;16(12):1466-1471.
146. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*. Feb 1 2002;295(5556):858-861.

147. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* Oct 15 2001;15(20):2675-2686.
148. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* Apr 20 2001;292(5516):464-468.
149. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* Apr 20 2001;292(5516):468-472.
150. Masson N, Willam C, Maxwell PH, et al. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J.* Sep 17 2001;20(18):5197-5206.
151. Graven KK, Yu Q, Pan D, et al. Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta.* Oct 28 1999;1447(2-3):208-218.
152. Lu S, Gu X, Hoestje S, et al. Identification of an additional hypoxia responsive element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Biochim Biophys Acta.* Mar 19 2002;1574(2):152-156.
153. Wagner KD, Wagner N, Wellmann S, et al. Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Faseb J.* Jul 2003;17(10):1364-1366.
154. Simon MP, Tournaire R, Pouyssegur J. The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J Cell Physiol.* Dec 2008;217(3):809-818.
155. Zhu H, Jackson T, Bunn HF. Detecting and responding to hypoxia. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 Suppl 1:3-7.
156. Lowry JA, Atchley WR. Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J Mol Evol.* Feb 2000;50(2):103-115.
157. Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene.* May 13 2002;21(21):3368-3376.
158. Ohneda K, Yamamoto M. Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol.* 2002;108(4):237-245.
159. Rothenberg EV. T-lineage specification and commitment: a gene regulation perspective. *Semin Immunol.* Dec 2002;14(6):431-440.
160. nArceci RJ, King AA, Simon MC, et al. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol.* Apr 1993;13(4):2235-2246.
161. Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, et al. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem.* Sep 16 1994;269(37):23177-23184.
162. Morrisey EE, Ip HS, Lu MM, et al. GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev Biol.* Jul 10 1996;177(1):309-322.
163. Morrisey EE, Ip HS, Tang Z, et al. GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev Biol.* Mar 1 1997;183(1):21-36.
164. Molkenstin JD, Tymitz KM, Richardson JA, et al. Abnormalities of the genitourinary tract in female mice lacking GATA5. *Mol Cell Biol.* Jul 2000;20(14):5256-5260.

165. Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* Apr 15 1997;11(8):1048-1060.
166. Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, et al. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* Apr 15 1997;11(8):1061-1072.
167. Morrisey EE, Tang Z, Sigrist K, et al. GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* Nov 15 1998;12(22):3579-3590.
168. Charron F, Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol.* Feb 1999;10(1):85-91.
169. Heikinheimo M, Scandrett JM, Wilson DB. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev Biol.* Aug 1994;164(2):361-373.
170. Pu WT, Ishiwata T, Juraszek AL, et al. GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis. *Dev Biol.* Nov 1 2004;275(1):235-244.
171. Huggon IC, Davies A, Gove C, et al. Molecular cloning of human GATA-6 DNA binding protein: high levels of expression in heart and gut. *Biochim Biophys Acta.* Aug 7 1997;1353(2):98-102.
172. Narita N, Heikinheimo M, Bielinska M, et al. The gene for transcription factor GATA-6 resides on mouse chromosome 18 and is expressed in myocardium and vascular smooth muscle. *Genomics.* Sep 1 1996;36(2):345-348.
173. Suzuki E, Evans T, Lowry J, et al. The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals. *Genomics.* Dec 15 1996;38(3):283-290.
174. Charron F, Paradis P, Bronchain O, et al. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol.* Jun 1999;19(6):4355-4365.
175. Grepin C, Robitaille L, Antakly T, et al. Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol.* Aug 1995;15(8):4095-4102.
176. Grepin C, Nemer G, Nemer M. Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development.* Jun 1997;124(12):2387-2395.
177. Bisping E, Ikeda S, Kong SW, et al. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 26 2006;103(39):14471-14476.
178. Crispino JD, Lodish MB, Thurberg BL, et al. Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev.* Apr 1 2001;15(7):839-844.
179. Jay PY, Bielinska M, Erlich JM, et al. Impaired mesenchymal cell function in Gata4 mutant mice leads to diaphragmatic hernias and primary lung defects. *Dev Biol.* Jan 15 2007;301(2):602-614.
180. Oka T, Maillet M, Watt AJ, et al. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res.* Mar 31 2006;98(6):837-845.
181. Watt AJ, Battle MA, Li J, et al. GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 24 2004;101(34):12573-12578.

