

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Tübingen
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle
Therapie
Leiter: Professor Dr. H. Oßwald**

**Erythropoetin-Sekretion in Ekto-5'-
Nukleotidase (CD73)-Knockout-Mäusen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Simone Corinna von Wietersheim
aus
Windhoek (Namibia)**

2007

Dekan:	Professor Dr. I. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Oßwald
2. Berichterstatter:	Professor Dr. T. Risler

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
Ado	Adenosin
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
AMV	Avian myoblastosis virus
AOPCP	α,β -Methylenadenosin 5' diphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
ARNT	Aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator
AR	Adenosin-Rezeptor
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BFU-E	Burst-forming unit erythroid
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CD 73	Ekto5'-Nukleotidase
CFU-E	Colony-forming unit erythroid
CGS-21680	2-(p-[2-Carbonyl-ethyl]-phenylethylamino)-5'-N-ethylcarbox-amidoadenosin
CHA	N6'-Cyclohexyladenosin
CO	Kohlenmonoxid
CPA	N6'-Cyclopentyladenosin
C _t	Threshold cycle
DAG	Diazylglyzerin
dd H ₂ O	DNase und RNase freies und steriles H ₂ O
DMPX	3,7-Dimethyl-1-Propargylxanthin
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropyl-xanthin
DPMA	N ⁶ -(2(3,5-dimethoxyphenyl)-2-(2-methylphenyl)ethyl)-adenosin
EHNA	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin-hydrochlorid

Ekto5´-NT	Ekto-5´-Nukleotidase
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoetin
FIH	Asparaginyhydroxylasen
x g	xfache Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
HCl	Hydrogeniumchlorid (Salzsäure)
HIF	Hypoxia inducible factor
HWZ	Halbwertszeit
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IGF-1	Insulin-like growth factor-type 1
IL	Interleukin
IMP	Inosin-Monophosphat
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IU	International units
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimol
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NECA	5´-N-Ethylcarboxamido-Adenosin
NESP	novel erythropoiesis stimulating protein / Darbepoietin
NT	Nucleotidase
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
Pol-II-Komplex	DNA-Polymerase II-Komplex

ppm	parts per million
PTE	Posttransplantationserozytose
pVHL	von Hippel-Lindau Tumorsuppressor-Protein
rHuEPO	rekombinant hergestelltes humanes EPO
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rotations per minute
RT	Reverse Transkriptase
SCH 58261	[(3)H]-5-amino-7-(2-phenylethyl)-2-(2-furyl)- pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine
SEM	Standard error of the mean
t	Zeitpunkt
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
I. 1	Erythropoetin (EPO)	1
I.1.1	Produktionsorte.....	1
I.1.2	Biochemie und Molekularbiologie.....	2
I.1.3	EPO-Serumkonzentrationen bei Gesunden.....	2
I.1.4	Metabolismus und Clearance.....	3
I.1.5	EPO und Erythropoese.....	3
I.1.6	Krankheiten und therapeutischer Nutzen von EPO.....	5
I.1.7	Induktion der EPO-Synthese.....	6
I.1.8	Von der Hypoxie zur EPO-Genexpression.....	9
I.2	Adenosin	11
I.2.1	Adenosin in der Niere.....	12
I.2.2	Adenosinrezeptoren.....	13
I.2.3	Adenosin-Hypothese im Widerspruch.....	14
I.3	Ekto-5'-Nukleotidase (CD 73)	16
I.4.	Eigene Fragestellung	19
II.	MATERIAL UND METHODEN	20
II.1	Versuchstiere und Tierhaltung	20
II.2	Versuchsablauf	21
II.2.1	Normoxieversuche.....	21
II.2.2	Versuche in funktioneller Hypoxie.....	21
II.2.3	Versuche in hypoxischer Hypoxie.....	22
II.2.4	Versuche unter Anämie.....	22

II.3	Probengewinnung und Organentnahme	23
II.3.1	Narkose.....	23
II.3.2	Retroorbitaltechnik.....	23
II.3.3	Blut- und Organentnahme.....	23
II.4	Hypoxiekäfig	24
II.5	Messmethodik	26
II.5.1	Hkt-Bestimmung.....	26
II.5.2	EPO-ELISA.....	27
II.5.3	RNA-Isolation mit dem peqGOLD RNAPure™ System.....	27
II.5.4	Reverse Transkription.....	28
II.5.5	RT-PCR.....	29
II.5.5 a)	Grundlagen.....	29
II.5.5 b)	Primer.....	30
II.5.5 c)	Standard-Produktion.....	32
II.5.5 d)	Absolute Quantifizierung der Rezeptor-, EPO- und β -Actin-cDNA im Lightcycler.....	35
II.5.6	Agarose Gel-Elektrophorese.....	35
II.6	Statistische Auswertung	36
III.	ERGEBNISSE	37
III.1	Normoxieversuche	37
III.2	Versuche in funktioneller Hypoxie	39
III.3	Versuche in hypoxischer Hypoxie	44
III.4	Versuche unter Anämie	48

IV. DISKUSSION	55
IV.1 Betrachtung der Methoden	55
IV.1.1 Versuchstiere.....	55
IV.1.2 Hypoxieversuche.....	55
IV.1.3 Anämieversuche.....	57
IV.1.4 Bewertung der Methoden.....	58
IV.2 Regulation der EPO-Produktion	60
IV.2.1 Betrachtung der Ergebnisse.....	60
IV.2.2 Betrachtung der aktuellen Kenntnislage.....	62
IV.2.3 Abschließende Bewertung.....	67
V. ZUSAMMENFASSUNG	68
VI. LITERATURVERZEICHNIS	70
VII. DANKSAGUNG	95
VIII. LEBENS LAUF	96

I. EINLEITUNG

I.1. Erythropoetin (EPO)

Der Erhalt des Volumens an roten Blutkörperchen ist ein fundamentaler Baustein in der Sicherstellung des Sauerstoffangebots für die Gewebe des menschlichen Körpers. Verantwortlich für den erstaunlich konstanten Hämatokrit-Wert ist ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Erythropoese und dem Erythrozyten-Abbau, für dessen Aufrechterhaltung das Glykoprotein Erythropoetin (EPO) das wichtigste Kontrollmedium darstellt, indem es die Erythrozytenmasse an das jeweilige Sauerstoffangebot anpasst (110).

I.1.1. Produktionsorte

EPO ist ein 30 400 Dalton schweres Peptidhormon (227, 127), welches beim Erwachsenen hauptsächlich in der Niere (64, 86, 102, 119) und zum kleinen Teil (ca. 10%) in den Hepatozyten der Leber (101, 120) gebildet wird. Während der Fetalperiode ist die Leber der Hauptproduktionsort für EPO (30, 254), wobei die Umstellung von hepatischer auf renale Produktion etwa in der 30. Schwangerschaftswoche erfolgt (40). In der Niere wird die EPO-Synthese von den peritubulären Fibroblasten des kortikalen Labyrinths übernommen (4, 65, 126). Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu einer vermehrten EPO-Produktion, indem die Anzahl an Fibroblasten gesteigert wird, welche EPO-mRNA exprimieren können, während jede individuelle Zelle maximal reagiert sobald sie aktiviert wird (121). EPO-mRNA und EPO wurden in sehr geringen Mengen auch im ZNS (Astrozyten und Neuronen), in der Milz, in den inneren Geschlechtsorganen, in Endothelzellen der Milchgänge, in der Lunge von Ratten sowie in Makrophagen nachgewiesen (108, 201, 231, 252). Die gebildete Menge an EPO ist in diesen Geweben jedoch selbst unter Hypoxie äußerst gering und für die Erythropoese quantitativ unbedeutend (231).

1.1.2. Biochemie und Molekularbiologie

Humanes EPO wurde erstmals 1977 durch Miyake et. al. (164) isoliert. In seinem biologisch aktiven Zustand besteht es aus 195 Aminosäuren und vier Kohlenhydratseitenketten, welche 40% des Gesamtmoleküls ausmachen. Zwei interne Disulfid-Brücken zwischen Zystein-Resten an den Positionen 6, 29, 33 und 161 sind von Bedeutung für die biologische Aktivität des EPO-Moleküls, da sie die nötige Strukturform erhalten, welche unter anderem entscheidend für die Rezeptorbindung ist (6, 103, 127, 227). Das humane EPO-Gen ist auf Chromosom 7q22 lokalisiert und besteht aus fünf Exons und vier Introns (100, 128, 142, 195, 246). Die EPO-Gensequenz ist unter verschiedenen Säugetierspezies nicht 100%ig homolog (102).

1.1.3. EPO-Serumkonzentrationen bei Gesunden

Die durchschnittliche EPO-Serumkonzentration beträgt beim gesunden Erwachsenen ca. 5-20 mU/ml (34, 72, 102, 199, 223). Dabei kann man keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern feststellen, obwohl die Blut-Hämoglobin-Konzentration und der Hämatokrit-Wert sich unterscheiden (34, 106, 110, 158, 199). Der EPO-Spiegel wird durch den Menstruationszyklus der Frau nicht beeinflusst (37), allerdings findet man beim Menschen gelegentlich leichte zirkadiane Schwankungen in der EPO-Sekretion (35, 36, 248). Bei Schwangeren steigt die EPO-Serumkonzentration ab dem 3. Schwangerschaftsmonat kontinuierlich an und erreicht Werte zwischen 35 und 80 mU/ml (9, 35, 37, 249). Der entscheidende Stimulus für eine gesteigerte EPO-Synthese ist eine Gewebhypoxie: unter extremem Sauerstoffmangel kann die EPO-Serumkonzentration auf bis zu 10 000 mU/ml ansteigen (102). Ein hohes Sauerstoffangebot an den Organismus hingegen hemmt die EPO-Sekretion, womit sich ein inverses Verhältnis zwischen Sauerstoff-Partialdruck und EPO-Synthese ergibt (102).

1.1.4. Metabolismus und Clearance

Wie auch andere Glykoproteine wird EPO relativ langsam aus dem Blut enternt. Verschiedenen Studien zufolge erfolgt die Eliminierung über drei Routen: durch Exkretion über die Niere (<10%) (204), mittels Metabolisierung in der Leber (71) und über den Verbrauch durch die Erythrozyten-Vorläuferzellen im Knochenmark (27, 45, 71, 107). Die Halbwertszeit von intravenös verabreichtem homologen EPO beträgt ca. 1,5h bei Ratten (226) und 2-3h bei Mäusen (1, 161). Beim Menschen ermittelten Eckardt et. al. (48) in Hypoxie-Versuchen eine durchschnittliche HWZ von 5,2 Stunden. Diese könnte jedoch zu hoch gegriffen sein, da die vermehrte EPO-Sekretion nicht unmittelbar am Ende einer hypoxischen Stimulation wieder zum Stehen kommt, sondern noch ca. 2h anhält (102, 22).

1.1.5. EPO und Erythropoese

Die Erythropoese umfasst den Prozess der Bildung und Differenzierung roter Blutkörperchen im Knochenmark von omnipotenten und pluripotenten Stammzellen über kernhaltige Erythroblasten bis zu den reifen Erythrozyten (Abb.1). Zahlreiche Wachstumsfaktoren inklusive EPO nehmen in verschiedenen Stadien Einfluss auf diese Entwicklungskette (Abb.1). EPO wirkt hierbei vor allem auf der Ebene der BFU-E (burst-forming unit erythroid) und CFU-E (colony-forming unit erythroid) (81), wobei letztere eine höhere Anzahl an EPO-Rezeptoren besitzen und somit stärker auf EPO reagieren (63, 110, 210, 247). Der EPO-Rezeptor, ein 66-78 kD schweres Protein, liegt membrangebunden als ein präformiertes Dimer vor und gehört zur Familie der Klasse I Zytokinrezeptoren (8, 143, 193, 200, 253). Er löst bei der Bindung von EPO eine komplexe Signalkaskade aus, in welche zahlreiche Signaltransduktions- und Transkriptionsproteine involviert sind (12, 13, 15, 23, 78, 94, 141, 152, 163, 188, 212, 234, 244, 251). Das Hormon wirkt vornehmlich über die Hemmung des programmierten Zelltodes (Apoptose) der Vorläuferzellen, was insgesamt zu einer gesteigerten Erythrozytenproduktion führt (63, 84, 118). Außerdem scheint EPO die Freisetzung von Retikulozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn zu

beschleunigen (185). Maximale Retikulozytose findet man ca. 3-4 Tage nach einem akuten Anstieg des Plasma-EPOs (102). Wie schon erwähnt ist der ausschlaggebende Stimulus für die erhöhte EPO-Sekretion eine Gewebe-Hypoxie, d.h. der Sauerstofftransport mit dem Blut zu den Geweben ist in irgendeiner Form gestört. Durch die gesteigerte Erythropoese wird versucht dem entgegen zu wirken, indem die Sauerstoff-Transportkapazität durch eine erhöhte Anzahl roter Blutkörperchen gesteigert wird.

Im Zusammenspiel mit weiteren Zytokinen scheint EPO auch einen geringen Einfluss auf die granulozytäre und die thrombozytäre Entwicklung im Knochenmark zu nehmen, evtl. jedoch nur durch eine Feedback-Stimulation auf wenig differenzierte Stammzellen bei erhöhter Erythropoese (102). Andere, vielfältigere Wirkungen von EPO im Organismus schließen z.B. eine protektive Wirkung auf ischämisch geschädigtes Nerven- und Myokardgewebe ein (16, 26, 150, 186).

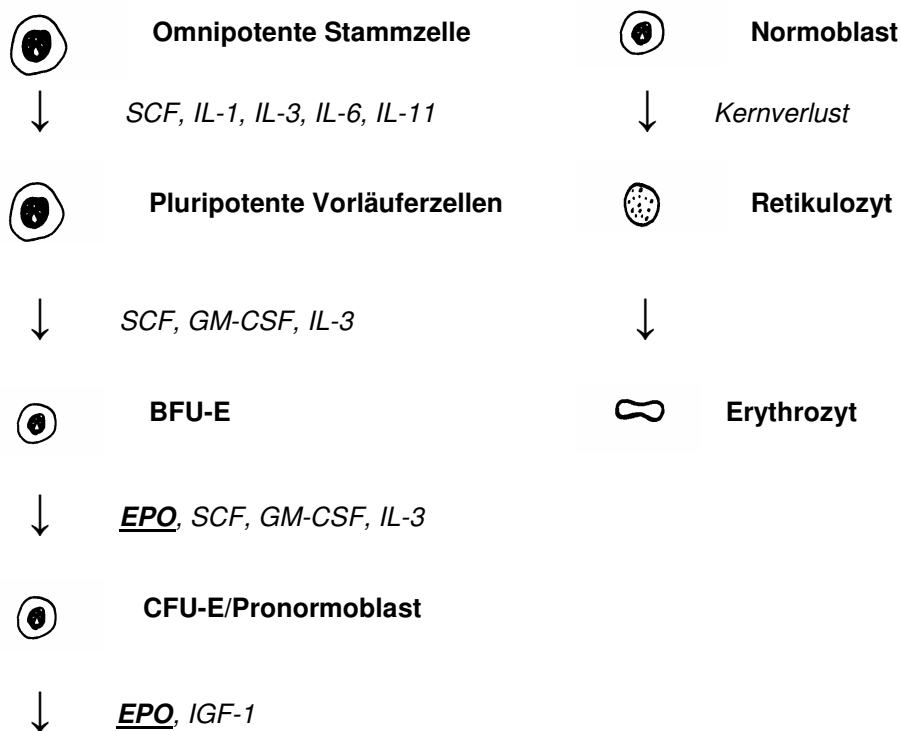


Abb.1: Schematische Darstellung eines Teilausschnitts der Erythropoese mit den wichtigsten Wachstumsfaktoren. SCF = Stem cell factor; IL = Interleukin; IGF-1 = Insulin-like growth factor type 1; GM-CSF = Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor; EPO = Erythropoietin; BFU-E = Burst-forming unit erythroid; CFU-E = Colony-forming unit erythroid.

1.1.6. Krankheiten und therapeutischer Nutzen von EPO

Pathophysiologisch kann es sowohl zur Unter- als auch zur Überproduktion von EPO kommen. Eine verminderte EPO-Sekretion führt zu Anämie. Die häufigste Ursache hierfür ist das Endstadium einer chronischen Niereninsuffizienz (110), aber auch chronische Infektionen, Autoimmunerkrankungen oder maligne Erkrankungen gehen häufig mit einer Blutarmut einher (102). Der routinemäßige Einsatz von rHuEPO (= rekombinant hergestelltes humanes EPO) bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hat zu einer dramatischen Verbesserung der Lebensqualität dieser Patienten geführt (63, 110, 202). rHuEPO wurde jedoch auch an Patienten mit AIDS (73), rheumatoider Arthritis (11), Frühgeburtlichkeit (176) und verschiedenen Krebserkrankungen (92, 144) mit guten Ergebnissen getestet und zeigte sich erfolgreich in der Erhöhung der Blutgewinnung bei autologen Bluttransfusionen (80). Auch das neue, gentechnisch synthetisierte NESP (= novel erythropoiesis stimulating protein / Darbepoietin) zeigt bei längerer Halbwertszeit und somit niedrigerer Einnahmefrequenz eine gute Wirkung bei EPO-bedingten Anämien (146, 147).

Eine Überproduktion von EPO führt zu sekundärer Erythrozytose. Sie kann durch eine Gewebhypoxie, z.B. in Höhe (46, 214), beim Ausdauersport (48, 156, 207) und beim Schlaf-Apnoe-Syndrom (21, 115), oder aufgrund verschiedener Tumoren entstehen, welche funktionell wirksames EPO synthetisieren. Als Beispiele seien hier das Hepatozelluläre Karzinom (111, 153) und das Nierenzellkarzinom (42, 205, 228) genannt. Des Weiteren kommt es nach Nierentransplantationen in 10-15% der Fälle zu einer stark gesteigerten EPO-Sekretion und somit zu einer therapiebedürftigen Posttransplantationserythrozytose (PTE) (2, 74, 93). Es gibt zahlreiche weitere Beispiele solcher sekundären Erythrozytosen (102). Im Gegensatz zu diesen sind die EPO-Spiegel bei der Polyzythämia vera nicht erhöht, es besteht also ein von EPO unabhängiges Wachstum der Erythrozyten-Vorläuferzellen (45, 72, 102, 116). Der Vorteil, den eine hohe EPO-Konzentration und somit eine vermehrte Anzahl roter Blutkörperchen durch

erhöhte Sauerstofftransport-Kapazität bietet, wird überschattet von den rheologischen und hämodynamischen Komplikationen (erhöhter peripherer Widerstand, erhöhte Nachlast des Herzens, verschlechterter Blutfluss in den Lungen, hohe Viskosität des Blutes) (53, 56, 102). Dies und die genannten Beispiele lassen erkennen, dass die weitere Erforschung der Regulation der EPO-Produktion von großem klinischen Interesse ist und in Zukunft vermehrt therapeutische Ansätze bieten könnte.

I. 1.7. Induktion der EPO-Synthese

Eine Gewebe-Hypoxie ist der ausschlaggebende Faktor zur Induktion der EPO-Synthese. Das heißt, dass nicht die Erythrozyten-Konzentration allein, sondern vielmehr das Sauerstoffangebot an das Gewebe (im Speziellen an die Zellen, welche für die EPO-Produktion verantwortlich sind) die bestimmende Variable im Feedback-Mechanismus der EPO-Sekretion ist. Dieses wird im wesentlichen durch drei Faktoren beeinflusst: Die Sauerstoff-Transportkapazität des Blutes, den Sauerstoffpartialdruck der Atemluft sowie die Sauerstoff-Bindungsaffinität des Hämoglobins. Außerdem spielen die lokale Durchblutung sowie der zelluläre Sauerstoff-Verbrauch eine Rolle in der Induktion der EPO-Synthese (102).

Die Sauerstofftransportkapazität ist unter anderem von der Erythrozytenmasse (Hkt), von der Hämoglobinmenge (Hb) und vom zirkulierenden Blutvolumen abhängig. Daraus ergibt sich, dass Blutverluste und Anämien unterschiedlicher Genese einen Stimulus für die EPO-Sekretion darstellen. Verschiedene Studien an chronisch anämischen Patienten fanden eine inverse log/lineare Beziehung zwischen der Serum-EPO-Aktivität und der Hämoglobin-Konzentration (35, 107), bzw. dem Hämatokrit (57, 58). Koury et. al. (121) zeigten den inversen Zusammenhang zwischen der Höhe des Hämatokrit und der EPO-Synthese an Mäusen. Akute Hämorrhagien führten sowohl beim Menschen (35, 159), als auch bei Tieren (14, 57) zu einer erhöhten EPO-Sekretion. Umgekehrt beobachtet man bei experimentell erhöhten Hkt-Werten, z. B. durch eine Bluttransfusion,

niedrigere EPO-Serumkonzentrationen unter ansonsten normalen physiologischen Bedingungen (3).

Bei vermindertem Sauerstoffpartialdruck steigt die Serum-EPO-Konzentration exponentiell mit dem Grad der Hypoxämie an. Dies wurde in unterschiedlichen Studien am Menschen (1, 48) sowie an Versuchstieren (1, 105) demonstriert. Menschen reagieren innerhalb von 24 Stunden nach einem Aufstieg in Höhen (ca. 4500m) mit einem erhöhten Serum-EPO-Spiegel (156). Außerdem findet man bei Bergbewohnern eine größere Erythrozytenmasse (139, 207). Auch pathologische Organfunktionen, wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung oder die diffuse idiopathische Lungenfibrose können zu einem reduzierten arteriellen Sauerstoffpartialdruck und somit zu erhöhten Serum-EPO-Werten führen (24, 233). Auf der anderen Seite bewirkt die Einatmung von nahezu reinem Sauerstoff einen Abfall der Serum-EPO-Konzentration (35).

Die Sauerstoffbindungsaffinität des Hämoglobins kann durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden. Eine erhöhte Affinität führt zu höheren EPO-Serum-Spiegeln, da der Sauerstoff erschwert an das Gewebe abgegeben wird und somit eine Hypoxie entsteht. Als Beispiel sei hier die Exposition mit Kohlenstoffmonoxid (CO) genannt, welche den weitaus stärksten Stimulus für die EPO-Sekretion darstellt (102, 105). Dieser starke Effekt ist darauf zurück zu führen, dass teilweise mit CO beladenes Hämoglobin durch Veränderung der Bindungsstärken von Sauerstoffmolekülen an die restlichen Häm-Gruppen eine sehr hohe Sauerstoffaffinität erlangt. Da hierdurch außerdem die Sauerstofftransportkapazität verringert wird, entsteht eine funktionelle, lang anhaltende Hypoxie. Solch eine CO-induzierte Hypoxie stellt eine gängige Methode zur Stimulierung der EPO-Synthese an Menschen sowie an Tieren zu Versuchszwecken dar (76, 77, 105, 208, 213). Auch in Höhe hat Hämoglobin eine gesteigerte Sauerstoffaffinität, um die Sauerstoffaufnahme in der Lunge zu begünstigen, was wiederum die erhöhte Erythrozytenmasse bei Bergbewohnern erklärt. Eine erniedrigte Sauerstoffaffinität von

Hämoglobin, wie man sie etwa bei Patienten mit Sichelzellanämie findet, führt andererseits zu niedrigeren EPO-Serum-Spiegeln (219).

Da die Niere der Hauptproduktionsort für EPO ist, stellt die renale Durchblutung ebenfalls einen wichtigen Faktor für die Stimulation der EPO-Sekretion dar. Wegen ihrer Fähigkeit zur Autoregulation des Blutflusses stellen die Nieren einen geeigneten Ort für die Messung der Sauerstoffkonzentration des Blutes dar (102). Bei Tieren, deren renale Durchblutung entweder mittels chirurgischer Kompression der Nierenarterien (183, 184) oder durch Applikation von vasokonstriktiven Stoffen wie Angiotensin II (66, 68, 69, 85) eingeschränkt wurde, fanden sich leicht erhöhte Plasma-EPO-Spiegel. Dieser geringe Konzentrationsanstieg konnte durch zusätzliche Verringerung der Sauerstofftransportkapazität (183) oder durch zusätzliche Hypoxie-Exposition (184) deutlich gesteigert werden.

Ob der Sauerstoffverbrauch durch aktive Natrium-Resorption in der Niere ebenfalls einen direkten Einfluss auf die EPO-Produktion hat, ist noch nicht vollständig geklärt (102), Eckardt et. al. fanden jedoch einen Zusammenhang zwischen der proximal-tubulären Funktion der Niere und der EPO-Sekretion (50). Das autonome Nervensystem scheint keine signifikante Rolle in der EPO-Gen-Expression oder der EPO-Sekretion unter normalen sowie unter hypoxischen Bedingungen zu spielen (51). Vieles spricht jedoch dafür, dass es einige humorale Messenger gibt, welche die EPO-Produktion beeinflussen (89, 148, 190, 191, 192, 248).

Die EPO-Synthese als Antwort auf hypoxischen Stress verhält sich dynamisch und verzögert (102). Ein messbarer Anstieg der Plasma-EPO-Konzentration findet sich beim Menschen und bei Ratten erst ca. ein bis zwei Stunden nach Induktion einer Anämie oder Hypoxie (48, 159, 217, 218). Die Exprimierung renaler EPO-mRNA hat bei Mäusen ca. vier bis acht Stunden nach Induktion einer Anämie ihr Maximum erreicht und wird dann über die folgenden Tage weniger, bis sich der Hkt normalisiert hat (14, 121).

1.1.8. Von der Hypoxie zur EPO- Genexpression

Damit die genannten Hypoxie-induzierenden Mechanismen zu einer gesteigerten EPO-Sekretion in der Niere führen, muss hier eine Art Sauerstoff-Sensor lokalisiert sein, der das Sauerstoff-Minderangebot detektiert und ein Signal an die EPO-Produzierenden Zellen übermittelt. Hierzu gibt es zahlreiche Theorien und der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht endgültig geklärt.

Goldberg et. al. (79) stellten erstmals die Hypothese auf, dass die Rolle des Sauerstoffsensors einem Häm-Protein zukommen könnte, unter anderem weil sie beobachteten, dass Liganden wie Cobalt, Nickel und Mangan in der Lage waren die EPO-mRNA-Transduktion zu vermitteln (79, 102). Diese Stoffe können das Eisen im Zentrum des Porphyrin-Ringes des Häm-Proteins substituieren, was zu dessen Desoxy-Konformation führt (102). Weiterhin wurde postuliert, dass das Signal für die Expression von EPO-mRNA durch desoxygeniertes Cytochrom P-450, welches unter Hypoxie sowie unter Cobalt-Gabe vermehrt vorhanden ist, gegeben werden könnte (102). Zellkultur-Versuche haben außerdem gezeigt, dass zyklische Nukleotide und Kalzium-abhängige Proteinkinasen in die EPO-Synthese involviert sind (88, 125, 168, 240). Die Rolle von Adenosin als lokalem Messenger für die EPO-Sekretion soll später noch besprochen werden (Kapitel I.2.: Adenosin).