182. Zeisberg EM, Ma Q, Juraszek AL, et al. Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *J Clin Invest.* Jun 2005;115(6):1522-1531.
183. Garg V, Kathiriya IS, Barnes R, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature.* Jul 24 2003;424(6947):443-447.
184. Nemer G, Fadlalah F, Usta J, et al. A novel mutation in the GATA4 gene in patients with Tetralogy of Fallot. *Hum Mutat.* Mar 2006;27(3):293-294.
185. Pehlivan T, Pober BR, Brueckner M, et al. GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *Am J Med Genet.* Mar 19 1999;83(3):201-206.
186. Srivastava D, Olson EN. A genetic blueprint for cardiac development. *Nature.* Sep 14 2000;407(6801):221-226.
187. Whyatt DJ, deBoer E, Grosveld F. The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *Embo J.* Dec 15 1993;12(13):4993-5005.
188. Yang HY, Evans T. Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Mol Cell Biol.* Oct 1992;12(10):4562-4570.
189. Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, et al. GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *J Biol Chem.* Mar 28 1997;272(13):8515-8524.
190. Arceci RJ, King AA, Simon MC, et al. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol.* Apr 1993;13(4):2235-2246.
191. Angello JC, Kaestner S, Welikson RE, et al. BMP induction of cardiogenesis in P19 cells requires prior cell-cell interaction(s). *Dev Dyn.* Aug 2006;235(8):2122-2133.
192. Ghatpande S, Ghatpande A, Zile M, et al. Anterior endoderm is sufficient to rescue foregut apoptosis and heart tube morphogenesis in an embryo lacking retinoic acid. *Dev Biol.* Mar 1 2000;219(1):59-70.
193. Makita T, Duncan SA, Sucov HM. Retinoic acid, hypoxia, and GATA factors cooperatively control the onset of fetal liver erythropoietin expression and erythropoietic differentiation. *Dev Biol.* Apr 1 2005;280(1):59-72.
194. Burch JB. Regulation of GATA gene expression during vertebrate development. *Semin Cell Dev Biol.* Feb 2005;16(1):71-81.
195. Molkentin JD, Antos C, Mercer B, et al. Direct activation of a GATA6 cardiac enhancer by Nkx2.5: evidence for a reinforcing regulatory network of Nkx2.5 and GATA transcription factors in the developing heart. *Dev Biol.* Jan 15 2000;217(2):301-309.
196. Ohara Y, Atarashi T, Ishibashi T, et al. GATA-4 gene organization and analysis of its promoter. *Biol Pharm Bull.* Mar 2006;29(3):410-419.
197. Hautala N, Tokola H, Luodonpaa M, et al. Pressure overload increases GATA4 binding activity via endothelin-1. *Circulation.* Feb 6 2001;103(5):730-735.
198. Saadane N, Alpert L, Chalifour LE. Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *Br J Pharmacol.* Jul 1999;127(5):1165-1176.
199. Morimoto T, Hasegawa K, Kaburagi S, et al. Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* May 5 2000;275(18):13721-13726.
200. Kitta K, Clement SA, Remeika J, et al. Endothelin-1 induces phosphorylation of GATA-4 transcription factor in the HL-1 atrial-muscle cell line. *Biochem J.* Oct 15 2001;359(Pt 2):375-380.