Eine der wichtigsten neuen Erkenntnisse für das Verständnis der hypoxischen Regulation der EPO-Gen-Expression ist die Rolle eines in den letzten Jahren nachgewiesenen Transkriptionsfaktors, des Hypoxia inducible factor (HIF). Dieser induziert unter Hypoxie die Expression verschiedener Gene, unter anderem auch die des EPO-Gens (220, 255). Das Nicht-Häm-Protein HIF ist ein Heterodimer, von dem bisher vier Untereinheiten bekannt sind: HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α und HIF-1 β . Die α -Untereinheiten bilden jeweils mit der HIF-1 β Untereinheit (auch ARNT: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) einen dimeren Komplex. Dieser kann im Zellkern an Hypoxia response elements (HRE)-assoziierte DNA-Sequenzen binden, was die weitere Bindung eines Polymerase II-Komplexes (Pol-II-Komplex) ermöglicht,

und induziert somit die Transkription von Zielgenen (60, 189). Über HIF-2 α und HIF-3 α ist ansonsten noch sehr wenig bekannt, während für HIF-1 α inzwischen mehr als sechzig Zielgene identifiziert worden sind, so auch das EPO-Gen (59, 175, 196, 220). Viele Körperzellen synthetisieren HIF- α Proteine, wobei nicht alle in jedem Zelltyp zu finden sind, was für unterschiedliche Aufgaben der einzelnen HIF- α Untereinheiten spricht.

Unter normoxischen Bedingungen werden HIF- α -Proteine an einem Prolylrest in ihrer Oxygen-dependent degradation domain (ODD-Domäne) von Sauerstoff-, Eisen-, 2-Oxoglutarat- und Ascorbat-abhängigen Prolyl-4-Hydroxylasen hydroxyliert (55, 60, 151, 220, 255), was dazu führt, dass sie einen Komplex mit dem Von Hippel-Lindau-Protein (pVHL) eingehen. Infolge der Komplexbildung wird die HIF- α -Untereinheit durch einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex ubiquitinyliert, was einen schnellen Abbau des HIF- α durch Proteasomen ermöglicht. Somit besitzt HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen eine sehr kurze Halbwertszeit von nur ca. fünf Minuten (95). Unter hypoxischen Bedingungen kann die Halbwertszeit durch folgenden Mechanismus jedoch bis auf 30 Minuten ansteigen (95): Herrscht eine Hypoxie, können die Prolylreste nicht hydroxyliert werden und HIF- α bildet keinen Komplex mit pVHL (221). Außerdem werden Asparaginylreste der HIF- α Proteine nicht durch Asparaginhydroxylasen (FIH: Factor inhibiting HIF-1) hydroxyliert (60, 151), was dazu führt, dass das CBP/p300-Protein sich an HIF- α anlagern und mit ihm in den Zellkern translozieren kann. Hier findet, wie bereits beschrieben, die Dimerisierung mit HIF-1 β , die Anlagerung an HRE-assoziierte DNA-Sequenzen und somit letztendlich die Transkription des Zielgens statt (60, 151).

Bei der Betrachtung des Gesamtbildes an Theorien und Erkenntnissen wird deutlich, dass die genauen Abläufe des Sauerstoff-sensing mit der nachfolgenden EPO-Gen-Expression in der Niere noch nicht vollständig geklärt sind und dieses Gebiet weiterer intensiver Forschungsarbeit bedarf.

I.2. Adenosin

Eine viel diskutierte Möglichkeit für die Kopplung zwischen vermindertem Sauerstoffangebot und vermehrter EPO-Produktion wäre, dass der Energieverbrauch in der Niere ein Signalmolekül produziert, welches die EPO-Gen-Expression induziert. Adenosin (Ado) gilt als potentieller Kandidat für solch ein Signalmolekül (77).

Das aus der Base Adenin und dem Zucker β -D-Ribose bestehende Nukleosid kommt in den Polynukleotiden DNA und RNA vor, bildet als freies Triphosphat (ATP) den universellen Energieträger der Zelle und ist außerdem ein wichtiges Signalmolekül, welches verschiedene physiologische Prozesse durch spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren moduliert (64). Es besitzt eine kurze Halbwertszeit von wenigen Sekunden (166).

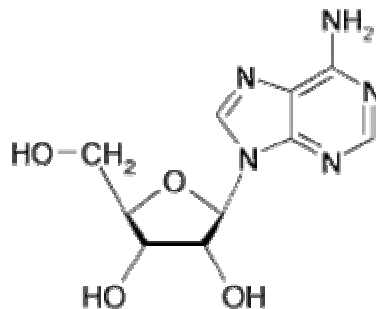


Abb.2: Strukturformel von Adenosin

Es ist bekannt, dass Ado bei der Regulation des Blutflusses in Abhängigkeit vom Metabolismus und vom Sauerstoffangebot eine Rolle spielt (10, 87). Immer wenn der Sauerstoffbedarf das Sauerstoffangebot übersteigt, wird die oxidative Phosphorylierung gehemmt und ADP und AMP häufen sich an. Das verringerte Verhältnis von ATP/ADP im Zytosol führt zu einer erhöhten Ado-Produktion über die hydrolytische Spaltung von AMP durch 5'Nukleotidasen (5'NT). Entweder wird das intrazellulär gebildete Ado nach extrazellulär abgegeben oder AMP wird gleich extrazellulär durch die Ekto-5'-Nukleotidase (CD 73) zu Ado abgebaut. (77, 187). Ado bewirkt dann in den

meisten Organen eine Vasodilatation, wodurch das lokale Sauerstoffangebot erhöht wird (90). In der Niere kann Ado in bestimmten Abschnitten des Glomerulums auch zu einer Vasokonstriktion führen um den Blutfluss zu reduzieren, wenn vermehrte Transportarbeit geleistet werden muss (25, 90, 182). Im Kreislauf wird Ado entweder von Erythrozyten oder Endothelzellen aufgenommen oder durch die Plasma-Adenosin-Deaminase zu Inosin desaminiert (187).

1.2.1. Adenosin in der Niere

Seit einiger Zeit wird vermutet, dass Ado über die metabolische Regulation hinaus auch die EPO-Produktion induzieren könnte, um ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf auszugleichen (63, 77, 102). Unter normoxischen Bedingungen beträgt die renale Adenosin-Basalkonzentration in Ratten ca. 5 nmol/g (Feuchtgewicht), wobei sich der größte Anteil gebunden im Intrazellulärraum befindet, ohne also eine Wirkung auf die Ado-Rezeptoren auszuüben (181). Oßwald et. al. und weitere Arbeitsgruppen zeigten, dass eine kurzzeitige Hypoxie oder eine erhöhte Arbeitsleistung (durch verstärkte Resorptionsarbeit) auch in der Niere zu erhöhten Ado-Konzentrationen führen (54, 174, 180, 181). Innerhalb von Sekunden nach Eintritt einer Ischämie des Nierengewebes wurden große Mengen an Ado freigesetzt (181, 225) und auch eine experimentell herbeigeführte Anämie führte zu deutlich erhöhten Ado-Konzentrationen in der Vena renalis (169). Tubuläre Zellen, EPO-produzierende peritubuläre Fibroblasten sowie perisinusoidale Ito-Zellen der Leber besitzen Ekto-5'-Nukleotidasen auf ihrer Außenseite (137,138), welche unter chronisch vermindertem Sauerstoffpartialdruck vermehrt exprimiert werden (134). All dies würde Ado zu einem kompetenten Signalmolekül unter hypoxischen Bedingungen machen.

Bakris und seine Mitarbeiter (5) zeigten, dass der unspezifische Ado-Antagonist Theophyllin die erhöhte EPO-Produktion im Rahmen einer Posttransplantationserythrozytose verringern konnte. Weitere Studien an humanen Hepatom-Zellen und an Mäusen deuteten ebenfalls auf eine

wichtige Rolle von Ado in der Modulation der EPO-Produktion hin (61, 64, 169, 170, 171, 178, 239).

1.2.2. Adenosin-Rezeptoren

Es existieren vier Subtypen des Adenosin-Rezeptors (AR): A1, A2a, A2b und A3, die in verschiedenen Spezies analysiert und geklont wurden (64, 130, 179). Es handelt sich um purinerge P1-Rezeptoren, welche zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören und deren charakteristischen Aufbau besitzen (Abb.3). Alle vier Rezeptor-Subtypen finden sich in der Niere (47, 67, 130, 256).

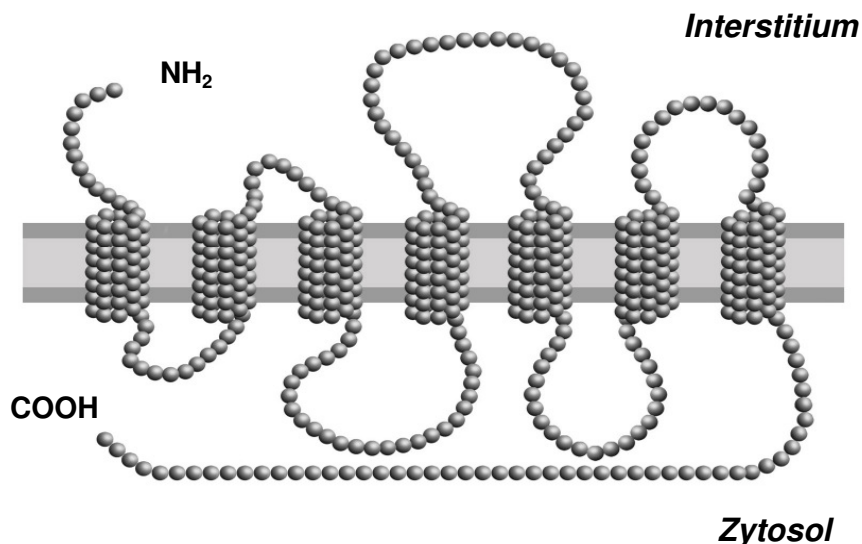


Abb.3: Struktureller Aufbau eines Adenosinrezeptors.

Der A1AR und der A3AR hemmen die Adenylatzyklase (AC) über inhibitorische G-Proteine (G_i) und führen somit zu einem verringerten cAMP-Spiegel, während die beiden A2-Rezeptoren die AC über stimulierende G-Proteine (G_s) aktivieren und dadurch die cAMP-Konzentration erhöhen (64, 130, 178, 179). Fisher und Brookins (64) sowie zahlreiche andere Autoren (5, 102, 130, 169, 178, 179, 239) postulierten aufgrund dieser Erkenntnisse, dass die EPO-Genexpression über die Aktivierung von A2a- und A2b-AR reguliert wird. Dabei sollen die erhöhten cAMP-Spiegel zur Aktivierung der

Proteinkinase A führen, welches die vermehrte Phosphorylierung von HIF-1 α und somit eine erhöhte Transkriptionsrate der EPO-mRNA zur Folge hätte. A₂b-AR sollen zusätzlich noch die Phospholipase C stimulieren, welche über verschiedene Schritte zur Aktivierung der Proteinkinase C führen und eventuell über ein noch unbekanntes Non-HIF-Transkriptionsprotein ebenfalls die EPO-mRNA-Expression verstärken könnte. Außerdem zeigten unterschiedliche Studien eine Aktivierung der Phospholipase A₂ durch Ado, welche wahrscheinlich ebenfalls zu einer Stimulation der Proteinkinase C-Aktivität führt (Abb.4).

1.2.3. Adenosin-Hypothese im Widerspruch

Obwohl die oben genannten Studien und Modelle relativ schlüssig zu sein scheinen, sprechen immer mehr neuere Erkenntnisse gegen die modulierende Rolle von Ado in der Hypoxie-induzierten EPO-Sekretion. So zeigten z. B. Gleiter et. al. in verschiedenen Experimenten an gesunden Individuen, dass eine Theophyllin-Gabe die EPO-Produktion nach Hämorrhagie bzw. Hypoxie nicht signifikant beeinflusst (76, 77). Auch in Versuchen an Ratten konnten sie mithilfe von selektiven AR-Antagonisten und –Agonisten keine modulierende Rolle von Ado unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen feststellen (75). Untersuchungen an isolierten perfundierten Rattennieren ließen eine Ado-abhängige EPO-Produktion unwahrscheinlich werden (216, 232). In unserem Arbeitskreis zeigten Experimente an AR Knockout (KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen keinen signifikanten Unterschied in der EPO-Produktion unter Normoxie, Hypoxie und Anämie (258), was ebenfalls gegen die Ado-Hypothese spricht.

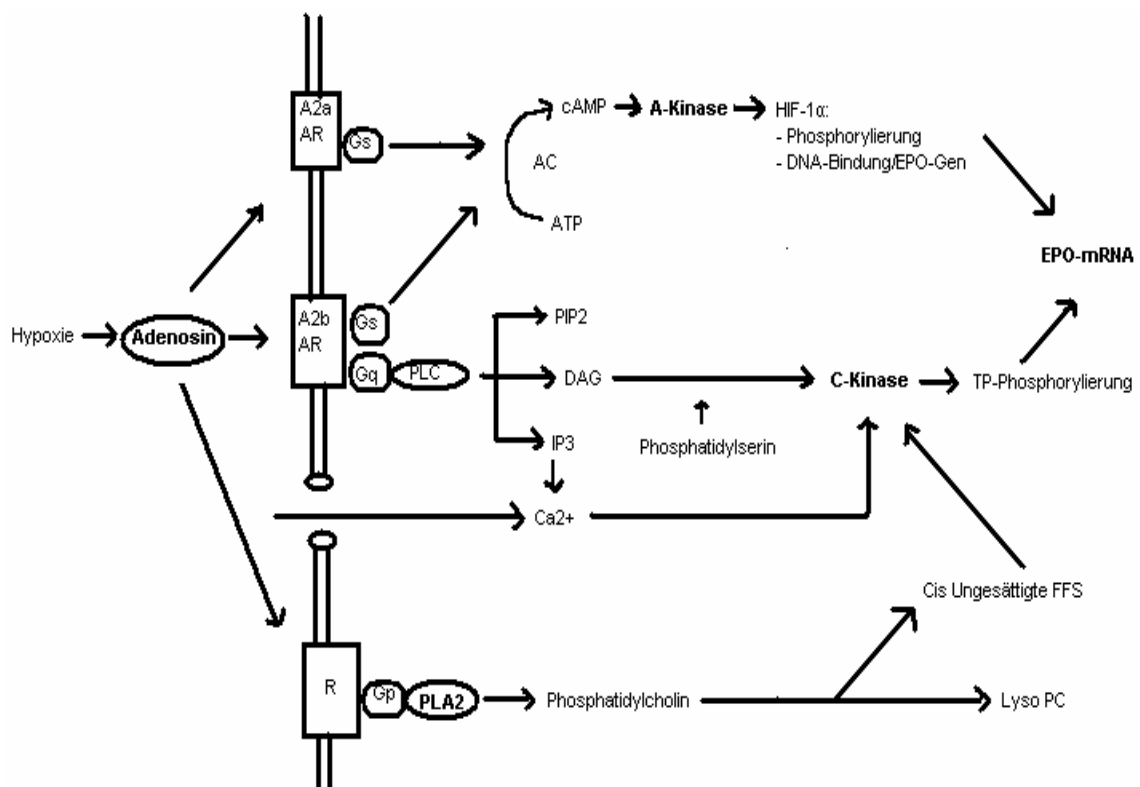


Abb.4: Modell für die hypoxische Regulation der EPO-Produktion über Ado, Proteinkinase A und C und Phospholipase A2 nach Fisher & Brookins (64). Gs = stimulierendes G-Protein; Gq = PLC-aktivierendes G-Protein; Gp = PLA2-aktivierendes G-Protein; PLC = Phospholipase C; PLA2 = Phospholipase A2; AC = Adenylatzyklase; R = Rezeptor; AR = Adenosinrezeptor; DAG = Diacylglycerol; IP3 = Inositoltriphosphat; PIP2 = Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat; TP = Transkriptionsproteine; FFS = freie Fettsäuren; PC = Phosphatidylcholin

Die oben erwähnten Versuche von Bakris et. al. sind kritisch zu bewerten, da die Ergebnisse in der Form noch nicht eindeutig reproduziert wurden (97) und die Posttransplantationserythrozytose wahrscheinlich keine gute Voraussetzung für die Untersuchung der EPO-Produktion ist, unter anderem weil deren zugrunde liegender Pathomechanismus noch nicht vollständig verstanden ist (74, 77). Die in vitro Studien an humanen Hepatom Zelllinien zeigten teilweise widersprüchliche Ergebnisse (97, 170, 178) und es ist unklar, inwieweit die EPO-Regulation in diesen Zellen mit der in der Niere übereinstimmt.

In den letzten Jahren kam der Forschung zu Adenosin und seinen Rezeptoren eine immer größere Bedeutung zu, da der Botenstoff unter anderem wichtige Funktionen im Bereich der präischämischen Konditionierung (44, 131, 132, 229) sowie bei Entzündungsprozessen (179) übernimmt, welche man eventuell mittels gezielter Stimulation oder Hemmung von einzelnen Rezeptor-Subtypen positiv beeinflussen könnte.

I.3. Ekto-5'-Nukleotidase (CD 73)

5'-Nukleotidasen sind für die hydrolytische Spaltung von AMP in Ado und freies Phosphat verantwortlich (Abb.5). In der Niere finden sich 5'-NT zum einen in löslicher Form im Zytosol (135) und zum anderen als membrangebundene Ekto-5'-Nukleotidasen (Ekto5'-NT), deren aktives Zentrum nach extrazellulär zeigt und somit nur extrazelluläre Nukleotide hydrolysieren kann (43, 136, 138). Die Ekto5'-NT hat eine höhere Affinität zu AMP als zu sämtlichen anderen Substraten und wird durch ATP und ADP kompetitiv gehemmt (136). Die Affinität der zytosolischen 5'-NT ist zu 5'IMP und 5'GMP höher als zu AMP und sie wird im Gegensatz zur Ekto5'-NT durch physiologische Konzentrationen von Phosphat gehemmt und durch physiologische Konzentrationen von ATP stimuliert (99). Grenz et. al. (83) fanden bei Ekto5'-NT-KO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant niedrigere basale Ado-Spiegel in der Niere. Der Ado-Konzentrations-Anstieg unter ischämischen Bedingungen fiel bei CD 73 KO-Mäusen sowie unter pharmakologischer Hemmung der Ekto5'-NT erheblich niedriger aus als bei entsprechenden Wildtypen und Kontrollen. Die Ekto-5'-Nukleotidase ist somit das geschwindigkeits-bestimmende Enzym für die extrazelluläre Adenosinbildung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen (83). Eine funktionelle Relevanz der zytosolischen 5'-NT konnte hingegen experimentell nicht erwiesen werden (138).

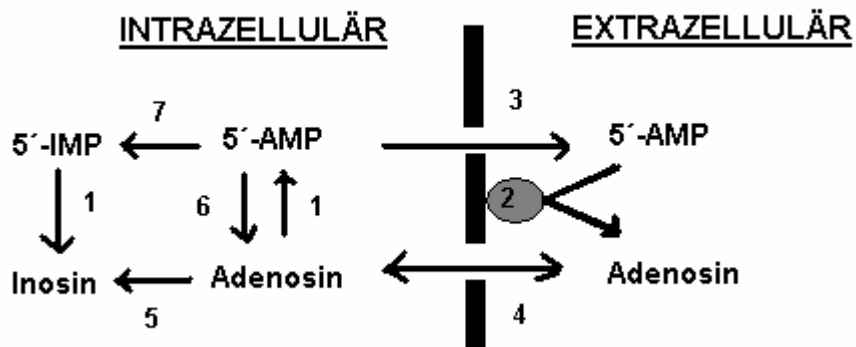


Abb.5: Intra- und Extrazellulärer Metabolismus von Adenosin über 5'-Nucleotidasen. 1: lösliche zytosolische 5'-NT; 2: Ekto5'-NT; 3: Nucleotid-Transporter; 4: Nucleosid-Transporter; 5: Adenosin-Deaminase; 6: Adenosin-Kinase; 7: Adenylat-Deaminase. Nach Le Hir & Kaissling (138).

Die Ekto5'-NT ist ein 70 kDa schweres Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Ektoenzym (182), das unter allen Organen in der Niere am stärksten exprimiert wird. Sie findet sich hier in den Tubuli, in Fibroblasten und in glomerulären und extraglomerulären Mesangiumzellen (25, 182, 235). EPO-produzierende peritubuläre Fibroblasten der Nierenrinde exprimieren die CD 73 auf ihrer Oberfläche (4, 43, 134, 137, 138), während auf den zur EPO-Produktion nicht befähigten Fibroblasten keine Ekto5'-NT nachweisbar ist (4). Unter Anämie sowie unter Hypoxie zeigte sich neben der Vermehrung der EPO-produzierenden Zellen und ihrer Vergrößerung eine erhöhte Aktivität der Ekto5'-NT auf ihrer Oberfläche (54, 83, 109, 134, 135). Wahrscheinlich ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 für eine vermehrte Expression der CD 73 unter Hypoxie verantwortlich (117, 230). Chen et. al. (28) zeigten, dass reaktive Sauerstoffradikale, welche auch unter ischämischen Bedingungen in der Niere vermehrt produziert werden, zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit der Ekto5'-NT führen. So verdoppelte der O_2^- -Donor KO_2 die Ado-Produktion durch Erhöhung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der Ekto5'-NT von 141 auf 192 nmol/min/mg Protein (28).

In renalen Fibroblasten und in anderen Geweben führt ein intrazellulär erhöhtes cAMP zu einer gesteigerten Ecto-5´Nukleotidase-Aktivität und AR-Agonisten provozieren eine Aktivitätserhöhung, wahrscheinlich ebenfalls über höhere cAMP-Konzentrationen (32, 209). Narravula et. al. (173) zeigten, dass AMP, Ado und Ado-Analoga an einem in vitro mikrovaskulärem Modell sowohl die Transkription von CD-73-mRNA als auch die Oberflächenexprimierung und die Aktivität der Ekto5´-NT zeit- und konzentrationsabhängig induzieren.

Im Myokard sowie in anderen Geweben wurde ein protektiver Effekt der CD 73 unter ischämischen Bedingungen nachgewiesen, mit der Begründung, dass erhöhte Ado-Spiegel über Vasodilatation und andere Mechanismen den Zelluntergang vermindern (28). Thomson et. al. (236) zeigten, dass die Ekto5´-NT-abhängige Produktion von Ado für den tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus (TGF) unverzichtbar ist.

Eine Infusion des synthetischen ADP-Analogons AOPCP hemmt erwiesenermaßen die Ado-Produktion in verschiedenen Organen und Zelltypen über selektive Hemmung der Ekto5´-NT (83, 91, 197, 241). Verschiedene Arbeitsgruppen (76, 258) schlossen bereits AOPCP in ihre Versuche mit ein, um den Einfluss von Ado auf die Hypoxie-induzierte EPO-Produktion zu untersuchen. Sie fanden keinen signifikanten Unterschied in den EPO-Spiegeln bei Mäusen und Ratten unter AOPCP-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren, was ihre These unterstützte, dass Ado keine tragende Rolle in der Modulation der EPO-Sekretion spielt. Der ideale und selektivste Weg um die Ado-Produktion über die Ekto5´-NT vollständig auszuschließen ist jedoch der Einsatz von CD 73-Knockout-Mäusen, welche zusätzlich den Vorteil bieten, dass potenzielle unerwünschte Arzneimittelwirkungen von AOPCP ausgeschlossen werden können.

I.4. Eigene Fragestellung

Die Rolle von Adenosin in der Regulation der EPO-Synthese ist bis heute trotz umfangreicher Forschungsarbeit der vergangenen Jahre noch nicht geklärt und wird weiterhin kontrovers diskutiert. Wir haben durch die Verwendung von Mäusen mit Deletion des Ekto-5'-Nukleotidase (CD73)-Gens den wichtigsten Produktionsweg für Adenosin in der Niere ausgeschaltet und hierunter die EPO-Sekretion nach funktioneller und hypoxischer Hypoxie sowie nach Hämorrhagie bestimmt. Desweiteren haben wir die Regulation der renalen mRNA der vier bekannten Ado-Rezeptoren unter Normoxie und den verschiedenen hypoxischen Stimuli untersucht.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Ecto-5'-Nukleotidase (CD73)-KO/WT-Mäuse

Wir verwendeten weibliche und männliche homozygote CD73-KO-/WT-Mäuse, die von Linda Thompson (L.F. Thompson, Immunobiology and Cancer Program, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA) generiert wurden (235). Das Exon 3 des Ekto5'-NT-Gens, welches für die Enzymaktivität unverzichtbar ist, wurde durch ein Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt. Mittels konventionellem Gen-Targeting wurde ein heterozygotes Weibchen produziert, das mit C57BL/6 – Männchen gepaart wurde, um weitere heterozygote Tiere zu erhalten, welche schließlich durch Kreuzung untereinander heterozygote, homozygote KO- und homozygote WT-Mäuse zeugten. Die Zucht der KO- und WT-Mäuse erfolgte im Tierstall des Pharmakologischen Instituts der Universität Tübingen. Die Genotypisierung der Nachzuchten erfolgte durch eine andere Arbeitsgruppe in unserem Institut mittels PCR. Die verwendeten Primer wurden von Qiagen, Hilden bezogen und setzten sich aus folgenden Sequenzen zusammen:

WT-Allel, sense → 5'-CTCTGCATTGCAGCCTGAAG-3'

WT-Allel, antisense → 5'-CGATGTCCACACCTCGAACT-3'

KO-Allel, sense → 5'-CCAGCTCATTCTCCCACTCATG-3'

KO-Allel, antisense → 5'-CCATTTGAATACTAGCTTCCAGG-3'

Tierhaltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte artgerecht nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes (Bundesgesetzblatt vom 18.01.1986, Teil I). Die Mäuse hatten bis zur Versuchsdurchführung in eingestreuten Polykarbonatwannen freien Zugang zu Leitungswasser und pelletrierter Standardnahrung der Firma Altromin (Altromin Haltung C1.324). Während

der Unterbringung im Tierstall waren die Versuchstiere einem künstlichen Tag/Nachtzyklus von je zwölf Stunden ausgesetzt, sowie einer konstanten Temperatur von 21 °C und einer Luftfeuchtigkeit 60 % g/m³.

II.2 Versuchsablauf

Während der Versuche enthielten die jeweiligen Gruppen die gleiche Anzahl an weiblichen und männlichen, sowie an WT- und KO-Mäusen. Das Alter und das Körpergewicht der KO- und der entsprechenden WT-Mäuse wurde möglichst homogen gewählt.

II.2.1 Normoxieversuche

Zur Bestimmung der basalen Hkt-, Serum-EPO- und mRNA-Werte wurden die Ekto5´-NT-KO und –WT Mäuse mit Diätylether narkotisiert, ca. 500 µl Blut aus der Vena cava inferior entnommen und die linke Niere entfernt. Aus den Blutproben wurden die EPO-Serum-Konzentration und der Hkt bestimmt. Zusätzlich wurde aus einer Nierenprobe die renale EPO- und β-Aktin-mRNA sowie die mRNA der einzelnen Ado-Rezeptoren bestimmt. Blut und Organe wurden jeweils sofort auf Eis gelagert, bzw. in Flüssig-Stickstoff schockgefroren.

II.2.2 Versuche in funktioneller Hypoxie

Die Hypoxieversuche wurden mit Kohlenmonoxid (CO)-Konzentrationen von 400ppm und 750ppm über vier Stunden in einem Hypoxiekäfig (s.u.) durchgeführt. Während der CO-Exposition konnten sich die Mäuse frei bewegen. Männliche und weibliche Tiere waren durch eine luftdurchlässige Trennwand voneinander getrennt. Nach der vierstündigen Exposition wurden auch hier die Serum-EPO-Konzentration und der Hämatokrit aus der Blutprobe, sowie die AR-, β-Actin- und EPO-mRNA in der Niere bestimmt.