201. Hautala N, Tenhunen O, Szokodi I, et al. Direct left ventricular wall stretch activates GATA4 binding in perfused rat heart: involvement of autocrine/paracrine pathways. *Pflugers Arch.* Jan 2002;443(3):362-369.
202. Roggia C, Ukena C, Bohm M, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) enhances cardiac commitment of differentiating embryonic stem cells by activating PI3 kinase. *Exp Cell Res.* Mar 10 2007;313(5):921-930.
203. Liang Q, Wiese RJ, Bueno OF, et al. The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol.* Nov 2001;21(21):7460-7469.
204. Suzuki YJ. Stress-induced activation of GATA-4 in cardiac muscle cells. *Free Radic Biol Med.* Jun 15 2003;34(12):1589-1598.
205. Charron F, Tsimiklis G, Arcand M, et al. Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev.* Oct 15 2001;15(20):2702-2719.
206. Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* Oct 1998;76(11):725-746.
207. Morisco C, Seta K, Hardt SE, et al. Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* Jul 27 2001;276(30):28586-28597.
208. Tremblay JJ, Viger RS. Transcription factor GATA-4 is activated by phosphorylation of serine 261 via the cAMP/protein kinase a signaling pathway in gonadal cells. *J Biol Chem.* Jun 13 2003;278(24):22128-22135.
209. Dai YS, Markham BE. p300 Functions as a coactivator of transcription factor GATA-4. *J Biol Chem.* Oct 5 2001;276(40):37178-37185.
210. Yanazume T, Hasegawa K, Morimoto T, et al. Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Mol Cell Biol.* May 2003;23(10):3593-3606.
211. Takaya T, Kawamura T, Morimoto T, et al. Identification of p300-targeted acetylated residues in GATA4 during hypertrophic responses in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* Apr 11 2008;283(15):9828-9835.
212. Wang J, Feng XH, Schwartz RJ. SUMO-1 modification activated GATA4-dependent cardiogenic gene activity. *J Biol Chem.* Nov 19 2004;279(47):49091-49098.
213. Searcy RD, Vincent EB, Liberatore CM, et al. A GATA-dependent nkx-2.5 regulatory element activates early cardiac gene expression in transgenic mice. *Development.* Nov 1998;125(22):4461-4470.
214. Lien CL, Wu C, Mercer B, et al. Control of early cardiac-specific transcription of Nkx2-5 by a GATA-dependent enhancer. *Development.* Jan 1999;126(1):75-84.
215. McFadden DG, Charite J, Richardson JA, et al. A GATA-dependent right ventricular enhancer controls dHAND transcription in the developing heart. *Development.* Dec 2000;127(24):5331-5341.
216. Molkenstin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol.* Jul 1994;14(7):4947-4957.
217. Ip HS, Wilson DB, Heikinheimo M, et al. The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle-specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells. *Mol Cell Biol.* Nov 1994;14(11):7517-7526.
218. Murphy AM, Thompson WR, Peng LF, et al. Regulation of the rat cardiac troponin I gene by the transcription factor GATA-4. *Biochem J.* Mar 1 1997;322 (Pt 2):393-401.

219. Di Lisi R, Millino C, Calabria E, et al. Combinatorial cis-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. Sep 25 1998;273(39):25371-25380.
220. Bhavsar PK, Dellow KA, Yacoub MH, et al. Identification of cis-acting DNA elements required for expression of the human cardiac troponin I gene promoter. *J Mol Cell Cardiol*. Jan 2000;32(1):95-108.
221. McGrew MJ, Bogdanova N, Hasegawa K, et al. Distinct gene expression patterns in skeletal and cardiac muscle are dependent on common regulatory sequences in the MLC1/3 locus. *Mol Cell Biol*. Aug 1996;16(8):4524-4534.
222. Bhalla SS, Robitaille L, Nemer M. Cooperative activation by GATA-4 and YY1 of the cardiac B-type natriuretic peptide promoter. *J Biol Chem*. Apr 6 2001;276(14):11439-11445.
223. Durocher D, Charron F, Warren R, et al. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *Embo J*. Sep 15 1997;16(18):5687-5696.
224. Grepin C, Dagnino L, Robitaille L, et al. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol*. May 1994;14(5):3115-3129.
225. Pan J, Hinzmann B, Yan W, et al. Genomic structures of the human and murine corin genes and functional GATA elements in their promoters. *J Biol Chem*. Oct 11 2002;277(41):38390-38398.
226. Thuerauf DJ, Hanford DS, Glembotski CC. Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *J Biol Chem*. Jul 8 1994;269(27):17772-17775.
227. Cheng G, Hagen TP, Dawson ML, et al. The role of GATA, CArG, E-box, and a novel element in the regulation of cardiac expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger gene. *J Biol Chem*. Apr 30 1999;274(18):12819-12826.
228. Herzig TC, Jobe SM, Aoki H, et al. Angiotensin II type1a receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 8 1997;94(14):7543-7548.
229. Koban MU, Brugh SA, Riordon DR, et al. A distant upstream region of the rat multipartite Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchanger NCX1 gene promoter is sufficient to confer cardiac-specific expression. *Mech Dev*. Dec 2001;109(2):267-279.
230. Weidenfeld J, Shu W, Zhang L, et al. The WNT7b promoter is regulated by TTF-1, GATA6, and Foxa2 in lung epithelium. *J Biol Chem*. Jun 7 2002;277(23):21061-21070.
231. Valin A, Cook JD, Ross S, et al. Sp1 and Sp3 regulate transcription of the cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit 2 (p39) promoter in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta*. Mar 2009;1789(3):204-211.
232. Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 17 1998;95(6):2979-2984.
233. White SM, Constantin PE, Claycomb WC. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2004;286(3):H823-829.
234. Corre S, Galibert MD. Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res*. Oct 2005;18(5):337-348.
235. Scholz H, Wagner KD, Wagner N. Role of the Wilms' tumour transcription factor, Wt1, in blood vessel formation. *Pflugers Arch*. Jun 2009;458(2):315-323.
236. Dai YS, Cserjesi P, Markham BE, et al. The transcription factors GATA4 and dHAND physically interact to synergistically activate cardiac gene expression

- through a p300-dependent mechanism. *J Biol Chem.* Jul 5 2002;277(27):24390-24398.
237. Hirai M, Ono K, Morimoto T, et al. FOG-2 competes with GATA-4 for transcriptional coactivator p300 and represses hypertrophic responses in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* Sep 3 2004;279(36):37640-37650.
238. Lee Y, Shioi T, Kasahara H, et al. The cardiac tissue-restricted homeobox protein Csx/Nkx2.5 physically associates with the zinc finger protein GATA4 and cooperatively activates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Cell Biol.* Jun 1998;18(6):3120-3129.
239. Durocher D, Nemer M. Combinatorial interactions regulating cardiac transcription. *Dev Genet.* 1998;22(3):250-262.
240. Cantor AB, Orkin SH. Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. *Semin Cell Dev Biol.* Feb 2005;16(1):117-128.
241. Lu JR, McKinsey TA, Xu H, et al. FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol Cell Biol.* Jun 1999;19(6):4495-4502.
242. Svensson EC, Huggins GS, Dardik FB, et al. A functionally conserved N-terminal domain of the friend of GATA-2 (FOG-2) protein represses GATA4-dependent transcription. *J Biol Chem.* Jul 7 2000;275(27):20762-20769.
243. Tevosian SG, Deconinck AE, Cantor AB, et al. FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 2 1999;96(3):950-955.
244. Aki T, Yanagisawa S, Akanuma H. Identification and characterization of positive regulatory elements in the human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *J Biochem.* Aug 1997;122(2):271-278.
245. Elliott S, Busse L, McCaffery I, et al. Identification of a sensitive anti-erythropoietin receptor monoclonal antibody allows detection of low levels of EpoR in cells. *J Immunol Methods.* Jan 31;352(1-2):126-139.
246. Zhao R, Watt AJ, Battle MA, et al. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Dev Biol.* May 15 2008;317(2):614-619.
247. Peterkin T, Gibson A, Patient R. Redundancy and evolution of GATA factor requirements in development of the myocardium. *Dev Biol.* Nov 15 2007;311(2):623-635.
248. Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ. Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clin Chim Acta.* Sep 2008;395(1-2):6-13.
249. McCaffrey TA, Pomerantz KB, Sanborn TA, et al. Specific inhibition of eIF-5A and collagen hydroxylation by a single agent. Antiproliferative and fibrosuppressive effects on smooth muscle cells from human coronary arteries. *J Clin Invest.* Feb 1995;95(2):446-455.
250. Warnecke C, Griethe W, Weidemann A, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors. *Faseb J.* Jun 2003;17(9):1186-1188.
251. Li N, Yi F, Sundry CM, et al. Expression and actions of HIF prolyl-4-hydroxylase in the rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jan 2007;292(1):F207-216.
252. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* Sep 1996;16(9):4604-4613.