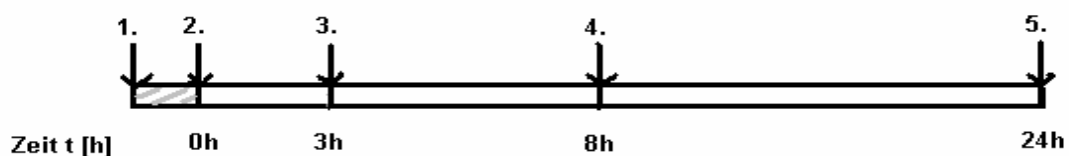
II.2.3 Versuche in hypoxischer Hypoxie

Zur Induktion einer hypoxischen Hypoxie wurde dem Hypoxie-Käfig ein hypoxisches Gasgemisch, bestehend aus 8% Sauerstoff und 92% Stickstoff, zugeführt. Die Expositionszeit betrug wiederum vier Stunden und der Versuchsablauf war identisch mit dem der funktionellen Hypoxie.

II.2.4 Versuche unter Anämie

Den Mäusen wurde unter Diethylethernarkose retroorbital Blut entnommen und anschließend dasselbe Volumen physiologische Kochsalzlösung (0,9%ige NaCl-Lösung) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Blut- und NaCl-Volumina wurden in Anlehnung an Eckardt et. al. (51) und Nagashima und Karasawa (169) gewählt.

Zum Zeitpunkt t_0 wurde ein Blutvolumen von 1,25% in Bezug auf das KG entnommen und das entsprechende Volumen durch isotone Kochsalzlösung i.p. ersetzt. Nach drei Stunden (t_3) wurde in analoger Weise 1% vom Ausgangs-KG (t_0) entnommen und das entsprechende Volumen an NaCl-Lösung i.p. injiziert. Weitere fünf Stunden später (t_8) wurde jeder Maus noch ein Hämatokrit-Röhrchen (75 μ l) Blut retroorbital abgenommen und mit Kochsalzlösung substituiert. 24 Stunden nach Versuchsbeginn (t_{24}) wurde bei jeder Maus unter Ethernarkose die V. cava zur Blutgewinnung punktiert und die linke Niere entnommen. Aus allen gewonnenen Blutproben wurden der Hämatokrit sowie die EPO-Serumkonzentration ermittelt und die Niere diente erneut zur Bestimmung der renalen β -Actin-, EPO-, und AR-mRNA.



1. Gewichtsbestimmung und Berechnung der Blutmengen
2. Blutentnahme: 1,25% des Körpergewichts und entsprechende NaCl-Substitution
3. Blutentnahme: 1% des Körpergewichts (bei t_0) und entsprechende NaCl-Substitution
4. Blutentnahme: 75 μ l und entsprechende NaCl-Substitution
5. Narkose, Punktion der Vena cava und Organentnahme

Abb.6: Zeitlicher Ablauf der Anämieversuche.

II.3 Probengewinnung und Organentnahme

II.3.1 Narkose

Vor jedem Versuchsbeginn wurde das Körpergewicht (KG) der Versuchstiere bestimmt. Die Mäuse wurden zur Blut- und Organentnahme mit Diethylether narkotisiert. Hierzu wurden sie in ein geschlossenes Plexiglasgefäß mit Diethylether-getränktem Zellstoffboden gesetzt, bis keine Willkürmotorik mehr nachweisbar und der Muskeltonus stark reduziert war. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde den Versuchstieren nach der Entnahme aus dem Gefäß eine 20 ml Spritzenhülse, welche zur Hälfte mit Diethylether-befeuchteten Tupfern gefüllt war, über den Schädel gestülpt.

II.3.2 Retroorbitaltechnik

Unter Fixierung des Kopfes der Maus wurde eine Punktions-Kapillare (Einmal-Kapillarpipette, 10µl, Hirschmann® Laborgeräte) auf der medialen Seite der Augenhöhle am Auge vorbei durch die Konjunktiva geschoben und leicht rotiert, bis der retroorbitale venöse Plexus erreicht war. Das gewonnene Blut wurde mit einer 75µl Hämatokrit-Kapillare aufgefangen (Kapillare mit Na-Heparin 75mm/75µl, Hirschmann® Laborgeräte) und anschließend in einer Hämatokrit Zentrifuge bei 4000 x g / 5min zentrifugiert. Der Hämatokrit-Wert wurde mittels eines „Hawksley micro-haematocrit reader“ bestimmt, das Serum in einem Safe-Lock-Eppendorf-Gefäß gesammelt und bei -80 °C eingefroren.

II.3.3 Blut- und Organentnahme

Unter Diethylethernarkose wurden in Rückenlage die Haut und das Peritoneum auf der Mittellinie des Abdomens mit einem ca. 5 cm langen Schnitt durchtrennt. Der gesamte Darm wurde nach rechts außerhalb des Abdomens verlagert und die Vena cava inferior auf Höhe der Nieren freigelegt. Mit einer leicht gebogenen Einmal-Injektions-Kanüle (Gr.18, Sterican®) wurde unter Sicht durch ein Mikroskop (Leica Stereomikroskop MZ 9-5, 16x Vergrößerung) in das Gefäßlumen eingedrungen und Blut in eine 1ml sterile

Spritze (BD Plastipak™) entnommen. Ein Teil des Blutes wurde zur Hkt-Messung in eine Hkt-Kapillare gegeben. Der Rest wurde zentrifugiert und das bei der Zentrifugation gewonnene Serum abpipetiert, in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bis zur Bestimmung der EPO-Plasmakonzentration bei -80 °C eingefroren.

Direkt nach der Punktion der V. cava wurde die linke Niere mit einer stumpfen Pinzette vorsichtig mobilisiert und mittels Durchtrennung von Gefäßstiel und Ureter entnommen. Das umgebende Fettgewebe wurde vorsichtig wegpräpariert. Die Niere wurde in ein Einfrierröhrchen (Cryo.s PP steril, 2 ml) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur mRNA-Bestimmung mittels PCR wurden alle Nierenproben bei -80 °C gelagert.

II.4 Hypoxiekäfig

Der verwendete Hypoxiekäfig wurde von der Institutswerkstatt hergestellt. Er bestand aus durchsichtigem Plexiglas und wurde mittels einer durchlöcherten Trennwand in zwei Teile geteilt, sodass männliche und weibliche Tiere getrennt eingesetzt werden konnten. Über zwei kleine Entnahmeöffnungen im Dach der Kammer konnten die Mäuse ohne größere CO-/O₂-Konzentrationsschwankungen eingesetzt und entnommen werden.

Vor dem Einstrom von CO in den Käfig über drei Gaszugänge wurde dieses mit Raumluft gemischt. Durch das hohe Volumen (6-7 l), welches die Kammer so pro Minute durchströmte, waren gleich hohe CO-Konzentrationen in allen Bereichen der Kammer gewährleistet und eine Ansammlung von CO₂ und H₂O wurde verhindert. Das Gas für die hypoxische Hypoxie (8% O₂ / 92% N₂) (LINDE Gas, Pullach) wurde ohne Beimengung von Raumluft direkt dem Hypoxiekasten zugeführt.

Zur genauen Einstellung der gewünschten CO- oder O₂-Konzentration in der Kammer wurden regelmäßige Kontrollmessungen vorgenommen (Rauchgasmessgerät testo 300 M). Erst wenn das System über 15 min konstante Konzentrationswerte lieferte, wurde das erste Versuchstier eingesetzt. Weitere Tiere (jeweils abwechselnd KO und WT) folgten im Abstand von 15 min um später genügend Zeit für die Blut- und Organentnahme zu gewährleisten. Während der gesamten Expositionszeit wurden im Abstand von 15-20 min Kontrollmessungen durchgeführt, um zu versichern, dass alle Mäuse der gleichen CO-/O₂-Konzentration ausgesetzt waren.

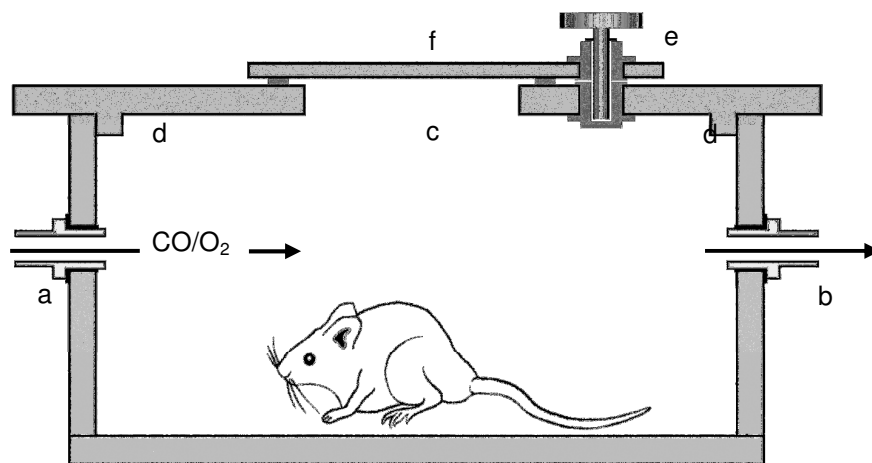


Abb. 7: Längsschnitt der Hypoxie-Kammer. a: Lufteinlass, b: Luftauslass, c: Entnahmeöffnung, d: Abdeckplatte, e: Feststell-Schraube, f: Schwenkbare Abdeckplatte.

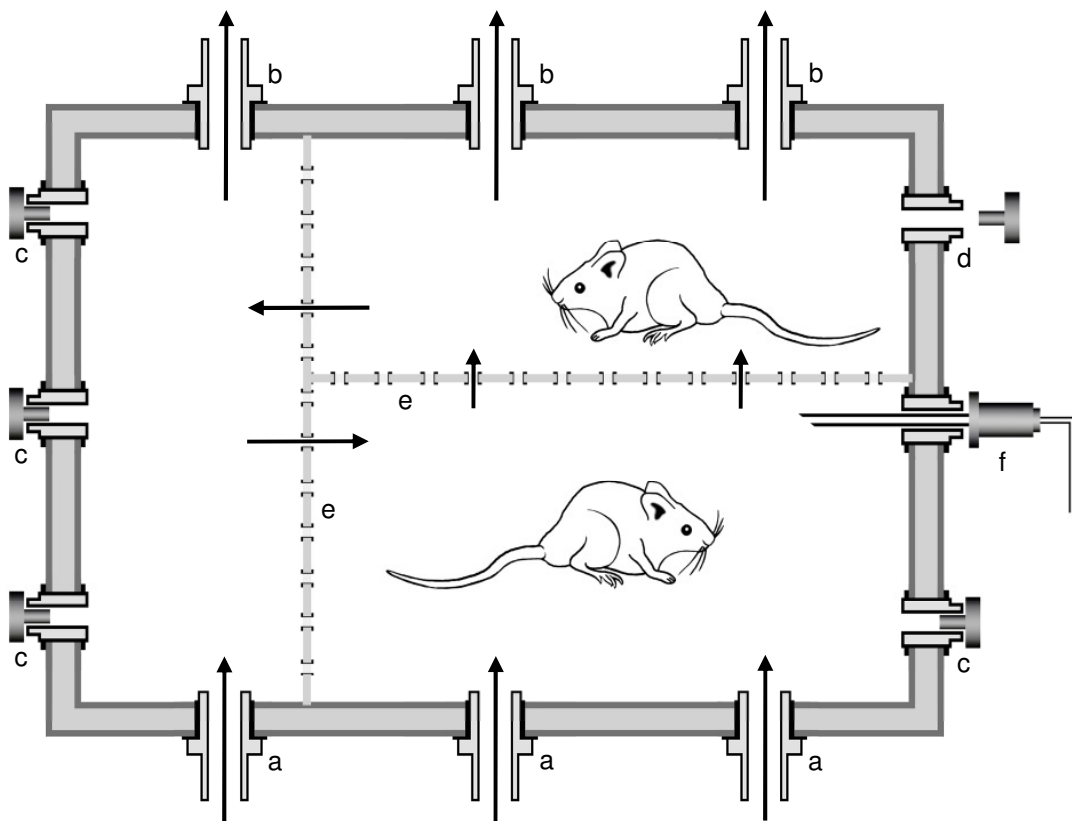


Abb. 8: Aufsicht der Hypoxiekammer. a: Lufteinlass, b: Luftauslass, c: Mess-Schleuse, d Mess-Schleuse geöffnet, e: luft-durchlässige Lochtrennwand, f: Rauchgasmess-Sonde in der Mess-Schleuse.

II.5 Messmethodik

II.5.1 Hkt-Bestimmung

Zur Bestimmung des Hkt der Versuchstiere wurden heparinisierte Kapillaren (75 μ l, Hirschmann) verwendet, welche mit 4000 x g in einer Hämatokrit-Zentrifuge (Mikro 12-24, Hettich) zentrifugiert wurden. Der Hkt-Wert wurde anschließend mittels eines Hkt-Lesegerätes (Hawksley Micro-Haematocrit Reader) ermittelt (Angaben in %).

II.5.2 EPO-ELISA

Zur quantitativen Bestimmung von EPO im Serum der Mäuse vor und nach Hypoxie und Anämie wurde das EPO-ELISA Kit medac verwendet (38, 149). Dieser monoklonale Enzymimmunoassay ist gegen den „3rd International Standard for EPO, rDNA derived (41st Meeting of the WHO ECBS, Oct. 1990)“ kalibriert. Die Ergebnisse werden in mIU/ml angegeben.

Das Testprinzip beruht auf einer mit Anti-EPO-Antikörpern (Maus, monoklonal) beschichteten Mikrotiterplatte, auf welche das zu bestimmende Serum gegeben wird. EPO aus dem Mäuse-Serum bindet an den Antikörper auf der Mikrotiterplatte. Es wird ein Konjugat mit Alkalischer Phosphatase (AP)-gekoppelten Anti-EPO-Antikörpern (Maus, monoklonal) hinzugegeben, die wiederum an das gebundene EPO binden. Es entsteht ein Sandwich-Komplex. Nach Waschen der Platte mit Waschpuffer wird ein pNPP (p-Nitrophenylphosphat und Diethanolamin)-Substrat hinzu gegeben, welches an die AP bindet und durch seine Absorptionseigenschaften die photometrische Auswertung möglich macht. Die Reaktion wird mit Natronlauge gestoppt und die Extinktion im Photometer (ELISA-Reader für Mikrotiterplatten) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

II.5.3 RNA-Isolation mit dem peqGOLD RNAPure™ System

Zur Bestimmung der Konzentration an AR-, β -Actin- und EPO-mRNA in der Niere musste zunächst die gesamte RNA aus der Niere extrahiert werden.

Das peqGOLD RNAPure™ System ist eine Methode um Gesamt-RNA, einschließlich mRNA und rRNA, zu extrahieren, wobei die erhaltene Lösung frei von DNA und Proteinen ist.

Zunächst wurden 20 mg des gefrorenen Nierengewebes mit 500 μ l peqGold RNAPure™ (mit Phenol und Guanidinisothiocyanat) mittels eines elektrischen Dispergiergerätes (Ultra-Turrax T8, IKA®-Werke) für ca. 30 sek bei höchster Drehzahl püriert. Nach jeder Zerkleinerung wurde das Gerät mit 3N NaOH, Aqua bidest und Ethanol gespült. Das Gemisch wurde fünf Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend mit 200 μ l

Chloroform versetzt und für 15 sec mit einem Reagenzglas mixer (Vortex Genie 2) kräftig geschüttelt. Nach weiteren fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die Probe fünf Minuten lang bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5417R), was zur ihrer Trennung in drei Phasen führte, wovon die oberste die RNA enthielt. Diese farblose wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Ausfällung der RNA wurden nun 0,5 ml Isopropanol zu jeder Probe hinzu gegeben, das Gemisch zehn Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für zehn Minuten bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Hierbei entstand ein RNA-Präzipitat von gelartiger Konsistenz, das an der Unterseite des Röhrchens zu liegen kam. Der Isopropanol-Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und das Pellet dreimal mit 1 ml 75%igem Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (5 Minuten, 12 000 x g und 4°C) gewaschen. Daraufhin wurde das Pellet für ca. eine Stunde an der Luft getrocknet und nachfolgend in 50 µl DEPC-Wasser (0,1%iges Diethylpyrocarbonat + Aqua bidest) gelöst. Nach 24 Stunden wurde die Menge an RNA am Photometer (Ultrospec 3 100 pro) bei 260 und 280 nm Wellenlänge gemessen. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen bei einer Verdünnung von 1 : 20 mit DEPC-Wasser. Um die Reinheit der Proben zu garantieren, musste die OD_{260}/OD_{280} Ratio zwischen 1 800 und 2 100 liegen. Die Messwerte der Gesamt-RNA wurden in µg/ml angegeben. Für die Reverse Transkription der Proben wurde jeweils der Mittelwert der Doppelbestimmung verwendet.

II.5.4 Reverse Transkription

Zur Messung der Konzentration bestimmter mRNA im LightCycler muss diese zunächst in die entsprechende cDNA umgeschrieben werden. Dies geschah mittels einer Reverse Transkriptase Reaktion im Thermocycler (Thermocycler Gen Amp 2500, Perkin Elmer).

Zunächst wurden 5 µl der gesamt-RNA-Proben mit ddH₂O auf eine Konzentration von 125 ng/µl verdünnt. Dann wurde ein Mastermix aus folgenden Substanzen erstellt (Menge pro umzuschreibende Probe in

Klammern): ddH₂O (8,5 µl) , 10x Puffer PCR II (2 µl), 25 mM MgCl₂-Lösung (4 µl), 10 mM dNTP (2 µl), 500 ng/µl Oligo (dT)₁₅ Primer (0,5 µl) und 500 ng/µl Random (N)₆ Primer (0,5 µl). Nach jedem Pipettierschritt wurde der Ansatz mit einem Reagenzglas mixer geschüttelt. Als letztes wurden für jede mRNA-Probe 0,5 µl AMV-RT DNA Polymerase hinzu gegeben. Jeweils 18 µl des Mastermix wurden in 0,5 ml Safe-Lock Gefäße vorgelegt und anschließend 2 µl der verdünnten Probe (125 ng/µl) dazu pipettiert. Es folgte die Reverse Transkription im Thermocycler nach folgendem Programm: Inkubation bei 42 °C für 60 Minuten, anschließend Erhitzung auf 95 °C für 5 Minuten, um den Transkriptionsvorgang zu terminieren, danach Abkühlung auf 4 °C. Die entstandenen stabilen mRNA/cDNA-Hybride wurden bis zur Quantifizierung durch die PCR bei -20 °C gelagert. Alle verwendeten Materialien waren steril sowie DNase- und RNase-frei.

II.5.5 RT- PCR

Zur absoluten Quantifizierung der AR- und EPO-mRNA wurde die „Real Time“ Polymerase Kettenreaktion mit externem Standard und Housekeeping-Gen (=β-Actin-mRNA) eingesetzt (20).

II.5.5. a) Grundlagen

Das Grundprinzip der Polymerase Kettenreaktion besteht in einer exponentiellen Vermehrung von DNA-Abschnitten in mehreren aufeinander folgenden Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus der Zerlegung der DNA-Doppelhelix in Einzelstränge durch hohe Temperatur (*Melting-Phase*), Anlagerung von spezifischen Primern an den gewünschten DNA-Abschnitt (*Annealing-Phase*) und abschließender *Elongations-Phase*, in der eine hitzestabile DNA-Polymerase komplementär zu den Einzelsträngen neue DNA synthetisiert. Somit wird der betreffende DNA-Abschnitt mit jedem Zyklus identisch verdoppelt.

Im Detektionskit „LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green“ (Roche) ist ein fluoreszierender Farbstoff enthalten (SYBR Green I), der nur an doppelsträngige DNA bindet. Mithilfe dieses Farbstoffes kann während der

gesamten PCR die neu gebildete DNA in jeder Probe quantifiziert werden: Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz der einzelnen Proben bestimmt. Je mehr Template (DNA) zu Beginn in der Probe enthalten war, desto weniger Zyklen werden gebraucht, bis die Fluoreszenz zum ersten Mal statistisch signifikant (above background) messbar ist. Dieser Punkt wird threshold cycle (C_t) genannt ist umso kleiner, je mehr Template zu Beginn vorhanden war. Außerdem trägt der Farbstoff dazu bei, dass die Schmelztemperatur und damit die Reinheit jedes einzelnen Templates bestimmt werden kann.

Um die eingesetzten Proben absolut zu quantifizieren, wurden Standards mit bekannten Konzentrationen eingesetzt, die in getrennten Kapillaren im gleichen Lauf vermessen wurden. Zusätzlich wurde von jeder Probe die β -Actin-mRNA als Housekeeping-Gen (= ein Gen, das konstant und in großer Menge in dem zu analysierenden Gewebe exprimiert wird) bestimmt und die endgültige Konzentration des gesuchten Gens in Relation zu diesem angegeben. Diese Methode sollte Fehler, die durch verschiedene Qualitätseinbußen der einzelnen Proben hätten entstehen können, kompensieren.

II.5.5. b) Primer

Sense- und Antisense- Primer für jeden der vier Adenosin-Rezeptoren (A1, A2a, A2b, A3) sowie für mEPO (mouse EPO) und mACT β (mouse β -Actin) wurden von der Firma QIAGEN bezogen und bestanden aus den in Tab.1 angegebenen Sequenzen.

Tab. 1: Für die PCR verwendete Primer und ihre Sequenzen, sowie Längen der Primer und ihres Produktes. bp =Basenpaare. F = forward (sense). R = reverse (antisense). AdoR/AR = Adenosin-Rezeptor. m = mouse. Analyse durch QIAGEN OPERON, Hilden.

Primer	Sequenz 5´ nach 3´	Länge
mAdoRA1-F	CGTACATCTCGGCCTTCCA	19 bp
mAdoRA1-R	AAGTAGGTCTGTGGCCCAATG	21 bp
<i>Produkt (A1-AR)</i>		223 bp
mAdoRA2a-F	GTCCCTGGCCATCATCGTA	19 bp

mAdoRA2a-R	GGATCCTGTAGGCGTAGATGAA	22 bp
<i>Produkt (A2a-AR)</i>		179 bp
mAdoRA2b-F	CTTCCACGGCTGCCTCTTC	19 bp
mAdoRA2b-R	CCATCCCCCAGTTCTGTGC	19 bp
<i>Produkt (A2b-AR)</i>		258 bp
mAdoRA3-F	CCGTTCCGTGGTCAGTTTG	19 bp
mAdoRA3-R	TGCAGGCGTAGACAATAGGG	20 bp
<i>Produkt (A3-AR)</i>		350 bp
mEPO-F	AATGAAGGTGGAAGAACAGG	20 bp
mEPO-R	ACCCGAAGCAGTGAAGTGA	19 bp
<i>Produkt (EPO)</i>		174 bp
mACTB-F	TCTGGCACCCACCTTCTACA	21 bp
mACTB-R	GGGGTGTGAAGGTCTCAAAC	21 bp
<i>Produkt (mACTB)</i>		252 bp

Mit jedem Primer-Paar wurden mehrere PCR-Durchgänge im Lightcycler durchgeführt, bis das optimale PCR-Protokoll (Temperaturprogramm und Anzahl der Zyklen) sowie die optimale MgCl₂-Konzentration ermittelt waren (Tab.2).

Tab. 2: Optimale PCR-Protokolle und MgCl₂-Konzentrationen für die einzelnen Primer-Paare. Angaben Temperaturprogramm: jeweils Temperatur in °C/Zeit in sek für einen Zyklus (= melting // annealing // elongation). mM = Millimol. MgCl₂ = Magnesiumchlorid.

Primer	Temperaturprogramm	Anzahl Zyklen	MgCl₂-Konzentration
mAdoA1	95/5 // 60/5 // 72/9	45	4 mM
mAdoA2a	95/5 // 62/5 // 72/7	59	4 mM
mAdoA2b	95/10 // 68/5 // 72/10	50	2,5 mM
mAdoA3	95/10 // 64/5 // 72/14	45	4 mM
mEPO	95/5 // 68/10 // 72/10	55	3 mM
mACTB	95/10 // 68/5 // 72/8	55	3 mM

2.5.5 c) Standard-Produktion

Standards für die Messung der EPO- und der β -Actin-mRNA wurden bereits von einer anderen Arbeitsgruppe in unserem Labor hergestellt und für diese Arbeit verwendet. Es mussten nur noch Standards für die A1-, A2a-, A2b- und A3-ARmRNA produziert werden.

Gewinnung von DNA-Templates für die Standard-Produktion

Zur Gewinnung von Templates für die Standard-Herstellung wurde mRNA aus Mäuse-Nieren isoliert und mithilfe der entsprechenden Primer eine Reverse Transkription durchgeführt, sodass cDNA von jedem ADO-Rezeptor vorlag. Für jede Rezeptor-cDNA wurde mit dem entsprechend optimierten Lightcycler-PCR-Protokoll und den entsprechenden Primern eine qualitative PCR durchgeführt und die Produkte mittels Gel-Elektrophorese dargestellt.

Klonierung der DNA-Templates für die Standard-Produktion

Zur Klonierung der DNA-Templates wurde das TOPO TA Cloning® Set von Invitrogen verwendet. Hierzu wurden von jedem Rezeptor jeweils 2 μ l der cDNA mit 2 μ l sterilem Wasser, 1 μ l Salzlösung (1,2M NaCl; 0,06M MgCl₂) und 1 μ l Topo® Vektor versetzt und 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert, sodass die cDNA in den Vektor eingeschlossen werden konnte. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt, indem sie auf Eis gelegt wurde. Das Produkt wurde nun in One Shot® TOP10 chemisch kompetente E.coli-Bakterien transformiert: 2 μ l der Reaktionsmischung wurden in jeweils ein Gefäß mit Bakterien gegeben, für ca. 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 sec im Hitzebad (42°C) erhitzt. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis wurden 250 μ l S.O.C. Medium hinzu gegeben und die ganze Mischung für eine Stunde bei 37°C und 200 rpm horizontal geschüttelt. Währenddessen wurden acht mit 100 μ g/ml Ampicillin versetzte LB-Platten (Zusammensetzung: 10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar) mit 40 mg/ml X-Gal-Farbstoff in Dimethylformamid (DMF) bestrichen und anschließend auf 37°C erwärmt. X-Gal ist blau und wird sichtbar, wenn das Bakterien-Plasmid die DNA nicht integriert hat. Nach

einer Stunde wurden 10 – 50 µl aus jeder Reaktionsmischung, welche nun transformierte Bakterien, d.h. Bakterien mit integrierter cDNA in ihrem Plasmid, enthielt, auf jeweils zwei der vorgewärmten LB-Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag waren auf jeder Platte 15 bis mehrere hundert Kolonien entstanden. Pro Rezeptor wurden vier weiße Kolonien von den entsprechenden Platten entnommen und jeweils in ein Gefäß mit 5 ml LB-Medium (10 g/l Bactotrypton + 5 g/l Hefeextrakt) und 5 µl Ampicillin gegeben. Diese Gefäße wurden über Nacht bei 37 °C horizontal geschüttelt (200 rpm). Dies führte zur weiteren Vermehrung der Bakterien, welche die gewünschte DNA in ihren Plasmiden enthalten sollten. Um sicher zu gehen, dass dies der Fall war, wurden die Transformanten im folgenden Schritt analysiert.

Restriktionsanalyse und Quantifizierung der klonierten Plasmid-DNA

Zur Ausfällung der Bakterien aus der Reaktionsmischung wurde das Gemisch für 10 min bei 2 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Isolation der Plasmid-DNA mithilfe des E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II (Classic Line) von PEQLAB durchgeführt:

Im ersten Schritt wurden die Bakterien durch Zugabe zweier Lösungen aus dem Kit lysiert. Nach Neutralisierung des alkalischen Lysats mit einer weiteren Lösung wurde der Ansatz durch Zentrifugation und dadurch Pelletieren des bakteriellen Debris geklärt und das geklärte Lysat auf eine HiBind®-Miniprep-Säule geladen. Die Plasmid-DNA wurde an die in der Säule enthaltene Silikamembran gebunden und konnte durch einfaches Waschen von Kontaminationen und Enzyminhibitoren gereinigt werden. Im Anschluss an das Trocknen der Säule wurde die saubere Plasmid-DNA in TE-Puffer eluiert (10 mM Tris (=Tris(hydroxyethyl)aminomethan) / HCl pH 8,0 / 1 mM EDTA).

Zur Isolation der Rezeptor-DNA, die in dem Bakterienplasmid enthalten war, wurde ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI durchgeführt. Das isolierte Plasmid wurde mit 5 µl dd H₂O, 1 µl 10xPuffer und 1 µl EcoR I (10 U/µl; Roche) versetzt und für eine Stunde bei 37 °C im

Thermocycler inkubiert. Das gewonnene Produkt wurde mittels Gel-Elektrophorese analysiert und photometrisch quantifiziert. Aus der errechneten Konzentration an DNA in jeder Probe (in ng / μl), dem Gewicht eines Basenpaares (= 660 g/mol), sowie der Anzahl bp der einzelnen Rezeptoren-DNA (s.o.) ließ sich die Menge an DNA-Strängen (Plasmiden) pro μl errechnen.

Erstellung von Standard-Verdünnungsreihen und Standard-Kurven

Die höchste Konzentration in unserer Standard-Verdünnungsreihe sollte 5×10^8 Plasmide / μl enthalten. 10 μl der Proben wurden zunächst mit ddH₂O so verdünnt, dass diese Konzentration erreicht wurde. Daraufhin wurden acht Verdünnungen mit abfallender Plasmid-Konzentration hergestellt, indem jeweils 100 μl aus der höheren Verdünnung mit 900 μl Wasser versetzt wurden (Tab.3).

Tab. 3: Für die PCR verwendete Standards mit ihren jeweiligen DNA-Konzentrationen.

Standard	Konzentration	Endkonzentration (2 μl Probe in PCR)
S1	5×10^8 Plasmide/ μl	1×10^9 Plasmide
S2	5×10^7 Plasmide/ μl	1×10^8 Plasmide
S3	5×10^6 Plasmide/ μl	1×10^7 Plasmide
S4	5×10^5 Plasmide/ μl	1×10^6 Plasmide
S5	5×10^4 Plasmide/ μl	1×10^5 Plasmide
S6	5×10^3 Plasmide/ μl	1×10^4 Plasmide
S7	5×10^2 Plasmide/ μl	1×10^3 Plasmide
S8	5×10 Plasmide/ μl	1×10^2 Plasmide

Mit allen acht Verdünnungen wurden im Lightcycler Probe-Kurven erstellt, um die Genauigkeit der Standard-Konzentrationen zu überprüfen. Dabei fanden die zu Anfang ermittelten PCR-Protokolle (s.o.) Verwendung.

2.5.5 d) Absolute Quantifizierung der Rezeptor-, EPO- und β -Actin-cDNA im Lightcycler

Die durch die Reverse Transkription erhaltene cDNA (s.o.) wurde im LightCycler PCR Analysesystem (Hoffmann-La Roche) und mithilfe des LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Hoffmann-La Roche) absolut quantifiziert.

Von jeder Probe wurde in getrennten Läufen die cDNA von β -Actin, EPO, A1AR, A2aAR, A2bAR und A3AR mit den jeweils spezifischen Primern bestimmt. In jedem Lauf wurden außerdem die entsprechenden Standards zur Erstellung einer Standard-Kurve mit gemessen, sodass die Proben absolut quantifiziert werden konnten. Zunächst wurde ein Mastermix hergestellt, der pro zu messender Probe 12,6 μ l PCR-Wasser und 2,4 μ l MgCl_2 -Lösung (für 4 mM MgCl_2), bzw. 13,4 μ l PCR-Wasser und 1,6 μ l MgCl_2 -Lösung (für 3 mM MgCl_2), bzw. 13,8 μ l PCR-Wasser und 1,2 μ l MgCl_2 -Lösung (für 2,5 mM MgCl_2) enthielt. Außerdem kamen je Probe 0,5 μ l Forward- und 0,5 μ l Reverse-Primer für das spezifische Gen und 2 μ l 10 x PCR-Mix aus dem LC-Kit hinzu (dieser enthält ebenfalls 1 mM MgCl_2). Nach jedem Pipettierschritt wurde der Ansatz mit einem Reagenzglas mixer geschüttelt. Je 18 μ l dieses Mastermix wurden in eine PCR-Reaktions-Kapillare vorgelegt und 2 μ l der zu messenden Probe hinzu gegeben. Die Kapillaren wurden verschlossen und bei 3000 rpm eine Minute lang zentrifugiert. Anschließend wurde die PCR mit o.g. entsprechendem Temperaturprogramm durchgeführt. Die Menge an mRNA in jeder Probe wurde mithilfe des LightCycler Data Analysis Programms und der Standard-Kurven quantifiziert und die Ergebnisse als mRNA pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA angegeben.

2.5.6 Agarose Gel-Elektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird ein elektrisches Feld verwendet, um negativ geladene DNA-Moleküle durch eine Gelmatrix zu ziehen. Kleinere DNA-Moleküle bewegen sich schneller durch das Gel, wodurch eine

Auftrennung von DNA-Strängen nach ihrer Größe ermöglicht wird. Als Gel verwendeten wir eine ca. 1%ige Argarose-Lösung in TBE-Puffer (5fach-Puffer: 54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 mol 0,5M EDTA pro Liter) mit 1ml Ethidiumbromid pro 10 ml Gellösung. Das feste Gel wurde mit 0,5x TBE-Laufpuffer bedeckt und jeweils 5µl der zu untersuchenden DNA-Proben in eine Tasche an der negativen Elektrode der Gelkammer gegeben. In zwei Slots wurde zu Vergleichszwecken eine DNA-Leiter (1kb, Invitrogen) gespritzt. Es wurde eine elektrische Spannung von 120 V angelegt bis die Stränge genügend aufgetrennt waren. Das Gel konnte auf einem UV-Tisch (Biometra TI-1) betrachtet und fotografiert werden (CSC-Kamera, Raytest). Durch die Anlagerung von Ethidiumbromid an die DNA wurde das Produkt als Bande sichtbar und seine Länge konnte durch Vergleich mit der DNA-Leiter bestimmt werden. Außerdem wurde ersichtlich, ob es sich um ein einzelnes, reines Produkt handelte, oder ob unerwünschte Nebenprodukte vorhanden waren.

II.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm JMP 4.0.0. Alle Daten wurden als Mean \pm SEM angegeben und dargestellt. Gruppenvergleiche für unverbundene Stichproben wurden mittels student's t-Test durchgeführt und $p < 0,05$ als signifikant gewertet. Diagramme wurden mit dem Grafikprogramm Microcal Origin 6.0G erstellt.

III. ERGEBNISSE

Bei keinem der durchgeführten Versuche wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Serum-EPO-Konzentration oder der EPO-mRNA in der Niere und dem Körpergewicht oder Geschlecht der Versuchstiere festgestellt (Ergebnisse werden nicht gezeigt).

III.1 Normoxieversuche

Bei der Bestimmung des Hämatokrits, der basalen EPO-Serumkonzentration sowie der EPO- und AR-mRNA unter Normoxie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen KO- und WT-Mäusen (**Abb.9-11, Tab.4+5**).

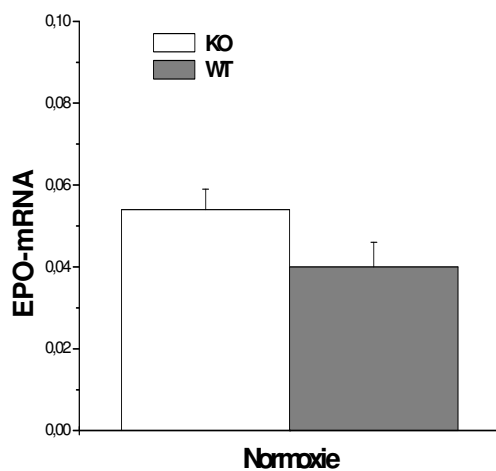


Abb.9: EPO-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie.
Daten werden als Mean \pm SEM angegeben.
n = 4.

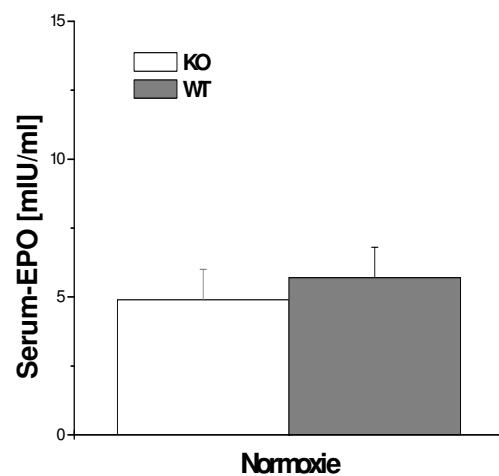


Abb.10: EPO-Serumkonzentrationen bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. n = 4.

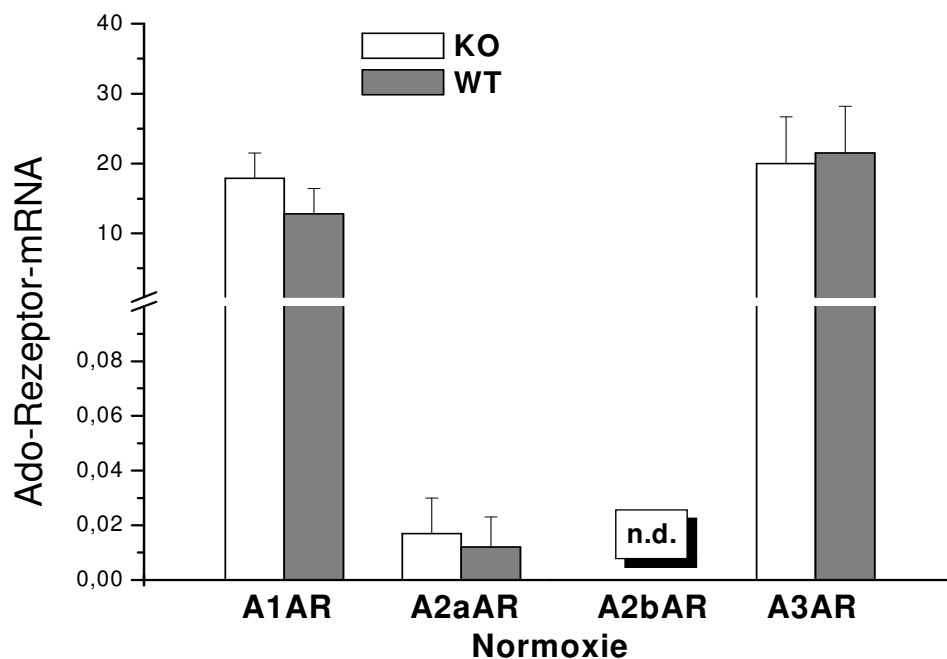


Abb.11: Ado-Rezeptoren-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO/-WT-Mäusen unter Normoxie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. n = 4. n.d. = nicht determinierbar wegen zu kleiner Menge.

Tab.4: Hämatokrit, EPO-Serumkonzentrationen und EPO-mRNA bei Ekto5'-KO/-WT-Mäusen unter Normoxie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben.

	n	Gewicht [g]	Hkt [%]	EPO im Serum [mIU/ml]	Epo mRNA [Kopien/1000 Kopien β -Actin-mRNA]
Ekto-5'-KO	4	23,8 \pm 1,5	41,0 \pm 1,9	4,9 \pm 1,1	0,054 \pm 0,005
Ekto-5'-WT	4	22,1 \pm 1,5	39,8 \pm 1,9	5,7 \pm 1,1	0,040 \pm 0,006

Tab.5: Ado-Rezeptoren-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-Mäusen unter Normoxie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. n.d. = nicht determinierbar wegen zu kleiner Menge.

	n	A1-AR mRNA	A2a-AR mRNA	A2b-AR mRNA	A3-AR mRNA
Ekto-5'-KO	4	17,9 \pm 3,6	0,017 \pm 0,013	n.d.	20,0 \pm 6,7
Ekto-5'-WT	4	12,8 \pm 3,6	0,012 \pm 0,011	n.d.	21,5 \pm 6,7

III.2 Versuche in funktioneller Hypoxie

Die Hämatokrit-Werte zeigten nach vierstündiger CO-Exposition keinen signifikanten Unterschied zwischen KO- und WT-Mäusen oder zwischen 400 und 750 ppm. Auch im Vergleich zu den Hkt-Werten unter Normoxie wurden keine signifikanten Veränderungen deutlich (**Tab.6**).

Bezüglich der Menge an EPO-mRNA in der Niere nach funktioneller Hypoxie unterschieden sich KO- und WT-Mäuse weder bei 400 ppm noch bei 750 ppm signifikant voneinander (**Abb.12, Tab.6**). Im Vergleich zur Normoxie stiegen die Werte sowohl bei den KO- als auch bei den WT-Mäusen deutlich an: bei 400 ppm waren sie jeweils signifikant um das ca. 20fache gegenüber Normoxie erhöht. Bei 750 ppm betrug der Faktor etwa 35 für die KO- und 54 für die WT-Mäuse (beide signifikant!). Zwischen 400 ppm und 750 ppm wurde die EPO-mRNA-Expimierung bei den KO-Mäusen um das ca. 1,8fache und bei den WT-Mäusen um das ca. 2,6fache jeweils signifikant gesteigert (**Abb.12, Tab.6**).

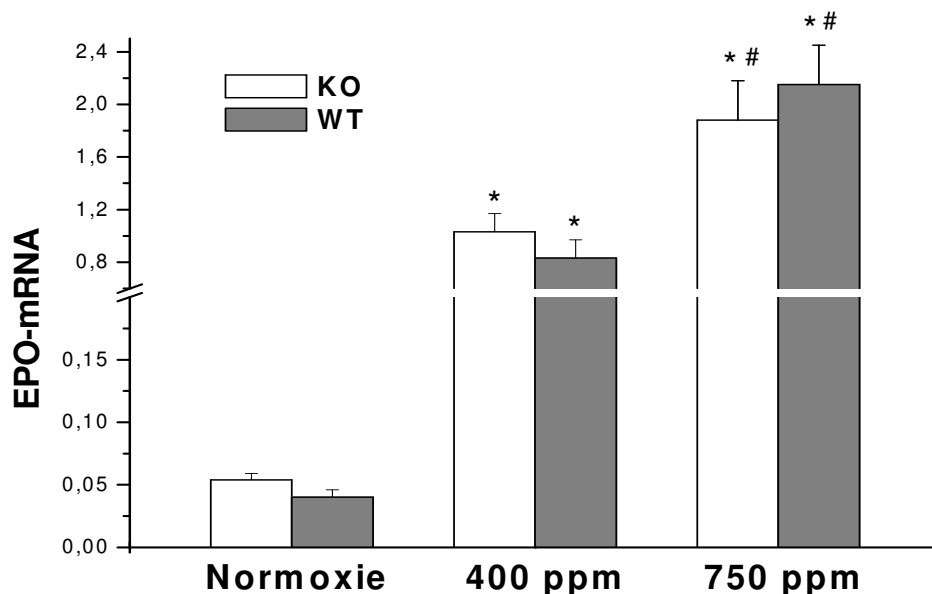


Abb.12: EPO-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie und nach 4h CO-Exposition bei 400 und 750 ppm. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. CO: n = jeweils 7. * p < 0,05 im Vergleich zu Normoxie. # p < 0,05 im Vergleich zu 400 ppm.

Nach vierstündiger CO-Exposition bei 400 sowie bei 750 ppm unterschieden sich die EPO-Plasmakonzentrationen der KO-Mäuse nicht signifikant von denen der WT-Mäuse. Sowohl bei den KO- als auch bei den WT-Mäusen kam es jedoch zwischen 400 und 750 ppm zu einer signifikanten Steigerung des EPO-Serum-Spiegels (ca. 3fach) (**Abb.13, Tab. 6**). Im Vergleich zu den Werten bei Normoxie stieg die EPO-Serumkonzentration bei 400 ppm auf das 25 - 33fache und bei 750 ppm auf das 75-90fache an (**Abb.13, Tab.6**).

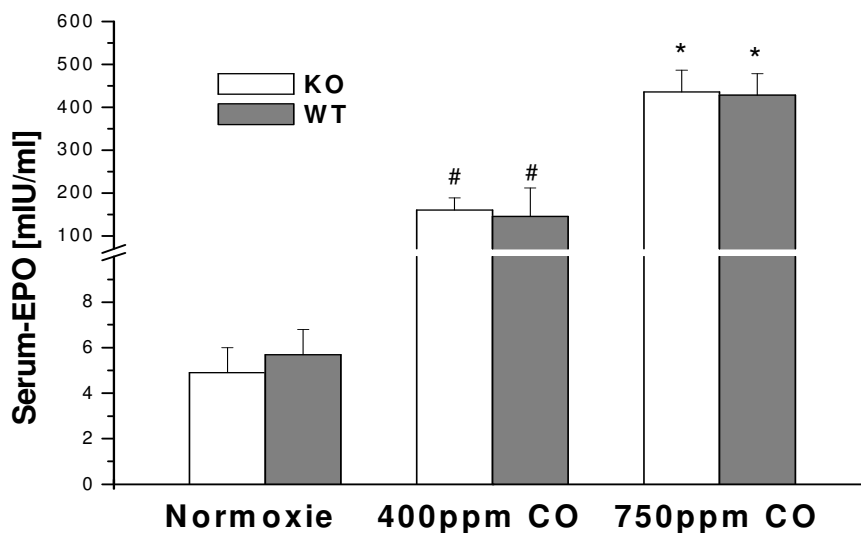


Abb.13: EPO-Serumkonzentrationen bei Ekto5'-KO/-WT-Mäusen unter Normoxie und nach 4h CO-Exposition bei 400 und 750 ppm. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. CO: n = jeweils 7. * p < 0,05 im Vergleich zu 400 ppm CO/4h und zu Normoxie. # p < 0,05 im Vergleich zu 750 ppm CO/4h und zu Normoxie.

Tab.6: Hämatokrit und EPO-Serumkonzentrationen bei Ekto5'-KO/-WT-Mäusen nach 4h CO-Exposition bei 400 und 750 ppm. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$ im Vergleich zu 400 ppm CO/4h.

	n	Gewicht [g]	Hkt [%]	EPO im Serum [mIU/ml]	Epo mRNA [Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA]
Normoxie:					
Ekto-5'-KO	4	23,8 \pm 1,5	41,0 \pm 1,9	4,9 \pm 1,1	0,054 \pm 0,005
Ekto-5'-WT	4	22,1 \pm 1,5	39,8 \pm 1,9	5,7 \pm 1,1	0,040 \pm 0,006
400 ppm:					
Ekto-5'-KO	7	23,1 \pm 1,5	38,4 \pm 0,8	161 \pm 28	1,03 \pm 0,14
Ekto-5'-WT	7	24,3 \pm 1,5	38,6 \pm 0,8	145 \pm 15	0,83 \pm 0,14
750 ppm:					
Ekto-5'-KO	7	20,3 \pm 1,5	38,3 \pm 0,8	436 \pm 51*	1,88 \pm 0,3*
Ekto-5'-WT	7	23,6 \pm 1,5	37,1 \pm 0,8	428 \pm 50*	2,15 \pm 0,3*

Die AR-mRNA wurde nach Exposition mit 400 ppm CO bestimmt. Bei keinem der Rezeptoren zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen KO- und WT-Mäusen (**Abb.14-17, Tab.7**).

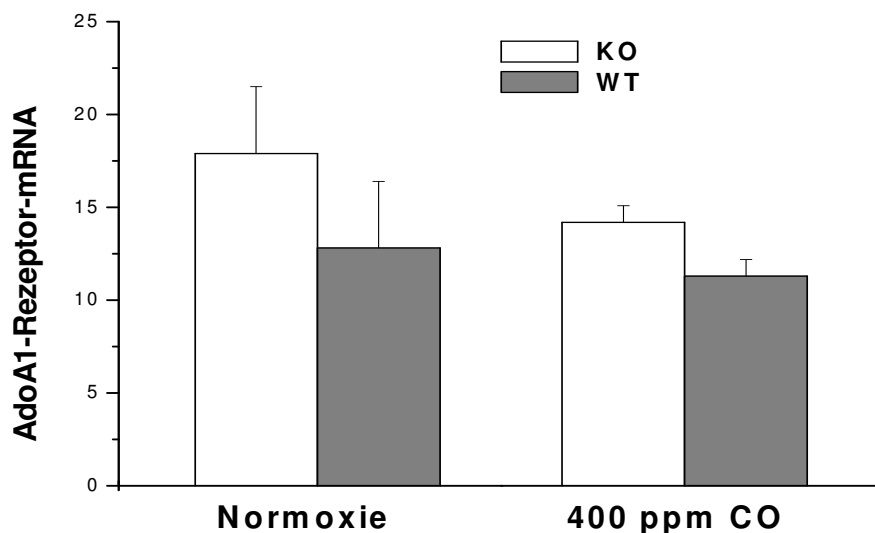


Abb.14: A1AR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO/-WT-Mäusen unter Normoxie und nach 4h CO-Exposition bei 400 ppm. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. CO: n = 5.

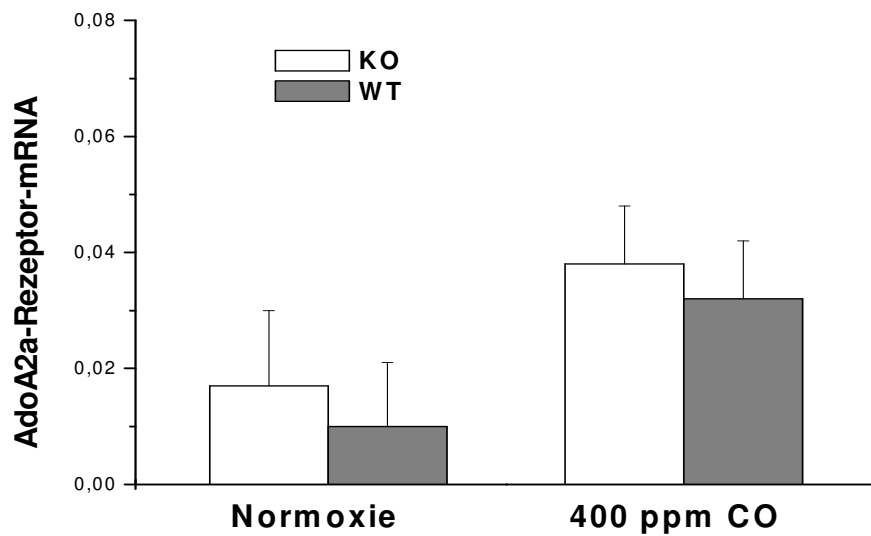


Abb.15: A2aAR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie und nach 4h CO-Exposition bei 400 ppm. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. CO: n = 5.

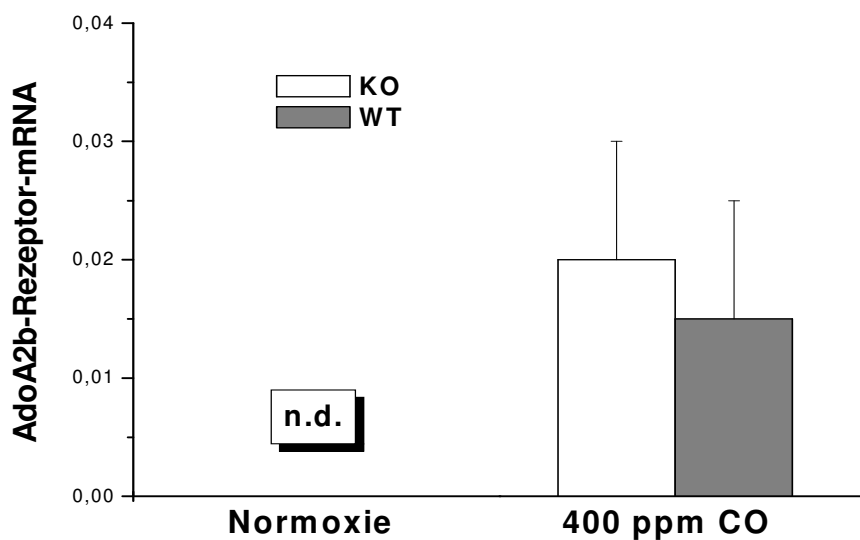


Abb.16: A2bAR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie und nach 4h CO-Exposition bei 400 ppm. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. CO: n = 5. n.d. = nicht determinierbar wegen zu kleiner Menge.

Die A1-, A2a- und A3-AR-mRNA zeigten nach CO-Exposition im Vergleich zur Normoxie keine signifikante Veränderung (**Abb.14,15+17**). Der A2bAR wurde nach funktioneller Hypoxie sowohl bei den KO- als auch bei den WT-Mäusen stärker exprimiert als unter Normoxie (**Abb.16**).

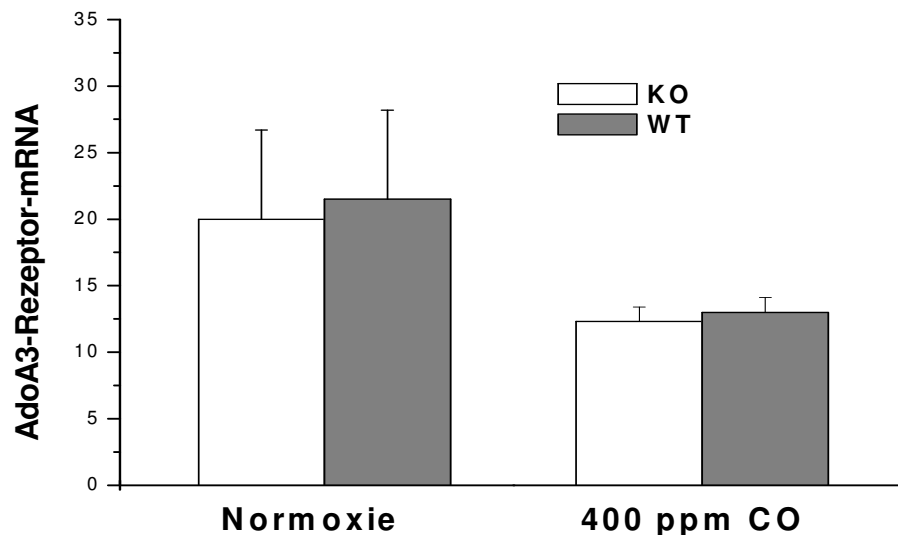


Abb. 17: A3AR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie und nach 4h CO-Exposition bei 400 ppm. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. CO: n = 5. * p < 0,05 im Vergleich zu 400 ppm CO/4h.