253. Imagawa S, Suzuki N, Ohmine K, et al. GATA suppresses erythropoietin gene expression through GATA site in mouse erythropoietin gene promoter. *Int J Hematol.* May 2002;75(4):376-381.
254. Imagawa S, Yamamoto M, Miura Y. Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors. *Blood.* Feb 15 1997;89(4):1430-1439.
255. Obara N, Suzuki N, Kim K, et al. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood.* May 15 2008;111(10):5223-5232.
256. Dame C, Kirschner KM, Bartz KV, et al. Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood.* Jun 1 2006;107(11):4282-4290.
257. Dame C, Sola MC, Lim KC, et al. Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J Biol Chem.* Jan 23 2004;279(4):2955-2961.
258. Imagawa S, Nakano Y, Obara N, et al. A GATA-specific inhibitor (K-7174) rescues anemia induced by IL-1beta, TNF-alpha, or L-NMMA. *Faseb J.* Sep 2003;17(12):1742-1744.
259. Yin H, Blanchard KL. DNA methylation represses the expression of the human erythropoietin gene by two different mechanisms. *Blood.* Jan 1 2000;95(1):111-119.
260. Rossler J, Stolze I, Frede S, et al. Hypoxia-induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site. *J Cell Biochem.* Sep 1 2004;93(1):153-161.
261. Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, et al. Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *Eur J Biochem.* May 1 1998;253(3):771-777.
262. Fluck CE, Miller WL. GATA-4 and GATA-6 modulate tissue-specific transcription of the human gene for P450c17 by direct interaction with Sp1. *Mol Endocrinol.* May 2004;18(5):1144-1157.
263. Merika M, Orkin SH. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol.* May 1995;15(5):2437-2447.
264. Kiela PR, LeSueur J, Collins JF, et al. Transcriptional regulation of the rat NHE3 gene. Functional interactions between GATA-5 and Sp family transcription factors. *J Biol Chem.* Feb 21 2003;278(8):5659-5668.
265. Chalkley GE, Verrijzer CP. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *Embo J.* Sep 1 1999;18(17):4835-4845.
266. Verrijzer CP, Chen JL, Yokomori K, et al. Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell.* Jun 30 1995;81(7):1115-1125.
267. Dunah AW, Jeong H, Griffin A, et al. Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science.* Jun 21 2002;296(5576):2238-2243.
268. Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol.* Mar 1994;14(3):1582-1593.
269. Gill G, Pascal E, Tseng ZH, et al. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 4 1994;91(1):192-196.