Tab.7: Ado-Rezeptoren-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen nach 4h CO-Exposition bei 400 ppm. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. * p < 0,05 im Vergleich zu KO-Mäusen.

	n	A1-AR mRNA	A2a-AR mRNA	A2b-AR mRNA	A3-AR mRNA
Ekto-5'-KO	5	14,2 \pm 0,9	0,038 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	12,3 \pm 1,1
Ekto-5'-WT	5	11,3 \pm 0,9	0,032 \pm 0,01	0,015 \pm 0,01	13,0 \pm 1,1

III.3. Versuche in hypoxischer Hypoxie

Bei den Versuchen mit 8%iger Sauerstoffexposition über vier Stunden zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede im Hämatokrit, in der EPO-mRNA oder in der EPO-Serumkonzentration zwischen Ekto5'-Nukleotidase KO- und WT-Mäusen (**Abb.18-19, Tab.8**).

Die EPO-mRNA war nach 4h hypoxischer Hypoxie signifikant um das 21fache (KO-Mäuse), bzw. 23fache (WT-Mäuse) gesteigert (**Abb.18**). Die Plasma-EPO-Konzentration war sowohl bei den KO- als auch bei den WT-Mäusen gegenüber normoxischen Bedingungen signifikant um das etwa 26fache erhöht (**Abb.19**). Die Hämatokrit-Werte zeigten im Vergleich zur Normoxie keine signifikanten Veränderungen.

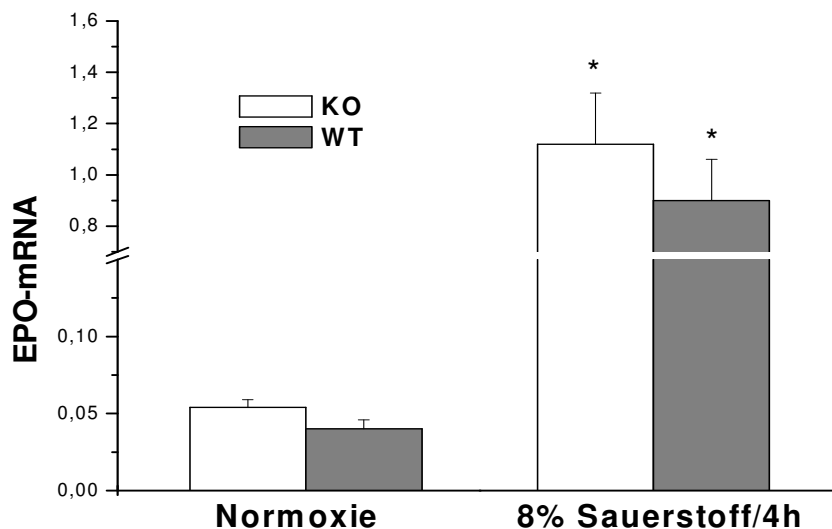


Abb.18: EPO-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie und nach 4h 8%iger Sauerstoffexposition. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. Hypoxie: n = jeweils 5. * p < 0,05 im Vergleich zu Normoxie.

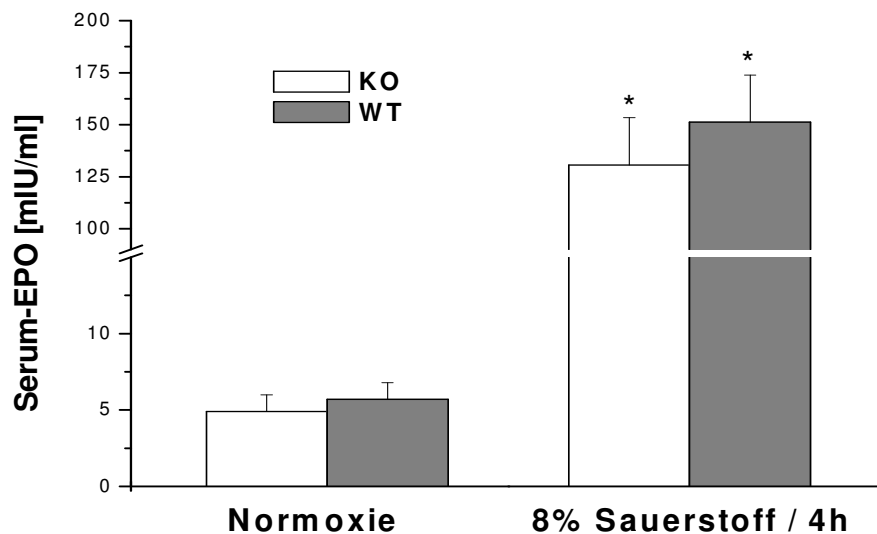


Abb.19: EPO-Serumkonzentrationen bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie und nach 4h 8%iger Sauerstoffexposition. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. Hypoxie: KO n = 5, WT n = 6. * p < 0,05 im Vergleich zu Normoxie.

Tab.8: Hkt, Serum-EPO-Konzentrationen und EPO-mRNA bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen nach 8%O₂/4h. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben.

	n	Gewicht [g]	Hkt [%]	EPO im Serum [mIU/ml]	Epo mRNA [Kopien pro1000 Kopien β -Actin-mRNA]
Ekto-5'-KO	5	26,4 \pm 2,9	43,4 \pm 2,0	130,7 \pm 22,7	1,12 \pm 0,2
Ekto-5'-WT	6	23,2 \pm 2,6	40,3 \pm 1,8	151,2 \pm 22,7	0,9 \pm 0,16

Bei der Bestimmung der Ado-Rezeptoren-mRNA in der Niere nach 8%iger Sauerstoffexposition über vier Stunden fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen KO- und WT-Mäusen (**Abb.20-23, Tab.9**).

Im Vergleich zur Normoxie fanden sich nach 8%iger Sauerstoffexposition beim A1AR, als auch beim A2aAR und beim A3AR weder bei den KO- noch bei den WT-Mäusen signifikante Unterschiede (**Abb.20, 21+23**). Die A2bAR-mRNA wurde bei KO- und WT-Mäusen nach hypoxischer Hypoxie stärker exprimiert als unter Normoxie (**Abb.22**).

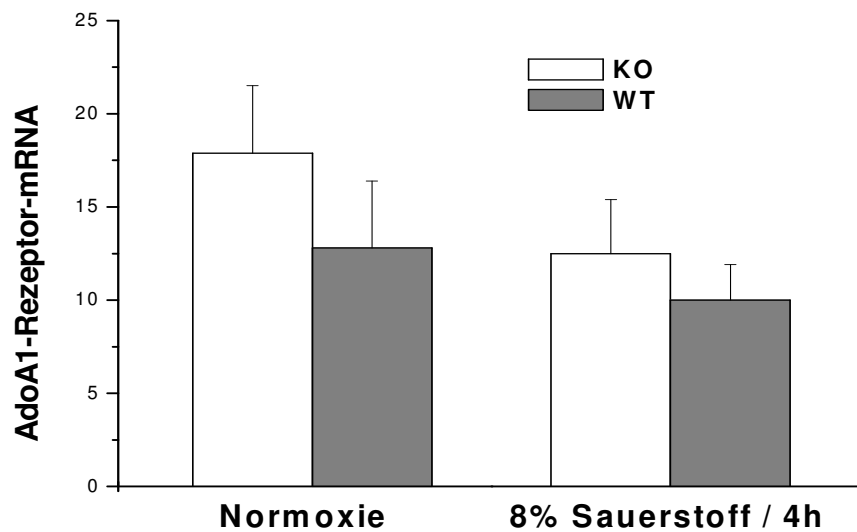


Abb.20: A1AR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen nach 4h 8%iger Sauerstoffexposition. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. Hypoxie: n = 5.

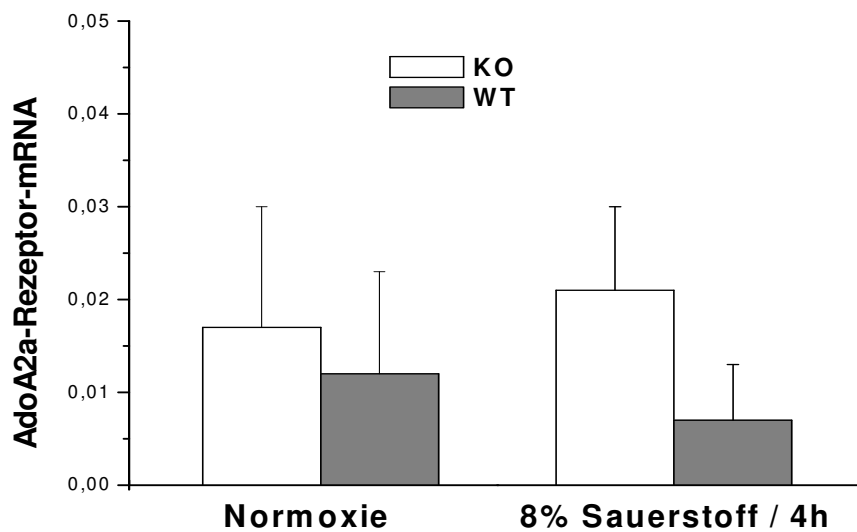


Abb.21: A2aAR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen nach 4h 8%iger Sauerstoffexposition. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. Hypoxie: n = 5.

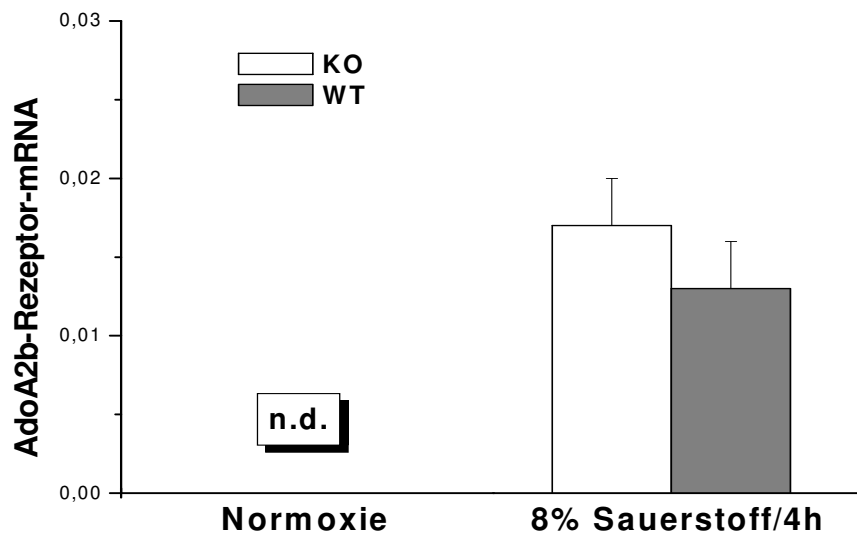


Abb.22: A2bAR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen nach 4h 8%iger Sauerstoffexposition. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. Hypoxie: n = 5. n.d. = nicht determinierbar wegen zu kleiner Menge.

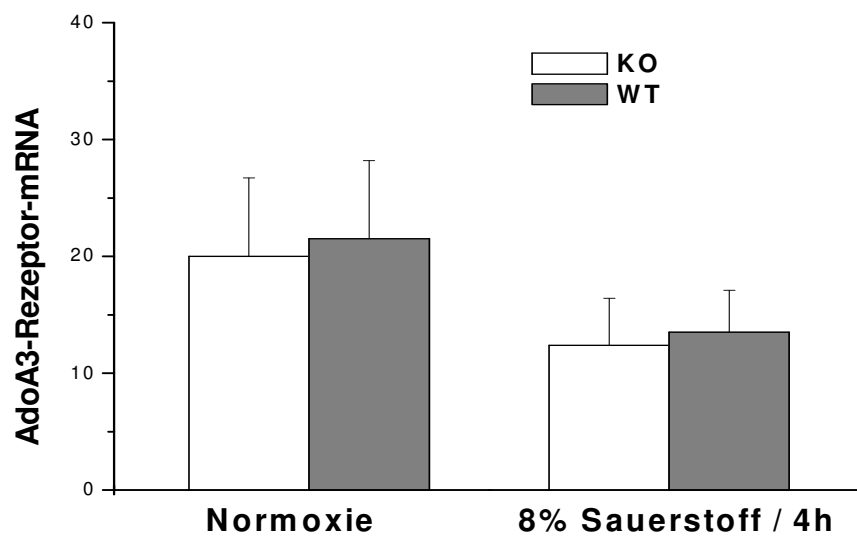


Abb.23: A3AR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen nach 4h 8%iger Sauerstoffexposition. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. Hypoxie: n = 5.

Tab.9: Ado-Rezeptoren-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen nach 4h 8%iger Sauerstoffexposition. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben.

	n	A1-AR mRNA	A2a-AR mRNA	A2b-AR mRNA	A3-AR mRNA
Ekto-5'-KO	5	12,5 \pm 2,9	0,02 \pm 0,01	0,017 \pm 0,003	12,4 \pm 4,0
Ekto-5'-WT	5	10,0 \pm 1,9	0,01 \pm 0,01	0,013 \pm 0,003	13,5 \pm 3,6

III.4 Versuche unter Anämie

In den Versuchen unter Anämie wurde den Mäusen 24 Stunden nach Beginn der Hämorrhagie die linke Niere entnommen und die EPO- und Adenosin-Rezeptoren-mRNA bestimmt. In der Menge der EPO-mRNA zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen KO- und WT-Mäusen (**Abb.24, Tab.10**). Im Vergleich zu den Normoxie-Versuchen stieg sie bei den KO-Mäusen um das 21,8fache und bei den WT-Mäusen um das 24,5fache jeweils signifikant an (**Abb.24**).

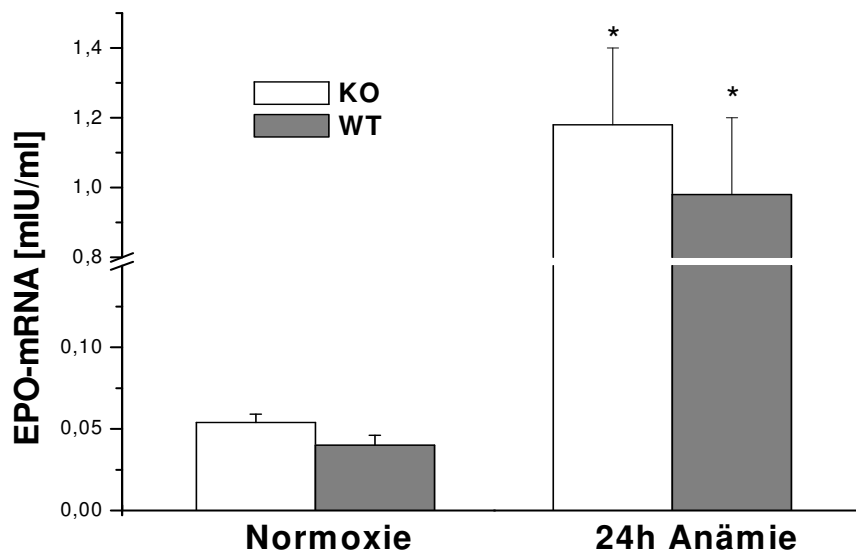


Abb.24: EPO-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie und nach 24h Anämie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. Anämie: n = jeweils 5. * p < 0,05 im Vergleich zu Normoxie.

Tab.10: EPO-mRNA bei Ekto5'-KO/-WT-Mäusen nach 24h Anämie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben.

	n	Gewicht [g]	Epo-mRNA [Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA]
Ekto-5'-KO	5	23,4 \pm 1,1	1,18 \pm 0,22
Ekto-5'-WT	5	24,8 \pm 1,0	0,98 \pm 0,22

Zum Zeitpunkt t_0 , nach drei, nach acht und nach 24 Stunden wurden jeweils der Hkt und die EPO-Serumkonzentration bestimmt. Die beiden Werte zeigten zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen Ekto-5'-KO- und WT-Mäusen (**Abb.25+26, Tab.11**).

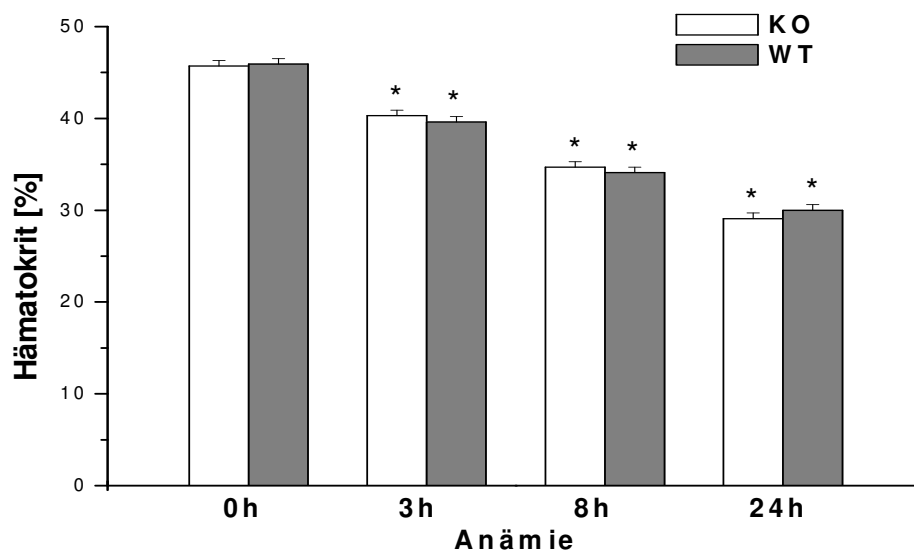


Abb.25: Hkt-Werte bei Ekto5'-KO/-WT-Mäusen unter Anämie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. KO: n = 7, WT: n = 9. * p < 0,05 im Vergleich zur Messung davor.

Der Hämatokrit nahm bei KO- und WT-Mäusen im Verlauf der Hamorrhagie konstant ab. Mit jeder Messung hatte er sich im Vergleich zur vorherigen Bestimmung signifikant verringert: Im Mittel um den Faktor 0,87 von t_0 nach t_3 , den Faktor 0,86 von t_3 nach t_8 und den Faktor 0,86 von t_8 nach t_{24} . Nach 24 Stunden Anämie war der Hkt-Wert im Vergleich zum Ausgangswert ca. um den Faktor 0,65 gesunken (**Abb.25, Tab.11**).

Die Serum-EPO-Konzentration stieg mit fortlaufender Anämie stetig an. Sowohl bei den KO- als auch bei den WT-Mäusen waren zu jedem Zeitpunkt nach t_0 die Werte gegenüber der Messung zuvor signifikant erhöht, von t_0 nach t_3 ca. 14-17fach, von t_3 nach t_8 ca. 2,2-2,6fach und von t_8 nach t_{24} ca. 2,3fach (**Abb.26, Tab.11**). Acht Stunden nach Beginn der Hämorrhagie war die Serum-EPO-Konzentration um das 33-44fache im Vergleich zum Ausgangswert angestiegen. Nach 24 Stunden Anämie war der Wert 76 bis 97 mal höher als zu Beginn des Versuchs.

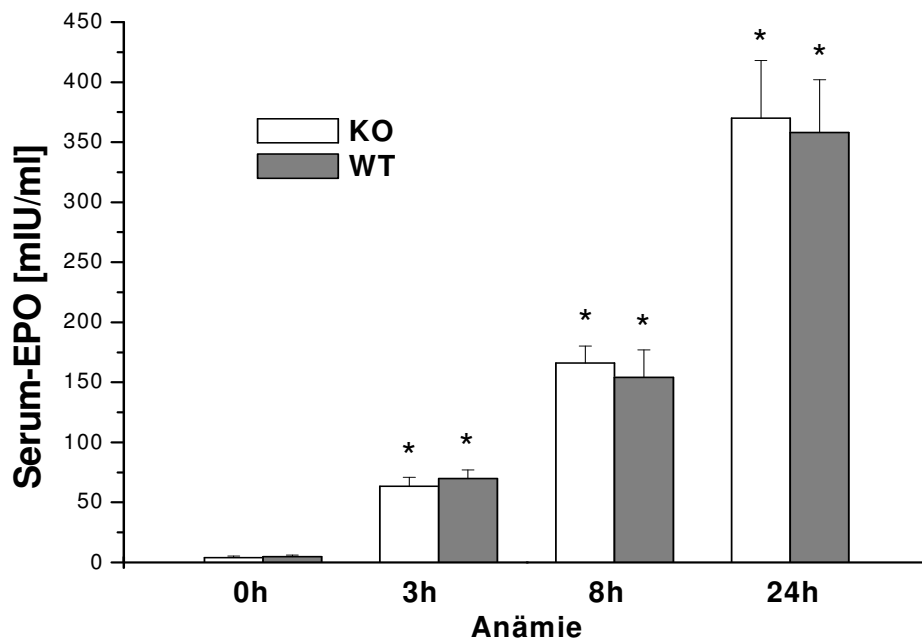


Abb.26: EPO-Serumkonzentrationen bei Ekto5'-KO/-WT-Mäusen unter Anämie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. KO: n = 7, WT: n = 9. * p < 0,05 im Vergleich zur Messung davor.

Tab.11: Hämatokrit und EPO-Serumkonzentrationen bei Ekto5'-KO/-WT-Mäusen unter Anämie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. * p < 0,05 im Vergleich zur Messung davor.

	n	Gewicht [g]	Hkt [%]	EPO im Serum [mIU/ml]
t₀				
Ekto-5'-KO	7	23,1 \pm 1,1	45,7 \pm 0,6	3,8 \pm 1,4
Ekto-5'-WT	9	25,2 \pm 1,0	45,9 \pm 0,6	4,7 \pm 1,4
t₃				
Ekto-5'-KO	7	23,1 \pm 1,1	40,3 \pm 0,6*	63,3 \pm 7,6*
Ekto-5'-WT	9	25,2 \pm 1,0	39,6 \pm 0,6*	70,0 \pm 7,0
t₈				
Ekto-5'-KO	7	23,1 \pm 1,1	34,7 \pm 0,6*	166 \pm 14*
Ekto-5'-WT	9	25,2 \pm 1,0	34,1 \pm 0,6*	154 \pm 23*
t₂₄				
Ekto-5'-KO	7	23,1 \pm 1,1	29,1 \pm 0,6*	370 \pm 48*
Ekto-5'-WT	9	25,2 \pm 1,0	30,3 \pm 0,6*	358 \pm 44*

Die Menge an Ado-Rezeptoren-mRNA in der Niere war bei KO- und WT-Mäusen nach 24 Stunden Hämorrhagie in etwa gleich groß (keine Signifikanz) (**Abb.27-30, Tab.12**). Im Vergleich zur Normoxie zeigten A1-, A2a- und A3AR keine signifikante Veränderung (**Abb.27,28+30**). Der A2bAR wurde nach 24h Anämie wiederum stärker exprimiert als unter Normoxie (**Abb.29**).

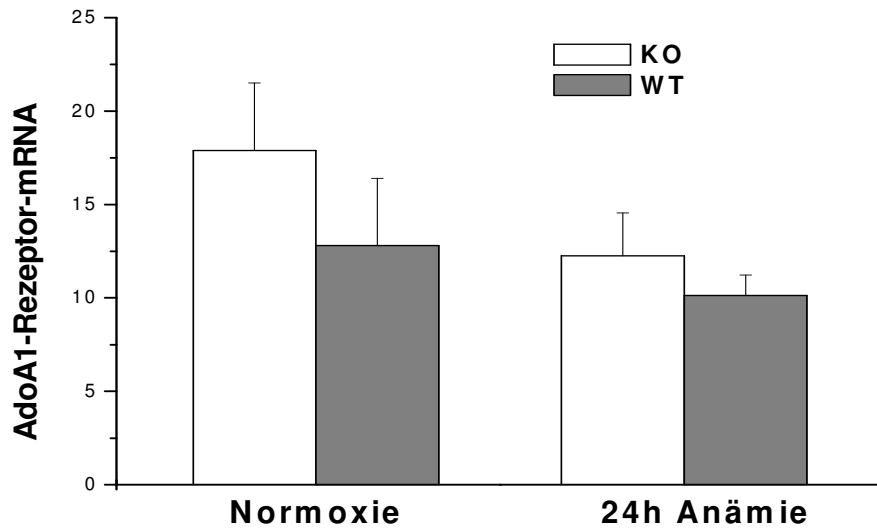


Abb.27: A1AR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie und nach 24h Anämie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. Anämie: n = jeweils 5.

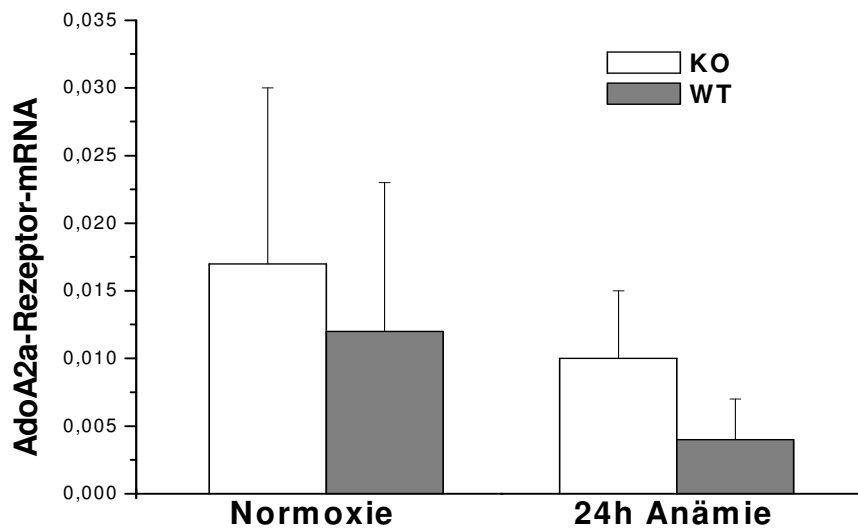


Abb.28: A2aAR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie und nach 24h Anämie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. Anämie: n = jeweils 5.

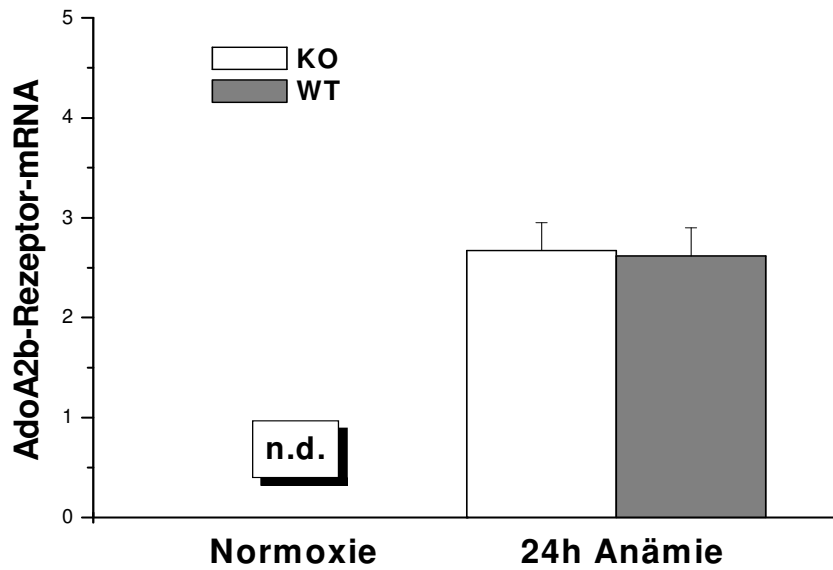


Abb.29: A2bAR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie und nach 24h Anämie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4, Anämie: n = jeweils 5. n.d.= nicht determinierbar wegen zu kleiner Menge.