270. Torigoe T, Izumi H, Yoshida Y, et al. Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP. *Nucleic Acids Res.* Aug 1 2003;31(15):4523-4530.
271. Chiang CM, Roeder RG. Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science.* Jan 27 1995;267(5197):531-536.
272. Colgan J, Manley JL. Cooperation between core promoter elements influences transcriptional activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 14 1995;92(6):1955-1959.
273. Dorris DR, Struhl K. Artificial recruitment of TFIID, but not RNA polymerase II holoenzyme, activates transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* Jun 2000;20(12):4350-4358.
274. McBride K, Charron F, Lefebvre C, et al. Interaction with GATA transcription factors provides a mechanism for cell-specific effects of c-Fos. *Oncogene.* Nov 20 2003;22(52):8403-8412.
275. Nemer M, Horb ME. The KLF family of transcriptional regulators in cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Cell Cycle.* Jan 15 2007;6(2):117-121.
276. Morin S, Charron F, Robitaille L, et al. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *Embo J.* May 2 2000;19(9):2046-2055.
277. Molkenkin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* Apr 17 1998;93(2):215-228.
278. Sepulveda JL, Belaguli N, Nigam V, et al. GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression. *Mol Cell Biol.* Jun 1998;18(6):3405-3415.
279. Clabby ML, Robison TA, Quigley HF, et al. Retinoid X receptor alpha represses GATA-4-mediated transcription via a retinoid-dependent interaction with the cardiac-enriched repressor FOG-2. *J Biol Chem.* Feb 21 2003;278(8):5760-5767.
280. Brown CO, 3rd, Chi X, Garcia-Gras E, et al. The cardiac determination factor, Nkx2-5, is activated by mutual cofactors GATA-4 and Smad1/4 via a novel upstream enhancer. *J Biol Chem.* Mar 12 2004;279(11):10659-10669.
281. Morin S, Paradis P, Aries A, et al. Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Mol Cell Biol.* Feb 2001;21(4):1036-1044.
282. Gordon S, Akopyan G, Garban H, et al. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene.* Feb 23 2006;25(8):1125-1142.
283. Kim JD, Faulk C, Kim J. Retroposition and evolution of the DNA-binding motifs of YY1, YY2 and REX1. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(10):3442-3452.
284. Nguyen N, Zhang X, Olashaw N, et al. Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2. *J Biol Chem.* Jun 11 2004;279(24):25927-25934.
285. Seto E, Lewis B, Shenk T. Interaction between transcription factors Sp1 and YY1. *Nature.* Sep 30 1993;365(6445):462-464.
286. Chan HM, La Thangue NB. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci.* Jul 2001;114(Pt 13):2363-2373.
287. Kalkhoven E. CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol.* Sep 15 2004;68(6):1145-1155.
288. Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem.* Apr 27 2001;276(17):13505-13508.
289. Bungert J, Kober I, Düring F, et al. Transcription factor eUSF is an essential component of isolated transcription complexes on the duck histone H5 gene and it

- mediates the interaction of TFIID with a TATA-deficient promoter. *J Mol Biol.* Feb 20 1992;223(4):885-898.
290. Ge Y, Jensen TL, Matherly LH, et al. Physical and functional interactions between USF and Sp1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity. *J Biol Chem.* Dec 12 2003;278(50):49901-49910.
291. Han SY, Kim JC, Suh JM, et al. Cell type-dependent regulation of human DNA topoisomerase III alpha gene expression by upstream stimulatory factor 2. *FEBS Lett.* Sep 7 2001;505(1):57-62.
292. West AG, Huang S, Gaszner M, et al. Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol Cell.* Nov 5 2004;16(3):453-463.
293. Kasahara H, Usheva A, Ueyama T, et al. Characterization of homo- and heterodimerization of cardiac Csx/Nkx2.5 homeoprotein. *J Biol Chem.* Feb 16 2001;276(7):4570-4580.
294. Shiojima I, Komuro I, Oka T, et al. Context-dependent transcriptional cooperation mediated by cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *J Biol Chem.* Mar 19 1999;274(12):8231-8239.
295. Robert NM, Tremblay JJ, Viger RS. Friend of GATA (FOG)-1 and FOG-2 differentially repress the GATA-dependent activity of multiple gonadal promoters. *Endocrinology.* Oct 2002;143(10):3963-3973.
296. Svensson EC, Tufts RL, Polk CE, et al. Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 2 1999;96(3):956-961.
297. Park AM, Nagase H, Kumar SV, et al. Effects of intermittent hypoxia on the heart. *Antioxid Redox Signal.* Jun 2007;9(6):723-729.
298. Park AM, Nagase H, Vinod Kumar S, et al. Acute intermittent hypoxia activates myocardial cell survival signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Feb 2007;292(2):H751-757.
299. Suzuki YJ, Nagase H, Day RM, et al. GATA-4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart. *J Mol Cell Cardiol.* Dec 2004;37(6):1195-1203.
300. Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, et al. The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res.* Nov 25 1995;23(22):4542-4550.
301. Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, et al. The hypoxia-inducible factor-1 DNA recognition site is cAMP-responsive. *Kidney Int.* Feb 1997;51(2):564-566.
302. Hu B, Wright E, Campbell L, et al. In vivo analysis of DNA-protein interactions on the human erythropoietin enhancer. *Mol Cell Biol.* Feb 1997;17(2):851-856.
303. Lisy K, Peet DJ. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ.* Apr 2008;15(4):642-649.
304. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, et al. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J Biol Chem.* Apr 20 2001;276(16):12645-12653.
305. Arany Z, Huang LE, Eckner R, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 12 1996;93(23):12969-12973.
306. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol.* Jul 1998;18(7):4089-4096.
307. Ema M, Hirota K, Mimura J, et al. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J.* Apr 1 1999;18(7):1905-1914.