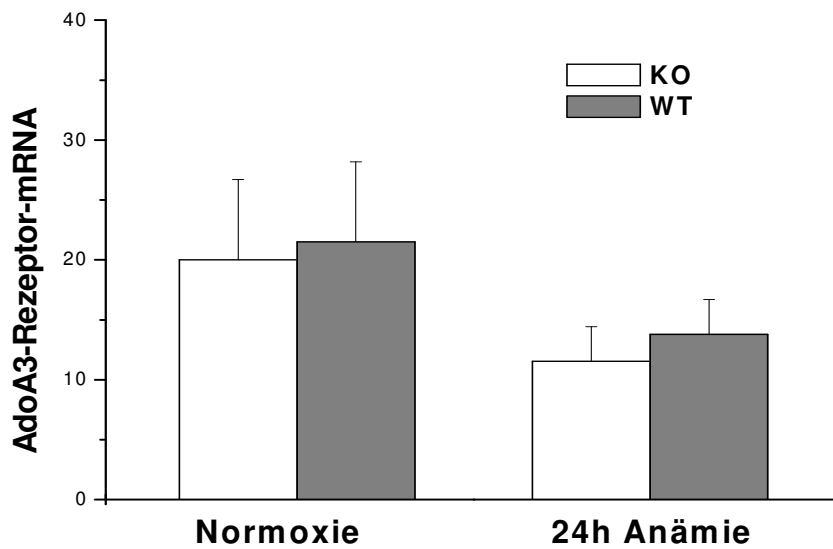


Abb.30: A3AR-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen unter Normoxie und nach 24h Anämie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben. Normoxie: n = 4. Anämie: n = jeweils 5. * p < 0,05 im Vergleich zu 24h Anämie.

Tab.12: Rezeptoren-mRNA [in Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA] bei Ekto5'-KO-/WT-Mäusen nach 24h Anämie. Daten werden als Mean \pm SEM angegeben.

	n	A1-AR mRNA	A2a-AR mRNA	A2b-AR mRNA	A3-AR mRNA
Ekto-5'-KO	4	12,26 \pm 2,3	0,010 \pm 0,005	2,67 \pm 0,28	11,53 \pm 0,90
Ekto-5'-WT	5	10,13 \pm 1,1	0,004 \pm 0,003	2,62 \pm 0,28	13,79 \pm 0,90

IV. DISKUSSION

IV.1 Betrachtung der Methoden

IV.1.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Ekto-5'-NT-KO- und WT-Mäuse ermöglichten die Untersuchung der Beteiligung der Ekto5'-NT an der EPO-Produktion, ohne dass der Einsatz von medikamentösen Inhibitoren wie AOPCP (76, 241) nötig war. Dies bot den Vorteil, dass die Untersuchung selektiver war und mögliche Einflussfaktoren wie Nebenwirkungen oder unterschiedliche Bioverfügbarkeiten ausgeschlossen werden konnten.

Da in verschiedenen Studien an Ratten und Mäusen eine Abnahme der Nierenfunktion und der EPO-Synthese mit zunehmendem Alter beobachtet wurde (52, 145, 245), verwendeten wir nur junge Tiere im Alter von sechs bis sechzehn Wochen. Bei diesen Tieren konnten wir keine Abhängigkeit der EPO-Synthese oder des Hämatokrits vom Alter oder vom Körpergewicht feststellen (Ergebnisse wurden nicht gezeigt). Auch das Geschlecht der Mäuse hatte in unseren Versuchen keinen signifikanten Einfluss auf die EPO-Sekretion oder den Hämatokrit-Wert (Ergebnisse wurden nicht gezeigt). Dennoch wurde stets versucht in beiden Gruppen (KO und WT) die Anzahl an männlichen und weiblichen Tieren sowie das Alter und das Gewicht der Tiere möglichst konstant zu halten und anzugleichen.

IV.1.2 Hypoxieversuche

Die Versuchstiere wurden sowohl einer hypoxischen Hypoxie durch direkte Sauerstoff-Reduktion als auch einer funktionellen Hypoxie durch Kohlenmonoxid-Exposition ausgesetzt. Der Anstieg und der Zeitverlauf der EPO-Serumkonzentration sowie der EPO-mRNA-Expression unter diesen beiden Versuchsbedingungen wurde in verschiedenen Studien beschrieben (49, 123, 124, 231, 232). Die Modelle führten jeweils zu einer gut

quantifizierbaren Steigerung der EPO-Serumkonzentration und/oder der EPO-mRNA in Leber und Nieren.

Da EPO nicht wie andere Hormone gespeichert wird, reagiert das erythropoetische System mit einer gewissen Verzögerung auf eine Hypoxie (103): die hypoxische Stimulation muss für mindestens 15 min. aufrecht erhalten werden, um die de novo Synthese von EPO-mRNA zu induzieren. Die Synthese steigt danach graduell je nach Stimulus an, bis dieser entfällt. Dann vergehen wiederum mindestens 15 min bis ein Abfall der EPO-mRNA nachweisbar wird (231, 232). Dadurch, dass in unserer Arbeit die benötigte Zeit für Präparation der Tiere, Blut- und Organentnahme und Einfrieren der Proben jeweils maximal 10 – 12 min betrug, kann ein signifikanter Abfall der EPO-mRNA nach Entnahme aus dem Hypoxiekäfig ausgeschlossen werden.

Funktionelle Hypoxie

Durch die Bindung von CO an Hämoglobin entsteht COHb mit einer HWZ von 5 – 6 Stunden (154). Diese lange HWZ gewährleistete eine anhaltende, konstante Hypoxie, welche von der Entnahme der Tiere aus dem Hypoxie-Käfig zur Präparation oder auch von eventuellen kleineren Konzentrationsschwankungen innerhalb des Hypoxie-Käfigs nicht beeinflusst wurde. Mit diesem Modell konnte also ein frühzeitiger Abbau von EPO-mRNA ganz sicher ausgeschlossen werden.

Im Rahmen einer anderen Arbeit wurde in unserem Labor anhand von CD1-Mäusen eine Dosis-Wirkungs-Kurve hinsichtlich der CO-Konzentration und der EPO-Synthese erstellt. Hierbei zeigte sich der steilste Anstieg der EPO-Serumkonzentration zwischen 400 und 800 ppm CO über vier Stunden. Vorversuche zur Zeitabhängigkeit zeigten, wie schon frühere Beobachtungen an Ratten unter verschiedenen hypoxischen Stimuli (70, 102, 218), dass die EPO-Produktion zwischen vier und acht Stunden nach Beginn eines hypoxischen Reizes ihr Maximum erreicht. Aufgrund der Beobachtungen in unserem Labor sowie in Anlehnung an oben genannte Studien wurden CO-Konzentrationen von 400 ppm und 750 ppm für die Expositionsluft über einen

Zeitraum von vier Stunden gewählt, um einen weiteren Anstieg oder Abfall der EPO-Produktion zu gewährleisten und erfassbar zu machen.

Hypoxische Hypoxie

Trotz des entscheidenden Vorteils der längeren Dauer einer funktionellen Hypoxie führten wir unsere Versuche zusätzlich unter hypoxischer Hypoxie durch, da auch diese einige Vorteile bietet. Durch seine Fähigkeit an Eisen- und andere Häm-Protein zu binden und deren Funktion zu beeinflussen, könnte CO theoretisch einen direkten Einfluss auf die EPO-Synthese haben und eine eventuelle Wirkung des Adenosins überdecken. Mit dem Modell der hypoxischen Hypoxie konnten solche unvorhersehbaren Wirkungen durch CO ausgeschlossen werden.

Zahlreiche Autoren untersuchten bereits den zeitabhängigen Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen in der Atemluft auf die EPO-Sekretion (49, 231, 232). Nishiyama und Mitarbeiter (174) fanden, dass Hasen, welche mit einem 8%igen Sauerstoffgemisch beatmet wurden, nach kurzer Zeit einen ca. 3fach verringerten arteriellen Sauerstoffpartialdruck und eine 2-3fach erhöhte renale Adenosinkonzentration aufwiesen. In Anlehnung an diese und weitere Arbeiten (182, 235) wählten wir für unsere Arbeit eine Sauerstoffkonzentration von 8% über vier Stunden, da diese Bedingungen als ausreichender Stimulus für eine vermehrte EPO-Produktion gelten konnten, welche jedoch noch steigerungsfähig und somit gut quantifizierbar war.

IV.1.3 Anämieversuche

Eine weitere Möglichkeit, hypoxische Verhältnisse im Organismus zu schaffen, ohne eventuelle Neben- oder Wechselwirkungen von Medikamenten oder Gasen wie CO beachten zu müssen, boten die Anämieversuche, welche einer physiologischen Stimulation der EPO-Produktion am nächsten kamen. Im Hinblick auf die Körpergewichtsbezogenen Blutmengen, die wir über einen Zeitraum von 24 Stunden abnahmen, orientierten wir uns an den Arbeiten von Nagashima und

Karasawa (169) und Eckardt et. al. (51). Das von uns gewählte Blutvolumen (2,25% des KG + 75 µl) lag zur Verstärkung der Adenosinproduktion sowie aus Materialgründen etwas höher als das von Nagashima und Karasawa (2% des KG), welches an Ratten zu einem Anstieg der Ado-Serumkonzentration in der Vena renalis geführt hatte (169). Der deutliche Anstieg der EPO-Serumkonzentrationen mit abfallenden Hkt-Werten in unseren Versuchen deckte sich mit den Ergebnissen der genannten Arbeitsgruppen (51, 169). Die Messung der Hkt-Werte mit jeder Blutentnahme und zum Schluss des Experiments gewährleistete außerdem den Nachweis eines gleich großen hypoxischen Stimulus für beide Gruppen (KO und WT).

IV.1.4. Bewertung der Methoden

Experimentelle Fehler und Messfehler können für die vorgelegte Arbeit mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Alle Tiere wurden unter denselben Bedingungen gehalten und Experimente wurden stets auf dieselbe Art und Weise und jeweils mit KO- und WT-Mäusen von übereinstimmendem Alter und Geschlecht durchgeführt. Bei den verschiedenen Messungen wurden meist Doppelbestimmungen durchgeführt und einzelne Stichproben wurden wiederholt gemessen. Die Menge an mRNA wurde absolut bestimmt und dann in Relation zum Housekeeping-Gen β -Actin angegeben, wodurch eventuelle Qualitätseinbußen einzelner Proben kompensiert werden konnten.

Dass nach unseren Untersuchungen eine Beteiligung von Ado an der Regulation der EPO-Produktion unwahrscheinlich erscheint, könnte darauf zurückgeführt werden, dass die einzelnen Stimuli nicht stark genug waren. Die eingesetzten CO- und Sauerstoffkonzentrationen wurden jedoch schon vielfach angewendet und gelten heute als Standardverfahren zur Induktion einer Hypoxie (76, 77, 105, 182, 208, 213, 235, 258). Auch zu niedrig gewählte Blutvolumina bei den Anämieversuchen können ausgeschlossen werden, da sie bereits höher gewählt wurden (2,25% des KG + 75 µl) als in der Arbeit von Nagashima und Karasawa (169), welche nach einer Blutentnahme von nur 2% des KG von Ratten bereits einen Anstieg der Ado-

Konzentration in der V. renalis nachweisen konnten. Außerdem zeugt der konstante, starke Hkt- Abfall über die 24stündige Anämie hinweg von einem ausreichend hohen Stimulus für die EPO-Produktion und dient gleichzeitig als Kontrolle, dass KO- und WT-Mäuse den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren. Durch die Anämie sowie durch beide Hypoxie-Formen ließen sich die EPO-Sekretion und die EPO-mRNA-Expirmierung dosisabhängig steigern, was ebenfalls darauf hinweist, dass CO- und O₂-Dosen, sowie das Blutvolumen korrekt und nicht zu niedrig gewählt wurden.

Eine weitere Fehlerquelle hätte darin liegen können, dass nur die Ekto5'-NT als Produzent für Adenosin in der Niere ausgeschaltet wurde, und das Nukleosid evtl. über andere Wege hätte produziert werden können. Andere Produktionswege für Adenosin über zytosolische Nukleotidasen, Adenosylhomozystein oder die Alkalische Phosphatase (AP) sind jedoch quantitativ von verschwindend geringer Bedeutung und spielen für die regulatorischen Funktionen von Ado keine Rolle (138, 182, 194, 242). Insbesondere die neuesten Untersuchungen an Ekto5'-NT-KO-Mäusen sprechen dafür, dass die Ekto5'-NT die weitaus wichtigste Rolle in der renalen Ado-Produktion spielt (25, 182, 235). Grenz et. al. (83) und Özüyaman et. al. (182) fanden bei Ekto5'-NT-KO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant niedrigere basale Ado-Spiegel in der Niere sowie deutlich geringere Ado-Konzentrationsanstiege unter ischämischen Bedingungen. Bei Ekto5'-NT-KO-Mäusen konnte trotz fehlender Ekto5'-NT keine erhöhte Aktivität der AP nachgewiesen werden, was gegen eine kompensatorische Hochregulierung dieses Enzyms bei den KO-Mäusen spricht (182).

Inbe et. al. (98) fanden vor kurzem einen neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptor homolog zur P2Y-Familie der Nukleotid-Rezeptoren, welcher sowohl durch Ado als auch durch AMP stimuliert werden kann. Der Rezeptor induziert über ein G_q-Protein eine Ca²⁺-Mobilisierung und über ein G_s-Protein die Generierung von cAMP. Da ein erhöhtes cAMP wahrscheinlich die Transkriptionsrate des EPO-Gens erhöht, könnte dies darauf hinweisen, dass die Hydrosylierung von AMP zu Ado für die EPO-Produktion nicht

zwingend notwendig wäre, zumal der P2Y₁₅-Rezeptor unter anderem in der Niere besonders stark exprimiert wird. Dadurch wäre die Schlüsselrolle der Ekto5'-NT obsolet. Andererseits wirken Theophyllin und andere AR-Antagonisten auch auf den P2Y₁₅-Rezeptor antagonistisch (98) und verschiedene Untersuchungen konnten keinen Unterschied in der EPO-Produktion mit und ohne diese Antagonisten finden (75, 76, 77). Hinzu kommt, dass die Affinität des Rezeptors für Ado und AMP relativ gering ist (98).

IV.2 Regulation der EPO-Produktion

IV.2.1 Betrachtung der Ergebnisse

Ziel unserer Arbeit war es, ohne den Einsatz pharmakologisch wirksamer Substanzen die regulatorische Beteiligung von Adenosin, welches in der Niere vornehmlich über die Ekto5'-NT gebildet wird, an der EPO-Produktion zu untersuchen. Hierzu wurden Ekto5'-NT KO- und WT-Mäuse den unterschiedlichsten, die EPO-Synthese stimulierenden Bedingungen ausgesetzt und anschließend die renale EPO-mRNA sowie die EPO-Serumkonzentration bestimmt. Zusätzlich wurde die Regulation der verschiedenen Ado-Rezeptoren auf genomischer Ebene untersucht.

EPO-mRNA

Funktionelle Hypoxie mit verschiedenen CO-Konzentrationen, hypoxische Hypoxie und Anämie führten jeweils zu einer deutlichen Steigerung der renalen EPO-mRNA. Der durchschnittliche basale Wert unter Normoxie betrug sowohl bei den KO- als auch bei den WT-Mäusen 0,03-0,06 Kopien pro 1000 Kopien β -Actin-mRNA. Dieser wurde unter funktioneller Hypoxie über vier Stunden um das 20fache (400 ppm) bzw. um das 35-54fache (750 ppm) und unter hypoxischer Hypoxie (8% O₂) über vier Stunden um das 21-

23fache gesteigert. 24 Stunden Anämie führten zu einer 22-25fachen Erhöhung der EPO-mRNA. Unter keinem der genannten Stimuli fand sich ein signifikanter Unterschied in der renalen EPO-mRNA zwischen KO- und WT-Mäusen. Somit scheint das über die CD 73 produzierte Ado weder unter normoxischen, noch unter hypoxischen Bedingungen Einfluss auf die Expressierung von EPO-mRNA in der Niere zu haben.

EPO-Serumkonzentration

Parallel zur EPO-mRNA in der Niere war auch die EPO-Serumkonzentration unter allen genannten hypoxischen Bedingungen deutlich erhöht. Ähnlich wie bei anderen Untersuchern (64, 238) lag die durchschnittliche EPO-Serumkonzentration unter Normoxie bei 3,8-6,8 mU/ml. Diese konnte nach vierstündiger CO-Exposition bei 400 ppm um das 25 - 33fache und bei 750 ppm um das 75 - 90fache gesteigert werden. Die Beatmung mit 8% Sauerstoff über vier Stunden führte zu einer Erhöhung der Serum-EPO-Konzentration um den Faktor 22 bis 34. Nach 24h Anämie waren die Werte 76 - 97fach gesteigert. Die EPO-Serumkonzentration unterschied sich zwischen KO- und WT-Mäusen in keinem Fall signifikant voneinander, was ebenfalls gegen eine Beteiligung des Adenosins an der EPO-Sekretion spricht.

Adenosin-Rezeptoren

Insgesamt wurden A1-, A2a-, und A3-Ado-Rezeptor-mRNA nach den hypoxischen Stimuli im Vergleich zu normoxischen Bedingungen etwa gleich stark oder vermindert exprimiert (nie signifikant!). Dies deckt sich mit den Untersuchungen von Eltzhig und seinen Mitarbeitern (54), die an Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen eine gleich bleibende oder abfallende Konzentration von Ado A1-, A2a- und A3-Rezeptoren fanden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Zellen unter Hypoxie ihre Aktivität herunterfahren und nicht benötigte Rezeptoren teilweise abgebaut werden. Der Ado-A2b-Rezeptor wurde als einziger der vier Ado-Rezeptoren unter jedem hypoxischen Stimulus hochreguliert, was wiederum mit den

Erkenntnissen von Eltzschig et. al. (54) übereinstimmt, die unter Hypoxie eine 5fach erhöhte Menge an A2b-AR-mRNA messen konnten als unter normoxischen Bedingungen. Dies ist dadurch erklärbar, dass die selektive Aktivierung des Ado-A2b-Rezeptors unter hypoxischen Bedingungen oder auch im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu einer verbesserten Barrierefunktion der Zellen führt und somit als protektiver Faktor dient (54, 117, 140). Der Ado-A2b-Rezeptor wird bei bestehender Hypoxie vermutlich über HIF - 1 α hochreguliert (117).

Alle vier Adenosin-Rezeptoren wurden unter funktioneller und hypoxischer Hypoxie sowie unter Anämie in KO- und WT-Mäusen gleich stark exprimiert. Bei einer Regulation der EPO-Produktion über Ado und seine Rezeptoren nach dem Modell von Fisher & Brookins (64) hätten der A2a- und der A2b-Rezeptor der WT-Mäuse im Vergleich zu den KO-Mäusen deutlich höher und der A1- und der A3-Rezeptor deutlich niedriger exprimiert werden müssen. Unsere Ergebnisse widersprechen jedoch der Adenosin-Hypothese zum wiederholten Male, da in der Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren unter Hypoxie zwischen KO- und WT-Mäusen keinerlei Unterschied zu erkennen ist.

IV.2.2. Betrachtung der aktuellen Kenntnislage

Unseren Ergebnissen stehen zahlreiche Untersuchungen gegenüber, welche für die Induktion der EPO-Produktion über Adenosin sprechen. Diese zeigen sich jedoch oft widersprüchlich und sollen hier noch einmal näher beleuchtet werden.

Klinische Untersuchungen

In klinischen Untersuchungen zeigten Bakris et. al. und andere Arbeitsgruppen (5, 82, 97), dass der unspezifische Ado-Antagonist Theophyllin die verstärkte EPO-Produktion im Rahmen einer Posttransplantationserythrozytose (PTE) signifikant verringern konnte. Andererseits wurde in diesen Versuchen deutlich, dass der Verlauf einer PTE und die Reaktion auf die Theophyllin-Gabe sich zwischen den Probanden

deutlich unterschieden. Ilan und seine Mitarbeiter (97) beschrieben drei Gruppen von Patienten: In einer Gruppe war die EPO-Konzentration nach der Nierentransplantation erhöht und Hkt, Hb und EPO ließen sich durch zweiwöchige Theophyllin-Gabe senken. In einer anderen Gruppe sprachen die Patienten trotz normaler EPO-Werte auf eine Theophyllin-Behandlung an (Reduktion von Hb und Hkt). Die letzte Gruppe bestand aus Patienten mit normalen EPO-Spiegeln, bei welchen die Theophyllin-Gabe keinen Einfluss auf die Erythrozytose hatte. Insgesamt ließ sich in dieser Studie durch die Theophyllin-Behandlung nur bei 50% aller Patienten eine Besserung erzielen. Dies alles spricht dagegen, dass der erzielte Effekt allein auf einer Hemmung der Adenosin-Wirkung durch Theophyllin beruht. Man sollte beachten, dass Theophyllin neben seiner Eigenschaft als unspezifischer AR-Antagonist auch die Phosphodiesterase unspezifisch hemmen und somit das intrazelluläre cAMP erhöhen kann. Auch dies könnte einen Effekt auf die PTE haben und würde die EPO-Sekretion außen vor lassen. Hinzu kommt, dass der Mechanismus der EPO-Produktion unter PTE weitgehend unbekannt ist und nicht unkritisch auf die EPO-Produktion intakter Nieren übertragen werden darf. Gleiter (74) postulierte nach einer differenzierten Betrachtung, dass die PTE aufgrund ihrer komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge als Modell für die Untersuchung der Regulationsmechanismen der EPO-Produktion generell nicht geeignet ist. Zusammen mit seinen Mitarbeitern untersuchte er den Effekt von Theophyllin an gesunden Erwachsenen unter kontrollierter Hämorrhagie (77) sowie unter Höhenbedingungen (75). Sharma et al (222) untersuchten dieselbe Substanz an gesunden Erwachsenen unter Normoxie. In keinem der Versuche konnte ein signifikanter Unterschied in der EPO-Produktion oder im Hkt zwischen Theophyllin- und Placebo-Gruppen festgestellt werden.

In-vitro-Modelle

Mehrere Arbeitsgruppen versuchten mittels in-vitro-Modellen den Einfluss des Adenosins auf die EPO-Produktion zu beweisen. Experimente an humanen Hepatomzellen (Hep3B) unter hypoxischen Bedingungen zeigten

unter dem selektiven A1AR-Agonist CHA in hohen Konzentrationen eine erhöhte EPO-Produktion (170). Obwohl die Affinität von CHA zu den A2-Rezeptoren auch in hohen Konzentrationen als gering anzusehen ist (31), wurde dies als stimulierende Wirkung am A2a- und A2b-Rezeptor interpretiert. In geringeren Konzentrationen von CHA konnte kein Effekt auf die EPO-Sekretion nachgewiesen werden, was mit der Tatsache erklärt wurde, dass hier eine reine A1AR-Wirkung ohne Auswirkung auf die EPO-Synthese vorliegen sollte. Andererseits berichtet dieselbe Arbeitsgruppe (170) über die inhibitorische Wirkung des selektiven A1AR-Agonisten Zyklopentyladenosin (CPA) auf die EPO-Produktion in hypoxischen HepG2-Zellkulturen (177). Nakashima et. al. (171) fanden eine Erhöhung der EPO-Sekretion durch NECA, einen unselektiven Ado-Agonisten. Obwohl NECA ein unspezifischer AdoR-Agonist ist (18, 39), wurde der EPO-Anstieg als Folge einer A2AR-Aktivierung interpretiert. Der tatsächlich selektive A2AR-Agonist CGS 21680 konnte in hypoxischen HepG2-Zellen keinen EPO-Anstieg provozieren (177), in Hep3B-Zellkulturen hingegen zeigte sich eine Erhöhung von cAMP und EPO (64, 178). Außerdem ließ sich in diesen Zellen die EPO-Produktion mit dem selektiven A2aAR-Antagonist SCH 58261 unterdrücken (64) und mit dem selektiven A2AR-Agonist DPMA steigern (178). Die Ergebnisse dieser Tumorzell-Studien müssen durchaus kritisch betrachtet werden, nicht nur weil sie sich teilweise widersprüchlich präsentieren, sondern auch weil die Übertragbarkeit des in-vitro-Modells auf die physiologische in-vivo EPO-Produktion der Nieren stark in Frage zu stellen ist. Bisher stehen der Wissenschaft noch keine geeigneten gesunden Nierenzellkulturen zur Verfügung. Daher wurden hepatische Tumorzellen verwendet, welche viel weniger repräsentativ für die Erforschung der quantitativ relevanten renalen EPO-Produktion sind. So wurden z.B. unterschiedliche regulatorische Gensequenzen für die Kontrolle der EPO-Produktion in Leber und Niere beschrieben (62, 198). Zudem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die verwendeten Zellen auf der Basis von DNA-Veränderungen autonom proliferieren.

Tierexperimentelle Studien

Neben den klinischen und in-vitro-Studien wurden zahlreiche Tierexperimente zur Klärung der Ado-Hypothese durchgeführt, welche sich jedoch nicht weniger widersprüchlich präsentieren. Das Modell von Fisher und Brookins (64), nach dem die AdoA2a- und A2b-Rezeptoren über Aktivierung der Adenylatzyklase und anschließend der Proteinkinasen A und C sowie der Phospholipase A2 hauptverantwortlich für die EPO-Produktion sein sollen, wurde bereits vorgestellt (s. Einleitung). Die Autoren begründeten ihre Hypothese unter anderem mit folgenden Experimenten: CGS 21680, ein selektiver A2a-AR-Agonist, steigerte die EPO-Sekretion in normoxischen und hypoxischen oder anämischen Mäusen und Ratten (64, 169, 178) und Enprofylline, ein selektiver A2b-Antagonist, verminderte den EPO-Anstieg unter Hypoxie in Mäusen (64). Die Ergebnisse von Fisher & Brookins bezüglich des A2bAR müssen jedoch kritisch betrachtet werden, da die EPO-Serumkonzentration in diesem Experiment nach einer Hypoxie über zwei Stunden größer war als nach vier Stunden, was mit anderen gewonnenen Erkenntnissen zu Dynamik der EPO-Sekretion nicht vereinbar ist (70, 103, 218). Der selektive A1AR-Agonist CHA inhibierte die EPO-Produktion von exhypoxischen polyzythämischen Mäusen (239), was dafür spricht, dass Ado die EPO-Produktion über den A1-Rezeptor und folgende cAMP-Verringerung hemmt. Allerdings wurde die EPO-Konzentration hierbei indirekt über die Inkorporation von ⁵⁹Fe in die Erythrozyten bestimmt und nicht durch eine direkte Serum-Konzentrations-Messung, z. B. mittels EPO-ELISA, wie in dieser Arbeit. Somit ist nur eine Aussage über die Aktivität des Knochenmarks, und nicht über die tatsächliche EPO-Synthese zulässig. Hinzu kommt, dass eine andere Arbeitsgruppe (169) eine Steigerung der EPO-Produktion in normoxischen und anämischen Ratten unter Gabe von CHA sowie unter NECA, einem unselektiven AdoR-Agonisten, beobachtete. CHA führte also in zwei unterschiedlichen Studien zu gegenteiligen Ergebnissen bezüglich der EPO-Produktion. Außerdem wurde auch hier der EPO-Anstieg unter NECA fälschlicherweise als Folge einer A2AR-Aktivierung interpretiert.