308. Gu J, Milligan J, Huang LE. Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1alpha -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine. *J Biol Chem*. Feb 2 2001;276(5):3550-3554.
309. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Embo J*. Nov 16 1998;17(22):6573-6586.
310. Stockmann C, Fandrey J. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Oct 2006;33(10):968-979.
311. Neumann D, Wikstrom L, Watowich SS, et al. Intermediates in degradation of the erythropoietin receptor accumulate and are degraded in lysosomes. *J Biol Chem*. Jun 25 1993;268(18):13639-13649.
312. Avivi A, Resnick MB, Nevo E, et al. Adaptive hypoxic tolerance in the subterranean mole rat *Spalax ehrenbergi*: the role of vascular endothelial growth factor. *FEBS Lett*. Jun 11 1999;452(3):133-140.
313. Kleinschmidt T, Nevo E, Braunitzer G. The primary structure of the hemoglobin of the mole rat (*Spalax ehrenbergi*, rodentia, chromosome species 60). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. May 1984;365(5):531-537.
314. Ravid O, Shams I, Ben Califa N, et al. An extracellular region of the erythropoietin receptor of the subterranean blind mole rat *Spalax* enhances receptor maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 4 2007;104(36):14360-14365.
315. Shams I, Avivi A, Nevo E. Hypoxic stress tolerance of the blind subterranean mole rat: expression of erythropoietin and hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 29 2004;101(26):9698-9703.
316. Fujita M, Takahashi R, Liang P, et al. Role of alternative splicing of the rat erythropoietin receptor gene in normal and erythroleukemia cells. *Leukemia*. Apr 1997;11 Suppl 3:444-445.
317. Soliz J, Gassmann M, Joseph V. Soluble erythropoietin receptor is present in the mouse brain and is required for the ventilatory acclimatization to hypoxia. *J Physiol*. Aug 15 2007;583(Pt 1):329-336.
318. Kirschner KM, Wagner N, Wagner KD, et al. The Wilms tumor suppressor Wt1 promotes cell adhesion through transcriptional activation of the alpha4integrin gene. *J Biol Chem*. Oct 20 2006;281(42):31930-31939.
319. Martinez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet*. Jan;42(1):89-93.
320. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*. Jul 3 2008;454(7200):109-113.
321. Takano Y, Hiramatsu N, Okamura M, et al. Suppression of cytokine response by GATA inhibitor K-7174 via unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 24 2007;360(2):470-475.

Aus Datenschutzgründen wurde der Lebenslauf entfernt.

10. Publikationen und Konferenzbeiträge

In Fachzeitschriften

S. von Salisch, M. Klar, B.Thurisch, J. Bungert, Dame C. Gata4 and Sp1 regulate the erythropoietin receptor expression in cardiomyocytes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine. Accepted.* DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01193.x

Konferenzbeiträge

S. von Salisch, M. Klar, B.Thurisch, J. Bungert, Dame C.
Gata4 regulates the erythropoietin receptor expression in cardiomyocytes.
8th International Lübeck Conference on the Pathophysiology and Pharmacology of
Erythropoietin and other Hematopoietic Growth Factors
Lübeck, Germany 30.7. - 1.8.2009

S. von Salisch, M. Klar, B.Thurisch, J. Bungert, Dame C.
Gata4 regulates the erythropoietin receptor expression in cardiomyocytes.
20th European Students´ Conference
Berlin, Germany 4.10. - 7.10.2009