Diesen Ergebnissen aus tierexperimentellen Versuchen stehen Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen gegenüber. Gleiter und seine Mitarbeiter (76) untersuchten ebenfalls den Effekt selektiver AR-Agonisten und –Antagonisten auf die EPO-Produktion unter Normoxie und Hypoxie an Ratten. Dabei zeigte sich weder mit den selektiven Antagonisten DPCPX (A1), KW-3902 (A1) oder DMPX (A2) noch mit den selektiven Agonisten CHA (A1) oder CGS 21680 (A2) ein signifikanter Unterschied in der EPO-Sekretion zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Auch der unspezifische AR-Antagonist Theophyllin, der Ekto5'-NT-Hemmer AOPCP, die Ado-Wiederaufnahmehemmer Dipyridamol und Soluflazin sowie der Ado-Desaminase-Inhibitor EHNA zeigten keinen Effekt auf die EPO-Produktion. Experimente an AdoR-KO-Mäusen in unserem Labor (258) konnten noch deutlicher zeigen, dass die Aktivierung von Ado-Rezeptoren über Adenosin wahrscheinlich nicht maßgeblich an der EPO-Produktion beteiligt sind: Bei A1-AR-, A2aAR- und A3AR-KO-Mäusen und ihren jeweiligen Wildtypen fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich der EPO-Serumkonzentration oder der renalen EPO-mRNA unter normoxischen, hypoxischen und anämischen Bedingungen (258). Die Kopplung der einzelnen AR mit den jeweiligen G-Proteinen kann je nach Zell- und Gewebetyp variieren (67). Um eine kompensatorische Veränderung bei den verwendeten KO-Mäusen auszuschließen, wurden diese von der einen Arbeitsgruppe mit unterschiedlichen Antagonisten (MRS-1191, DPCPX, DMPX, Enprophyllin) vorbehandelt (258). So konnte auch eine kompensatorische Stimulation der EPO-Synthese über den A2b-AR ausgeschlossen werden, welcher in diesen Arbeiten aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit an A2b-KO-Mäusen nicht untersucht werden konnte. Es zeigte sich jedoch auch unter keiner dieser Vorbehandlungen ein signifikanter Unterschied in der EPO-Produktion zwischen KO- und WT-Mäusen.

Die vor kurzem publizierte Arbeit von Özüyaman et al (182) untersuchte ebenfalls die EPO-Produktion unter funktioneller und hypoxischer Hypoxie an CD 73 KO- und WT-Mäusen und kam insgesamt zu den gleichen Ergebnissen wie wir: EPO-Serumkonzentrationen und renale EPO-mRNA

unterschieden sich zwischen KO- und WT-Mäusen nicht signifikant voneinander. Die Arbeitsgruppe verwendete allerdings Mäuse mit einem anderen genetischen Hintergrund (NMRI- Abstammung) und unsere Untersuchungen bieten zusätzlich den Vergleich unter anämischen Bedingungen sowie die Bestimmung der verschiedenen Ado-Rezeptoren.

IV.2.3 Abschließende Bewertung

Vor dem Hintergrund einer kritischen Betrachtung bisheriger Forschungsergebnisse, des aktuellen Kenntnisstands sowie der neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse sprechen unsere Untersuchungen dagegen, dass das über die CD73 produzierte Adenosin und seine Rezeptoren die EPO-Produktion in der Niere unter normoxischen, hypoxischen und anämischen Bedingungen regulieren.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ob Adenosin bei der Regulation der EPO-Produktion in der Niere eine bedeutsame Rolle spielt, wird seit langem kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit sollte diese Fragestellung näher beleuchtet werden. Durch den Einsatz von Ekto5'-NT-KO-Mäusen wurde der wichtigste Produktionsweg für Adenosin in der Niere ohne die Verwendung pharmakologischer Substanzen ausgeschaltet. Die KO- Mäuse und ihre entsprechenden Wildtypen wurden zur Anregung der EPO-Produktion einer funktionellen Hypoxie bei 400 ppm und 750ppm CO (4h), einer hypoxischen Hypoxie (8% O₂) (4h), sowie einer 24 Stunden dauernden Anämie ausgesetzt. Anschließend wurden die renale EPO-mRNA, die EPO-Serumkonzentration sowie die mRNA der vier Ado-Rezeptor-Subtypen in der Niere bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Ekto5'-NT-KO- und -WT-Mäuse hatten unter normoxischen Bedingungen identische basale EPO-mRNA/ β -Aktin-mRNA-Quotienten sowie gleich hohe EPO-Serumkonzentrationen.
2. Nach vierstündiger CO-Exposition bei 400 ppm war die EPO-mRNA um das 20fache und bei 750 ppm um das 35 – 54fache im Vergleich zu Normoxie angestiegen, wobei sich die Konzentrationen bei KO- und WT-Mäusen nicht signifikant voneinander unterschieden.
3. Die Serum-EPO-Konzentration erhöhte sich parallel dazu bei 400 ppm CO/4h um das 25-33fache und bei 750 ppm CO/4h um das 75-90fache. Auch hier war kein signifikanter Unterschied zwischen Mutanten und Wildtypen erkennbar.
4. Nach 8%iger Sauerstoffexposition über vier Stunden (hypoxische Hypoxie) waren die EPO-Serumkonzentrationen 22 – 34fach und die EPO-mRNA 21-23fach im Vergleich zur Normoxie erhöht. Die Werte der KO- und WT-Mäuse waren wieder identisch.
5. 24 Stunden Anämie durch Blutentnahmen führten bei KO- und WT-Mäusen ohne signifikanten Unterschied zu einem 76-97fachen

Anstieg der EPO-Serumkonzentrationen und einem 22-25fachen Anstieg der EPO-mRNA im Vergleich zu Normoxie.

6. Die mRNA der vier Adenosin-Rezeptor-Subtypen wurde unter normoxischen Bedingungen sowie nach den verschiedenen Stimuli in KO- und WT-Mäusen gleich stark exprimiert.

Unsere Ergebnisse sprechen somit gegen eine regulatorische Funktion von Adenosin und seinen Rezeptoren bei der EPO-Produktion in der Niere unter normoxischen, hypoxischen und anämischen Bedingungen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Veröffentlichte Artikel:

1. ABBRECHT, P. H., LITTELL, J. K. (1972) Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatization to different altitudes. *J. Appl. Physiol.* **32**: 54-58.
2. AEBERHARD, J. M., SCHNEIDER, P. A., VALLOTTON, M. B., KURTZ, A., LESKI, M. (1990) Multiple site estimates of erythropoietin and renin in polycythemic kidney transplant patients. *Transplantation* **50**: 613-616.
3. ALIPPI, R. M., BARCELO, A. C., KOFOED, J. A., BOZZINI, C. E. (1986) Hypoxia-induced renal and extrarenal erythropoietin production in posthypoxic or hypertransfused polycythemic rats. *Exp. Hematol.* **14**: 329-332.
4. BACHMANN, S., LE HIR, M., ECKARDT, K. U. (1993) Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J. Histochem. Cytochem.* **41**(3): 335-341.
5. BAKRIS, G. L., SAUTER, E. R., HUSSEY, J. L., FISHER, J. W., GABER, A. O., WINSETT, R. (1990) Effects of theophylline on erythropoietin production in normal subjects and in patients with erythrocytosis after renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **323**: 86-90.
6. BAUER, C., KURTZ, A., ECKARDT, K. U., TANNAHILL, L. (1989) Regulation of erythropoietin synthesis. *Nephron* **51**: 3-10.
7. BAZAN, J. F. (1989) 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 b chain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **164**: 788-796.
8. BAZAN, J. F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**: 6934-6938.
9. BEGUIN, Y., LIPSCEI, G., ORIS, R., THOUMSIN, H., FILLET, G. (1990) Serum immunoreactive erythropoietin during pregnancy and in the early postpartum. *Br. J. Haematol.* **76**: 545-549.
10. BERNE, R. M., KNAB, R. M., ELY, S. W., RUBIO, R. (1983) Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. *Fed. Proc.* **42**: 136-142.

11. BIRGEGARD, G., GUDBJONSSON, B., HALLGREN, R., WIDW, L. (1991) Anaemia of chronic inflammatory arthritides. Treatment with human recombinant erythropoietin. *Contrib. Nephrol.* **88**: 295-303.
12. BITTORF, T., BUCHSE, T., SASSE, T., JASTER, R., BROCK, J. (2001) Activation of the transcription factor NF-kappaB by the erythropoietin receptor: structural requirements and biological significance. *Cell. Signal.* **13**: 673-681.
13. BONANOU-TZEDAKI, S. A., SOHI, M. K., ARNSTEIN, H. R. V. (1987) The role of cAMP and calcium in the stimulation of proliferation of immature erythroblasts by erythropoietin. *Exp. Cell. Res.* **170**: 267-289.
14. BONDURANT, M. C., KOURY, M. J. (1986) Anaemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol. Cell Biol.* **6**: 2731-2733.
15. BOUSCARY, D., PENE, F., CLAESSENS, Y. E., MULLER, O., CHRETIEN, S., FONTENAY-ROUPIE, M., GISSELBRECHT, S., MAYEUX, P., LACOMBE, C. (2003) Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* **101**: 3436-3443.
16. BRINES, M. L., GHEZZI, P., KEENAN, S., AGNELLO, D., DE LANEROLLE, N. C., CERAMI, C., ITRI, L. M., CERAMI, A. (2000) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**: 10526-10531.
17. BROUDY, V. C., LIN, N., BRICE, M., NAKAMOTO, B., PAPAYANNOPOULOU, T. (1991) Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* **77**: 2583-2590.
18. BRUNS, R., LU, G. H., PUGSLEY, T. A. (1986) Characterization of the A2 adenosine receptor labelled by [3H] NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* **29**: 331-346.
19. BUDARF, M., HUEBNER, K., EMANUEL, B., CROCE, C. M., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., D'ANDREA, A. D. (1990) Assignment of the erythropoietin receptor (EPOR) gene to mouse chromosome 9 and human chromosome 19. *Genomics* **8**: 575-578.
20. BUSTIN, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. mol. endocrinol.* **25**: 169-193.

21. CAHAN, C., DECKER, M., RABINOWITZ, G., WASHINGTON, L., ARNOLD, J., STROHL, K. M. (1989) Hormonal and biochemical markers associated with sleep apnea. *Am. Rev. Dis.* **139**: A81.
22. CAHAN, C., HOEKJE, P. L., GOLDWASSER, E., DECKER, M. J., STROHL, K. P. (1990) Assessing the characteristic between length of hypoxic exposure and serum erythropoietin levels. *Am. J. Physiol.* **258**: 1016-1021.
23. CARROL, M. P., SPIVAK, J. L., MCMAHON, M., WEICH, N., RAPP, U. R., MAY, W. S. (1991) Erythropoietin induces Raf-1 activation and Raf-1 is required for erythropoietin-mediated proliferation. *J. Biol. Chem.* **266**: 14964-14969.
24. CASALE, R., PASQUALETTI, P. (1997) Diurnal rhythm of serum erythropoietin circulating levels in chronic obstructive pulmonary disease. *Panminerva Med.* **39**: 183-185.
25. CASTROP, H., HUANG, Y., HASHIMOTO, S., MIZEL, D., HANSEN, P., THEILIG, F., BACHMANN, S., DENG, C., BRIGGS, J., SCHNERMANN, J. (2004) Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **114**: 634-642.
26. CELIK, M., GOKMEN, N., ERBAYRAKTAR, S., AKHISAROGLU, M., KONAKC, S., ULUKUS, C., GENÇ, S., GENÇ, K., SAGIROGLU, E., CERAMI, A., BRINES, M. (2002) Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**: 2258-2263.
27. CHAPEL, S., VENG-PEDERSEN, P., HOHL, R. J., SCHMIDT, R. L., MCGUIRE, E. M., WIDNESS, J. A. (2001) Changes in erythropoietin pharmacokinetics following busulfan-induced bone marrow ablation in sheep: evidence for bone marrow as a major erythropoietin elimination pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**: 820-824.
28. CHEN, Y. F., LI, P. L., ZOU, A. P. (2001) Oxidative stress enhances the production and actions of adenosine in the kidney. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **281**: 1808-1816.
29. CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
30. CLEMONS, G. K., FITZSIMMONS, S. L., DEMANINCOR, D. (1986) Immunoreactive erythropoietin concentrations in fetal and neonatal rats and the effects of hypoxia. *Blood* **68**: 892-899.

31. COLLIS, M. G., HOURANI, M. O. (1993) Adenosine receptor subtypes. *J. Pharm. Sci.* **14**: 360-366.
32. COLOMBI, M., LE HIR, M. (1992) Control of the expression of ecto- 5'-nucleotidase in renal fibroblasts in cell culture. *J. Cell. Biochem. Physiol.* **2**: 359-366.
33. CONSTANTINESCU, J. N., KEREN, T., SOCOLOVSKY, M., NAM, H., HENIS, Y. I., LODISH, H. F. (2001) Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 4379-4384.
34. COTES, P.M. (1982) Immunoreactive erythropoietin in serum. *Brit. J. Haematol.* **50**: 427-438.
35. COTES, P. M. (1989) Physiological studies of erythropoietin in plasma. In: *Erythropoietin*, published by Springer Verlag (Berlin), 57-79.
36. COTES, P. M., BROZOVIC, B. (1982) Diurnal variation of serum immunoreactive erythropoietin in a normal subject. *Clin. Endocrinol.* **17**: 419-422.
37. COTES, P. M., CANNING, C. E., LIND, T. (1983) Changes in serum immunoreactive erythropoietin during the menstrual cycle and normal pregnancy. *Br. J. Obstet Gynaecol.* **90**: 304-311.
38. DALLE, B., HENRI, A., ROUYER-FESSARD, P., BETTAN, M., SCHERMAN, D., BEUZARD, Y., PAYEN, E. (2001) Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity in vitro and in vivo. *Blood* **97**: 3776-3782.
39. DALZIEL, H. H., WESTFALL, D. P. (1994) Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution and molecular characterization. *Pharmacol. Rev.* **46**: 450-466.
40. DAME, C., FAHNENSTICH, H., FREITAG, P., HOFMANN, D., ABDULNOUR, T., BARTMANN, P., FANDREY, J. (1998) Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood.* **92**: 3218-3225.
41. D'ANDREA, A. D., ZON, L. I. (1990) Erythropoietin receptor: subunit structure and activation. *J. Clin. Invest.* **86**: 681-687.
42. DA SILVA, J. L., LACOMBE, C., BRUNEVAL, P., CASADEVALL, N., LEPORRIER, M., CAMILLERI, J.P, BARIETY, J., TAMBOURIN, P., VARET, B. (1990) Tumor cells are the site of erythropoietin synthesis in human renal cancers associated with polycythemia. *Blood* **75**: 577-582.

43. DAWSON, T. P., GANDHI, R., LE HIR, M., KAISLING, B. (1989) Ecto-5'-nucleotidase: localization by light microscopic histochemistry and immunohistochemistry methods in the rat kidney. *J. Histochem. Cytochem.* **37**: 39-47.
44. DAY, Y.-L., HUANG, L., YE, H., LINDEN, J., OKUSA, M. D. (2005) Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **288**: 722-731.
45. DE KLERK, G., ROSENGARTEN, P. C. J., VET, R. J. W. M., GOUDSMIT, R. (1981) Serum erythropoietin titers (ESF) in anaemia. *Blood.* **58**: 1164-1170.
46. DE PAOLO VITALI, E., GUGLIELMINI, C., CASONI, I., VEDOVATO, M., GILLI, P., FARINELLI, A., SALVATORELLI, G., CONCONI, F. (1988) Serum erythropoietin in cross country skiers. *Int. J. Sports. Med.* **9**: 99-101.
47. DIXON, A. K., GUBITZ, A. K., SIRINATHSINGHJI, D. J., RICHARDSON, P. J., FREEMAN, T. C. (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 1461-1468.
48. ECKARDT, K. U., BOUTELLIER, U., KURTZ, A., SCHOPEN, M., KOLLER, E. A., BAUER, C. (1989) Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J. Appl. Physiol.* **66**: 1785-1788.
49. ECKARDT, K. U., KOURY, S. T., TAN, C.C., SCHUSTER, S. J., KAISLING, B., RATCLIFFE, P. J., KURTZ, A. (1993) Distribution of erythropoietin producing cells in rat kidneys during hypoxic hypoxia. *Kidney Int.* **43**: 815-823.
50. ECKARDT, K. U., KURTZ, A., BAUER, C. (1989) Regulation of erythropoietin production is related to proximal tubular function. *Am. J. Physiol.* **256**: 942-947.
51. ECKARDT, K. U., LEHIR, M., TAN, C. C., RATCLIFFE, P. J., KAISLING, B., KURTZ, A. (1992) Renal innervation plays no role in oxygen-dependent control of erythropoietin mRNA levels. *Am. J. Physiol.* **263**: 925-930.
52. ECKARDT, K. U., RATCLIFFE, P. J., TAN, C. C., BAUER, C., KURTZ, A. (1992) Age-dependent expression of the erythropoietin gene in rat liver and kidneys. *J. Clin. Invest.* **89**: 753-760.

53. EDITORIAL. (1989) Polycythaemia due to hypoxaemia: advantage or disadvantage? *Lancet*. **2**: 20-22.
54. ELTZSCHIG, H. K., IBLA, J. C., FURUTA, G. T., LEONARD, M. O., JACOBSON, K. A., ENJYOJI, K., ROBSON, S. C., COLGAN, S. P. (2003) Coordinated Adenine Nucleotide Phosphohydrolysis and Nucleoside Signaling in Posthypoxic Endothelium: Role of Ectonucleotidases and Adenosine A_{2B} Receptors. *J. Exp. Med.* **198**(5): 783-796.
55. EPSTEIN, A. C., GLEADLE, J. M., MCNEILL, L. A., HEWITSON, K. S., O'ROURKE J., MOLE, D. R., MUKHERJI, M., METZEN, E., WILSON, M. I., DHANDA, A., TIAN, Y. M., MASSON, N., HAMILTON, D. L., JAAKKOLA, P., BARSTEAD, R., HODGKIN, J., MAXWELL, P. H., PUGH, C. W., SCHOFIELD C. J., RATCLIFFE, P. J. C. (2001) Elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**: 43-54.
56. ERSLEV, A. J., CARO, J. (1984) Secondary polycythemia: a boon or a burden? *Blood Cells* **10**:177-191.
57. ERSLEV, A. J., CARO, J., KANSU, E., SILVER, R. (1980) Renal and extrarenal erythropoietin production in anaemic rats. *Br. J. Haematol.* **45**: 65-72.
58. ERSLEV, A. J., WILSON, J., CARO, J. (1987) Erythropoietin titers in anaemic, nonuremic patients. *J. Lab. Clin. Med.* **109**: 429-433.
59. FANDREY, J. (2004) Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**: 977-988.
60. FEDELE, A. O., WHITELOW, M. L., PEET, D. J. (2002) Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Mol. Interv.* **2**: 229-243.
61. FISHER, J. W. (1992) Regulation of erythropoietin production. In *Handbook of Renal Physiology (Vol II)*. WINDHAGER EE, New York, Oxford University Press II: 2407-2438.
62. FISHER, J. W. (1997) Erythropoietin: physiologic and pharmacologic aspects. *Exp. Biol. Med.* **216**: 358-369.
63. FISHER, J. W. (2003) Erythropoietin: Physiology and Pharmacology Update. *Exp. Biol. Med.* **228**: 1-14.

64. FISHER, J. W., BROOKINS, J. (2001) Adenosine A2a and A2b receptor activation of erythropoietin production. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **281**: 826-832.
65. FISHER, J. W., KOURY, S., DUCEY, T., MENDEL, S. (1996) Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *Br. J. Haematol.* **95**: 27-32.
66. FISHER, J. W., ROH, B. L., MALGOR, L. A., NOVECI, R. J. (1971) Effects of vasoactive agents on erythropoietin production. *Israel. J. Med. Sci.* **7**: 977-985.
67. FREDHOLM, B. B., IJZERMAN, A. P., JACOBSON, K. A., KLOTZ, K. N., LINDEN, J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**: 527-552.
68. FREUDENTHALER, S. M., BENOHR, P., GRENZ, A., SELZER, T., SCHMIDT, T., MORIKE, K., OSSWALD, H., GLEITER, C. H. (2003) Do alterations of endogenous angiotensin II levels regulate erythropoietin production in humans? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **56**: 378-387.
69. FREUDENTHALER, S. M., LUCHT, I., SCHENK, T., BRINK, M., GLEITER, C. H. (2000) Dose-dependent effect of angiotensin II on human erythropoietin production. *Pflugers Arch.* **439**: 838-844.
70. FRIED, W., BARONE-VARELAS, J., BERMAN, M. (1981) Detection of high erythropoietin titers in renal extracts of hypoxic rats. *J. Lab. Clin. Med.* **97**: 82-86.
71. FUKUDA, M. N., SASAKI, H., LOPEZ, L., FUKUDA, M. (1989) Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates. *Blood.* **73**: 84-89.
72. GARCIA, J. F., EBBE, S.N., HOLLANDER, L., CUTTING, H. O., MILLER, M. E., CRONKITE, E. P. (1982) Radioimmunoassay of erythropoietin: circulating levels in normal and polycythemic human beings. *J. Lab. Clin. Med.* **99**: 624-635.
73. GARNICK, M. B., ABELS, R., RUDNICK, S. A. (1991) The role of recombinant human erythropoietin in the management of anemia associated with acquired immune deficiency syndrome. *Contrib. Nephrol.* **88**: 282-292.
74. GLEITER, C. H. (1996) Posttransplant erythrocytosis: A model for the investigation of the pharmacological control of renal erythropoietin production? *Int. J. Clin. Pharmacol.* **11**: 489-492.

75. GLEITER, C. H., BECKER, T., WENZEL, J. (1997) Erythropoietin production in healthy volunteers subjected to controlled hypobaric hypoxia: further evidence against a role for adenosine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **44**: 203-205.
76. GLEITER, C. H., BRAUSE, M., DELABAR, U., ZEBSKI, H., ECKARDT, K. U. (1997) Evidence against a major role of adenosine in oxygen-dependent regulation of erythropoietin in rats. *Kidney Int.* **52**: 338-344.
77. GLEITER, C. H., FREUDENTHALER, S., DELABAR, U., ECKARDT, K. U., MUHLBAUER, B., GUNDERT-REMY, U., OSSWALD, H. (1996) Erythropoietin production in healthy volunteers subjected to controlled haemorrhage: evidence against a major role for adenosine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **42**: 729-735.
78. GOBERT, S., DUPREZ, V., LACOMBE, C., GISSELBRECHT, S., MAYEUX, P. (1995) Erythropoietin activates three forms of MAP Kinase in UT7 erythroleukemia cells. *Eur. J. Biochem.* **234**: 75-83.
79. GOLDBERG, M. A., DUNNING, P., AND BUNN, H. F. (1988) Regulation of the erythropoietin gene: Evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* **242**: 1412-1415.
80. GOODNOUGH, L., RUDNICK, S., PRICE, T., BALLAS, S., COLLINS, M., CROWLEY, J., KOSMIN, M., KRUSKALL, M., LENES, B., MENITOVE, J., SILBERSTEIN, L., SMITH, K., WALLAS, C., ABELS, R., VON TRESS, M. (1989) Increased preoperative collection of autologous blood with recombinant human erythropoietin therapy. *N. Engl. J. Med.* **321**: 1163-1168.
81. GREGORY, C. J., EAVES, A. C. (1978) Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood.* **51**: 527-537.
82. GREKAS, D., DIOUDIS, C., VALKOUMA, D., PAPOULIDOU, F., TOURKANTONIS, A. (1995) Theophylline modulates erythrocytosis after renal transplantation. *Nephron* **70**: 25-27.
83. GRENZ, A., ZHANG, H., ECKLE, T., MITTELBRONN, M., WEHRMANN, M., KÖHLE, C., KLOOR, D., THOMPSON, L., OSSWALD, H., ELTZSCHIG, H. K. (2007) Protective Role of Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) in Renal Ischemia. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**(3): 833-845.

84. GROSS, M., GOLDWASSER, E. (1971) On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. IX. Induced synthesis of 9s ribonucleic acid and of haemoglobin. *J. Biol. Chem.* **246**: 2480-2486.
85. GROSSMANN, J., BURKHARDT, R., HARDER, S., LENZ, T., SEDLMEYER, A., KLINKHARDT, U., GEIGER, H., SCHEUERMANN, E. H. (2001) Angiotensin II infusion increases plasma erythropoietin levels via an angiotensin II type 1 receptor-dependent pathway. *Kidney Int.* **60**: 83-86.
86. GRUBER, D. F., ZUCALI, J. R., WLEKLINSKI, J., LARUSSA, V., MIRAND, E. A. (1977) Temporal transition in the site of rat erythropoietin production. *Exp. Hematol.* **5**: 399-407.
87. HADDY, F. J., SCOTT, J. B. (1968) Metabolically linked vasoactive chemicals in local regulation of blood flow. *Physiol. Rev.* **48**: 688-707.
88. HAGIWARA, M., PINCUS, S. M., CHEN, I.-L., BECKMAN, B. S., FISHER, J. W. (1985) Effects of dibutyl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on erythropoietin production in human renal carcinoma cell cultures. *Blood* **66**: 714-717.
89. HALVORSEN, S., ROH, B. L., FISHER, J. W. (1968) Erythropoietin production in nephrectomized and hypophysectomized animals. *Am. J. Physiol.* **215**: 349-352.
90. HANSEN, P. B., SCHNERMANN, J. (2003) Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **285**: 590-599.
91. HEADRICK, J. P., MATHERNE, G. P., BERR, S. S., HAN, D. C., BERNE, R. M. (1991) Metabolic correlates of adenosine formation in stimulated guinea pig heart. *Am. J. Physiol.* **260**: 165-172.
92. HENRY, D. H., ABELS, R. I. (1994) Recombinant human erythropoietin in the treatment of cancer and chemotherapy induced anemia: results of double-blind and open label follow-up studies. *Semin. Oncol.* **21**: 21-18.
93. HESTIN, D., GREGOIRE, M. J., MAYEUX, D., MERTES, P. M., LAKOMSKY, D., KESSLER, M. (1998) In-vitro growth patterns of bone marrow erythroid progenitors from patients with post-renal transplant erythrocytosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **13**: 1776-1781.
94. HORTNER, M., NIELSCH, U., MAYR, L. M., HEINRICH, P. C., HAAN, S. (2002) A new high affinity binding site for suppressor of cytokine signaling-3 on the erythropoietin receptor. *Eur. J. Biochem.* **269**: 2516-2526.

95. HUANG, L. E., GU, J., SCHAU, M., BUNN, H. F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**: 7987-7992.
96. HUNSUCKER, S. A., SPYCHALA, J., MITCHELL, B. S. (2001) Human cytosolic 5'-ectonucleotidase I: characterization and role in nucleoside analog resistance. *J. Biol. Chem.* **276**(13): 10498-10504.
97. ILAN, Y., DRANITZKI-ELHALLEI, M., RUBINGER, D., SILVER, J., POPOVITZER, M. M. (1994) Erythrocytosis after renal transplantation. *Transplantation* **57**: 661-664.
98. INBE, H., WATANABE, S., MIYAWAKI, M., TANABE, E., ENCINAS, J. A. (2004) Identification and characterisation of a cell-surface receptor, P2Y₁₅, for AMP and adenosine. *J. Biol. Chem.* **279**: 19790-19799.
99. ITOH, R. (1981) Purification and some properties of cytosol 5'-nucleotidase from rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* **657**: 402-410.
100. JACOBS, K., SHOEMAKER, C., RUDERSDORF, R., NEILL, S. D., KAUFMAN, R. J., MUFSON, A., SEEHRA, J., JONES, S. S., HEWICK, R., FRITSCH, E. F., KAWAKITA, M., SHIMIZU, T., MIYOKE, T. (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* **313**: 806-810.
101. JACOBSON, L. O., GOLDWASSER, E., FRIED, W., PLZAK, L. (1957) Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*. **1957**: 633-634.
102. JELKMANN, W. (1992) Erythropoietin: Structure, Control of Production, and Function. *Physiol. Rev.* **72**: 449-489.
103. JELKMANN, W. (1994) Biology of erythropoietin. *Clin. Investig.* **72**: 3-10.
104. JELKMANN, W., METZEN, E. (1996) Erythropoietin in the control of red cell production. *Anat. Anz.* **178**: 391-403.
105. JELKMANN, W., SEIDL, J. (1987) Dependence of erythropoietin production on blood oxygen affinity and haemoglobin concentration in rats. *Biomed. Biochem. Acta* **46**: 304-308.
106. JELKMANN, W., WIDEMANN, G. (1989) Lack of sex dependence of the serum level of immunoreactive erythropoietin in chronic anaemia. *Klin. Wochenschr.* **67**: 1218.

107. JELKMANN, W., WIDEMANN, G. (1990) Serum erythropoietin level: Relationship of blood haemoglobin concentration and erythrocytic activity of the bone marrow. *Klin. Wochenschr.* **68**: 403-407.
108. JUUL, S. E., ZHAO, Y., DAME, J. B., DU, Y., HUTSON, A. D., CHRISTENSEN, R. D. (2000) Origin and fate of erythropoietin in human milk. *Pediatr. Res.* **48**: 660-667.
109. KAISLING, B., SPIESS, S., RINNE, B., LE HIR, M. (1993) Effects of anaemia on morphology of rat renal cortex. *Am. J. Physiol.* **264**: 608-617.
110. KENDALL, R. G. (2001) Erythropoietin. *Clin. Lab. Haem.* **23**: 71-80.
111. KEW, M. C., FISHER, J. W. (1986) Serum erythropoietin concentrations in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* **58**: 2485-2488.
112. KLINGMULLER, U., BERGELSON, S., HSIAO, J. G., LODISH, H. F. (1996) Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**: 8324-8328.
113. KLINGMULLER, U., LORENZ, U., CANTLEY, L. C., NEEL, B. G., LODISH, H. F. (1995) Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **80**: 729-738.
114. KLINGMULLER, U., WU, H., HSIAO, J. G., TOKER, A., DUCKWORTH, B. C., CANTLEY, L. C., LODISH, H. F. (1997) Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**: 3016-3021.
115. KNAUPP, W., KHILNANI, S., SHERWOOD, J., SCHARF, S., STEINBERG, H. (1992) Erythropoietin response to acute normobaric hypoxia in humans. *J. Appl. Physiol.* **73**(3), 837-840.
116. KOEFFLER, H. P., GOLDWASSER, E. (1981) Erythropoietin radioimmunoassay in evaluating patients with polycythemia. *Ann. Int. Med.* **94**: 44-47.
117. KONG, T., WESTERMAN, K. A., FAIGLE, M., ELTZSCHIG, H. K., COLGAN, S. P. (2006) HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB J.* **20**: 2242-2250.
118. KOURY, M. J., BONDURANT, M. C. (1990) Control of red cell production: the roles of programmed cell death apoptosis and erythropoietin. *Transfusion* **30**: 673-674.

119. KOURY, S. T., BONDURANT, M. C., KOURY, M. J. (1988) Localisation of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood*. **71**: 524-537.
120. KOURY, S. T., BONDURANT, M. C., KOURY, M. J., SEMENZA, G. L. (1991) Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in-situ hybridization. *Blood*. **77**: 2497-2503.
121. KOURY, S. T., KOURY, M. J., BONDURANT, M. C., CARO, J., GRABER, S. E. (1989) Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* **74**: 645-651.
122. KUBATZKY, K. K., RUAN, W., GUREZKA, R., COHEN, J., KETTELR, R., WATOWICH, NEUMANN, D., LANGOSCH, D., KLINGMULLER, U. (2001) Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr. Biol.* **11**: 110-115.
123. KURTZ, A., ECKARDT, K. U. (1989) Bestimmungsmethoden für Erythropoietin. *Nephron* **51**: 11-14.
124. KURTZ, A., ECKARDT, K. U., TANNAHILL, L., BAUER, C. (1988) Regulation of erythropoietin production. *Contrib. Nephrol.* **66**: 1-16.
125. KURTZ, A., JELKMANN, W., PFUHL, A., MALMSTRÖM, K., BAUER, C. (1986) Erythropoietin production by fetal mouse liver cells in response to hypoxia and adenylate cyclase stimulation. *Endocrinology* **118**: 567-572.
126. LACOMBE, C., DASILVA, J. L., BRUNEVAL, P., FOURNIER, J.G., WENDLING, F., CASADEVALL, N., CAMILLERI, J. P., BARIETY, J., VARET, B., TAMBOURIN, P. (1988) Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J. Clin. Invest.* **81**: 620-623.
127. LAI, P., EVERETT, R., WANG, F., ARAKAWA, T., GOLDWASSER, E. (1986) Structural characterization of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **261**: 3116-3121.
128. LAW, M. L., CAI, G., LIN, F., WEI, Q., HUANG, S., HARTZ, J. H., MORSE, H., LIN, C., JONES, C., KAO, F. (1986) Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. *Proc. Nat. Ac. Sc. USA.* **83**: 6920-6924.

129. LEDENT, C., VAUGEOIS, J. M., SCHIFFMANN, S. N., PEDRAZZINI, T., EL YACOUBI, M., VANDERHAEGHEN, J. J., COSTENTIN, J., HEATH, J. K., VASSART, G., PARMENTIER, M. (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2a} receptor. *Nature* **388**: 674-678.
130. LEE, H. T., EMALA, C. W. (2002) Characterization of adenosine receptors in human kidney proximal tubule (HK-2) cells. *Exp. Nephrol.* **10**: 383-392.
131. LEE, H. T., EMALA, C. W. (2000) Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pre-treatment: role of A₁ and A₃ receptors. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278**: 380-387.
132. LEE, H. T., OTA-SETLIK, A., XU, H., D'AGATI, V. D., JACOBSON, M. A., EMALA C. W. (2002) A₃ adenosine receptor knockout mice are protected against ischemia- and myoglobinuria-induced renal failure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **284**: 267-273.
133. LEE, H. T. , XU, H., NASR, S. H., SCHNERMANN, J., EMALA, C. W. (2004) A₁ adenosine receptor knock-out mice exhibit increased renal injury following ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **286**: 298-306.
134. LE HIR, M., ECKARDT, K. U., KAISSLING, B. (1989) Anaemia induces 5'-nucleotidase in fibroblasts of cortical labyrinth of rat kidney. *Ren. Physiol. Biochem.* **12**(5-6): 313-319.
135. LE HIR, M., ECKARDT, K. U., KAISSLING, B., KOURY, S. T., KURTZ, A. (1991) Structure-function correlations in erythropoietin formation and oxygen sensing in the kidney. *Klin. Wochenschr.* **69**(13): 567-575.
136. LE HIR, M., GANDHI, R., DUBACH, U. C. (1989) Purification and properties of a 5'-nucleotidase from rat renal membranes. *Enzyme* **41**: 87-93.
137. LE HIR, M. KAISSLING, B. (1989) Distribution of 5'-nucleotidase in the renal interstitium of the rat. *Cell. Tissue Res.* **258**: 177-182.
138. LE HIR, M., KAISSLING, B. (1993) Distribution and regulation of renal ecto-5'-nucleotidase: implications for physiological functions of adenosine. *Am. J. Physiol.* **264**: 377-387.
139. LENFANT, G., SULLIVAN, K. (1971) Adaptation to high altitude. *N. Engl. J. Med.* **284**: 1298-1309.
140. LENNON, P. F., TAYLOR, C. T., STAHL, G. L., COLGAN, S. P. (1998) Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial

- barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J. Exp. Med.* **188**: 1433-1443.
141. LI, K., MILLER, C., HEGDE, S., WOJCHOWSKI, D. (2003) Roles for an Epo receptor Tyr-343 Stat5 pathway in proliferative co-signalling with kit. *J. Biol. Chem.* **278**: 40702-40709.
142. LIN, F. K., SUGGS, S., LIN, C. H., BROWNE, J. K., SMALLING, R., EGRIE, J. C., CHEN, K. K., FOX, G. M., MARTIN, F., STABINSKY, Z., BADRAWI, S. M., LAI, P., GOLDWASSER, E. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7580-7584.
143. LIVUAH, O., STURA, E. A., MIDDLETON, S. A., JOHNSON, D. C., JOKIFFE, C. K., WILSON, T. A. (1999) Crystallographic evidence for performed divers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* **283**: 987-990.
144. LUDWIG, H., FRITZ, E., KOTZMANN, H., HOCKER, P., GISSLINGER, H., BARNAS, U. (1990) Erythropoietin treatment of anaemia associated with multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **322**: 1693-1699.
145. LUIPPOLD, G., PECH, B., SCHNEIDER, S., OSSWALD, H., MUHLBAUER, B. (2002) Age dependency of renal function in CD-1 mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **282**: 886-890.
146. MACDOUGALL, I. C. (1998) Novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) for the treatment of renal anemia. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**: 258A-259A.
147. MACDOUGALL, I. C., GRAY, S. J., ELSTON, O., BREEN, C., JENKINS, B., BROWNE, J., EGRIE, J. (1999) Pharmacokinetics of novel erythropoiesis protein compared with epoetin- α in dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**: 2392-2395.
148. MALGOR, L. A., FISHER, J. W. (1970) Effects of testosterone on erythropoietin production in isolated perfused kidneys. *Am. J. Physiol.* **218**: 1732-1736.
149. MARSDEN, J. T., SHERWOOD, R. A., PETERS, T. J. (1999) Evaluation of six erythropoietin kits. *Ann. Clin. Biochem.* **36**: 380-387.
150. MARTI, H. H., BERNAUDIN, M., PETIT, E., BAUER, C. (2000) Neuroprotection and Angiogenesis: Dual Role of Erythropoietin in Brain Ischemia. *News Physiol. Sci.* **15**: 225-229.

151. MASSON, N., RATCLIFFE, P. J. (2003) HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J. Cell Sci.* **116**: 3041-3049.
152. MATSUMOTO, A., MASUHARA, M., MITSUI, K., YOKOUCHI, M., OHTSUBO, M., MISAWA, H., MIYAJIMA, A., YOSHIMURA, A. (1997) CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* **89**: 3148-3154.
153. MCFADZEAN, A. J., TODD, D., TSO, S. C. (1967) Erythrocytosis associated with hepatocellular carcinoma. *Blood* **29**: 808-811.
154. MIDDLETON, E. T., MORICE, A. H. (2000) Breath carbon monoxide as an indication of smoking habit. *Chest* **117**: 758-763.
155. MIKI, T., MIURA, T., BÜNGER, R., SUZUKI, K., SAKAMOTO, J., SHIMAMOTO, K. (1998) Ecto-5'-nucleotidase is not required for ischemic preconditioning in rabbit myocardium in situ. *Am. J. Physiol.* **275**: 1329-1337.
156. MILLEDGE, J. S., COTES, P. M. (1985) Serum erythropoietin in humans at high altitude and its relation to plasma renin. *J. Appl. Physiol.* **59**: 360-364.
157. MILLER, C. P., HEILMAN, D. W., WOJCHOWSKI, D. M. (2002) Erythropoietin receptor-dependent erythroid colony-forming unit development: capacities of Y343 and phosphotyrosine-null receptor forms. *Blood*. **99**: 898-904.
158. MILLER, M. E., CHANDRA, M., GARCIA, J. F. (1985) Clinical applications of measurement of serum immunoreactive levels of erythropoietin. *Ann. NY Acad. Sci.* **459**: 375-381.
159. MILLER, M. E., CRONKITE, E. P., GARCIA, J. F. (1982) Plasma levels of immunoreactive erythropoietin after acute blood loss in man. *Br. J. Haematol.* **52**: 545-549.
160. MILLER, M. E., GARCIA, J. F., SHIUE, G. G., OKULA, R. M., CLEMONS, G. K. (1983) Humoral regulation of erythropoiesis. *Haematopoietic Stem Cells*: 217-228.
161. MIRAND, E. A., GORDON, A. S., ZANJANI, E. D., BENNETT, T. E., MURPHY, G. P. (1972) Disappearance of exogenous erythropoietin (ESF) from the blood of germfree mice. *Proc. Soc. Es. Biol. Med.* **139**: 161-164.

-
162. MIURA, Y., MUIRA, O., IHLE, J. N., AOKI, N. (1994) Activation of the mitogen activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J. Biol. Chem.* **269**: 29962-29969.
163. MIURA, O., NAKAMURA, N., QUELLE, F. W., WITTHUHN, B. A., IHLE, J. N., AOKI, N. (1994) Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo. *Blood* **84**: 1501-1507.
164. MIYAKE, T., KUNG, C. K., GOLDWASSER, E. (1977) Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **252**: 5558-5564.
165. MOON, C., KRAWCZYK, M., AHN, D., AHMET, I., PAIK, D., LAKATTA, E. G., TALAN, M. I. (2003) Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 11612-11617.
166. MOSER, G. H., SCHRADER, J., DEUSSEN, A. (1989) Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am. J. Physiol.* **256**: 799-806.
167. MUFSON, R. A., GESNER, T. G. (1987) Binding and internalization of recombinant human erythropoietin in murine erythroid precursor cells. *Blood* **69**: 1485-1490.
168. NAGAKURA, K., UENO, M., BROOKINS, J., BECKMANN, B. S., FISHER, J. W. (1987) Effects of low calcium levels on erythropoietin production by human renal carcinoma cells in culture. *Am. J. Physiol.* **253** (*Cell. Physiol.* **22**): C797-C801.
169. NAGASHIMA, K., KARASAWA, A. (1996) Modulation of erythropoietin production by selective adenosine agonists and antagonists in normal and anaemic rats. *Life Sci.* **59**: 761-771.
170. NAKASHIMA, J., BROOKINS, J., BECKMAN, B., FISHER, J. W. (1991) Increased erythropoietin secretion in human hepatoma cells by N6-cyclohexyl-adenosine. *Am. J. Physiol.* **261**: 455-460.
171. NAKASHIMA, J., OHIGASHI, T., BROOKINS, J. W., BECKMAN, B. S., AGRAWAL, K. C., FISHER, J. W. (1993) Effects of 5'-N-ethylcarboxamideadenosine (NECA) on erythropoietin production. *Kidney. Int.* **44**: 734-740.
172. NAPIER, J. A. F., DUNN, C. D. R., FORD, T. W., PRICE, V. (1977) Pathophysiological changes in serum erythropoiesis stimulating activity. *Br. J. Haematol.* **35**: 403-409.

173. NARRAVULA, S., LENNON, P. F., MUELLER, B. U., COLGAN, S. P. (2000) Regulation of endothelial CD 73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endothelial barrier function. *J. Immunol.* **165**(9): 5262-5268.
174. NISHIYAMA, A., MIYATAKE, A., AKI, Y., FUKUI, T., RAHMAN, M., KIMURA, S., ABE, Y. (1999) Adenosine A(1) receptor antagonist KW-3902 prevents hypoxia-induced renal vasoconstriction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**: 988-993.
175. OBARA, N., IMAGAWA, S., NAKANO, Y., SUZUKI, N., YAMAMOTO, M., NAGASAWA, T. (2003) Suppression of erythropoietin gene expression by cadmium depends on inhibition of HIF-1, not stimulation of GATA-2. *Arch. Toxicol.* **77**: 267-273.
176. OBLADEN, M., MAIER, R., SEGERER, H., GRAUEL, L., HOLLAND, B. M., STEWART, G., JORCH, G., RABE, H., LINDERKAMP, O., HOFFMAN, H. G., HOUGHTON, F., HERRMANN, Z., SCIGALLA, P., WARDROP, C. (1991) Efficacy and safety of recombinant human erythropoietin to prevent the anemias of prematurity. *Contrib. Nephrol.* **88**: 314-326.
177. OHIGASHI, T., BROOKINS, J., FISHER, J. W. (1993) Adenosine A1 receptors and erythropoietin production. *Am. J. Physiol.* **265**: 934-938.
178. OHIGASHI, T., NAKASHIMA, J., AGGARWAL, S., BROOKINS, J., AGRAWAL, K., FISHER, J. W. (1995) Enhancement of erythropoietin production by selective adenosine A2 receptor agonists in response to hypoxia. *J. Lab. Clin. Med.* **126**(3): 299-306.
179. OKUSA, M. D. (2002) A2a adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **282**: 10-18.
180. OSSWALD, H., NABAKOWSKI, G., HERMES, H. (1980) Adenosine as a possible mediator of metabolic control of glomerular filtration rate. *Int. J. Biochem.* **12**: 263-267.
181. OSSWALD, H., SCHMITZ, H. J., KEMPER, R. (1977) Tissue content of adenosine, inosine and hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and postischemic recirculation. *Pflugers Arch.* **371**: 45-49.
182. ÖZÜYAMAN, B., DING, Z., BUCHHEISER, A., KOSZALKA, P., BRAUN, N., GÖDECKE, A., DECKING, U. K. M., ZIMMERMANN, H., SCHRADER, J. (2006) Adenosine produced via the CD73/ecto-5'-nucleotidase pathway has no impact on erythropoietin production but is associated with reduced kidney weight. *Eur. J. Physiol.* **452**: 324-331.

183. PAGEL, H., JELKMANN, W., WEISS, C. (1988) A comparison of the effects of renal artery constriction and anemia on the production of erythropoietin. *Pflugers Arch.* **413**: 62-66
184. PAGEL, H., JELKMANN, W., WEISS, C. (1989) O₂-supply to the kidneys and the production of erythropoietin. *Respir. Physiol.* **77**: 111-117.
185. PAPAYANNOPOULOU, T., FINCH, C. A. (1972) On the in vivo action of erythropoietin: a quantitative analysis. *J. Clin. Invest.* **51**: 1179-1185.
186. PARSA, C. J., MATSUMOTO, A., KIM, J., RIEL, R. U., PASCAL, L. S., WALTON, G. B., THOMPSON, R. B., PETROFSKI, J. A., ANNEX, B. H., STAMLER, J. S., KOCH, W. J. (2003) A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J. Clin. Invest.* **112**: 999-1007.
187. PAUL, P., ROTHMANN, S. A., MEAGHER, R. C. (1988) Modulation of erythropoietin production by adenosine. *J. Lab. Clin. Med.* **112**(2): 168-173.
188. PENTA, K., SAWYER, S. T. (1995) Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation nuclear translocation and DNA binding of STAT1 and STAT5 in erythroid cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 31282-31287.
189. PERCY, M. J., MOONEY, S. M., MCMULLIN, M. F., FLORES, A., LAPPIN, T. R., LEE, F. S. (2003) A common polymorphism in the oxygen-dependent degradation (ODD) domain of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) does not impair Pro-564 hydroxylation. *Mol. Cancer* **2**: 31.
190. PESCHLE, C., RAPPAPORT, I. A., SASSO, G. F., CONDORELLI, M., GORDON, A. S. (1973) The role of estrogen in the regulation of erythropoietin production. *Endocrinology* **92**: 358-362.
191. PESCHLE, C., RAPPAPORT, I. A., SASSO, G. F., GORDON, A. S., CONDORELLI, M. (1972) Mechanism of growth hormone (GH) action on erythropoiesis. *Endocrinology* **91**: 511-517.
192. PESCHLE, C., ZANJANI, E. D., GIDARI, A. S., MCDAUMN, W. D., GORDON, A. S. (1971) Mechanism of thyroxine action on erythropoiesis. *Endocrinology* **89**: 609-612.
193. PHILO, J. S., AOKI, K. H., ARKAWS, T., NAHRI, L. O., WEN, J. (1996) Diemerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction. *Biochemistry* **35**: 1681-1691.

194. PICHER, M. BURCH, L. H., HIRSH, A. J., SPYCHALA, J., BOUCHER, R. C. (2003) Ecto 5'-nucleotidase and non-specific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J. Biol. Chem.* **278**: 13468-13479.
195. POWELL, J. S., BERKNER, K. L., LEBO, R. V., ADAMSON, J. W. (1986) Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6465-6469.
196. QUINTERO, M., MACKENZIE, N., BRENNAN, P. A. (2004) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* **30**: 465-468.
197. RAMOS-SALAZAR, A., BAINES, A. D. (1986) Role of 5'-nucleotidase in adenosine-mediated renal vasoconstriction during hypoxia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **236**: 494-499.
198. RATCLIFFE, P. J. (1993) Molecular biology of erythropoietin. *Kidney Int.* **44**: 887-904.
199. REGE, A. B., BROOKINS, J., FISHER, J. W. (1982) A radioimmunoassay for erythropoietin: serum levels in normal human subjects and patients with hemopoietic disorders. *J. Lab. Clin. Med.* **100**: 829-843.
200. REMY, I., WILSON, I. A., MICHNICK, S. W. (1999) Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* **283**: 990-993.
201. RICH, I. N., HEIT, W., KUBANEK, B. (1982) Extrarenal erythropoietin production by macrophages. *Blood* **60**: 1007-1008.
202. RITZ, E., EISENHART, A. (2000) Early epoetin treatment in patients with renal insufficiency. *Nephrol. Dial. Transpl.* **15**: 40-44.
203. RODRÍGUEZ, F. A., VENTURA, J. L., CASAS, M., CASAS, H., PAGÉS, T., RAMA, R., RICART, A., PALACIOS, L., VISCOR, G. (2000) Erythropoietin acute reaction and haematological adaptations to short, intermittent hypobaric hypoxia. *Eur. J. Appl. Physiol.* **82**: 170-177.
204. ROSSE, W. F., WALDEMANN, T. A. (1964) The metabolism of erythropoietin in patients with anaemia due to deficient erythropoiesis. *J. Clin. Investig.* **43**: 1348-1354.
205. SAKAMOTO, S., IGARASHI, T., OSUMI, N., IMAMOTO, T., TOBE, T., KAMIYA, M., ITO, H. (2003) Erythropoietin-producing renal cell

- carcinoma in chronic hemodialysis patients: a report of two cases. *Int. J. Urol.* **10**: 49-51.
206. SALVATORE, C. A., TILLEY, S. L., LATOUR, A. M., FLETCHER, D. S., KOLLER, B. H., JACOBSON, M. A. (2000) Disruption of the A3 adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 4429-4434.
207. SANCHEZ, C., MERINO, C., FIGALLO, M. (1970) Simultaneous measurement of plasma volume and cell mass in polycythemia of high altitude. *J. Appl. Physiol.* **28**: 775-778.
208. SANDNER, P., WOLF, K., BERGMAIER, U., GESS, B., KURTZ, A. (1997) Induction of VEGF and VEGF receptor gene expression by hypoxia: divergent regulation in vivo and in vitro. *Kidney Int.* **51**: 448-453.
209. SAVIC, V., BLANCHARD, A., VLAHOVIC, P., STEFANOVIC, V., ARDAILLOU, N., ARDAILLOU, R. (1991) Cyclic adenosine monophosphate-stimulating agents induce ecto-5'-nucleotidase activity and inhibit DNA synthesis in rat cultured mesangial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**: 202-206.
210. SAWADA, K., KRANTZ, S. B., DAI, C.-H., KOURY, S. T., HORN, S. T., GLICK, A. D., CIVIN, C. I. (1990) Purification of human blood burst-forming unit-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptor. *J. Cell. Physiol.* **142**: 219-230.
211. SAWYER, S. T., KRANTZ, S. B. (1984) Erythropoietin stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in Friend virus-infected erythroid cells. *J. Biol. Chem.* **259**: 2769-2774.
212. SAWYER, S. T., PENTA, K. (1996) Association of JAK2 and STAT5 with erythropoietin receptors. Role of receptor phosphorylation in erythropoietin signal transduction. *J. Biol. Chem.* **271**: 32430-32437.
213. SCARO, J. L., CARRERA, M. A., PRADO DE TOMBOLESI, A. R., MIRANDA, C. (1975) Carbon monoxide and erythropoietin production in mice. *Acta Physiol. Lat. Am.* **25**: 204-210.
214. SCHMIDT, W., MAASSEN, N., TROST, F., BÖNING, D. (1988) Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **57**: 490-498.
215. SCHMIDT, W., SPIELVOGEL, H., ECKARDT, K. U., QUINTELA, A., PENALOZA, R. (1993) Effects of chronic hypoxia and exercise on

- plasma erythropoietin in high-altitude residents. *J. Appl. Physiol.* **74**(4): 1874-1878.
216. SCHOLZ, H., SCHUREK, H. K., ECKARDT, K. U., KURTZ, A., BAUER, C. (1991) Oxygen dependent erythropoietin production by the isolated perfused rat kidney. *Pflügers Arch.* **418**: 228-233.
217. SCHOOLEY, J. C., MAHLMANN, L. J. (1972) Evidence for the de novo synthesis of erythropoietin in hypoxic rats. *Blood* **40**: 662-670.
218. SCHUSTER, S. J., WILSON, J. H., ERSLEV, A. J., CARO, J. (1987) Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* **70**: 316-318.
219. SHERWOOD, J. B., GOLDWASSER, E., CHILCOTE, R., CARMICHAEL, L. D., NAGEL, R. L. (1986) Sickle cell anemia patients have low erythropoietin levels for their degree of anaemia. *Blood* **67**: 46-49.
220. SEMENZA, G.L. (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* **88**: 1474-1480.
221. SEMENZA, G. L. (2001) O₂ and 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* **107**: 1-3.
222. SHARMA, R., BLAKE, K., MURPHY, S., CLANCY, M., DUCKWORTH, L., PITEL, P., LAWRENCE, S. (1994) The effect of short-term administration of theophylline on erythropoietin levels in healthy adults. *Pharmacotherapy* **14**: 215-218.
223. SHERWOOD, J. B., GOLDWASSER, E. (1979) A radioimmunoassay for erythropoietin. *Blood.* **54**: 885-893.
224. SMIT-VAN OOSTEN, A., BAKKER, W. W., VAN GOOR, H. (2002) De-novo expression of vascular ecto-5'-nucleotidase and down-regulation of glomerular ecto-ATPase in experimental chronic renal transplant failure. *Transplant Int.* **15**(12): 602-609.
225. SPIELMAN, W. S., AREND, L. J. (1991) Adenosine receptors and signalling in the kidney. *Hypertension* **17**: 117-130.
226. STEINBERG, S. E., GARCIA, J. F., MATZKE, G. R., MLADENOVIC, J. (1986) Erythropoietin kinetics in rats: generation and clearance. *Blood* **67**: 646-649.
227. STYTOWSKI, A. J. (1980) Denaturation and renaturation of human erythropoietin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **96**: 143-149.

228. SUFRIN, G., MIRAND, E. A., MOORE, R. H., CHU, T. M., MURPHY, G. P. (1977) Hormones in renal cancer. *J. Urol.* **117**: 433-438.
229. SUGINO, H., SHIMADA, H., TSUCHIMOTO, K. (2001) Role of adenosine in renal protection induced by a brief episode of ischemic preconditioning in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **87**: 134-142.
230. SYNNESTVEDT, K., FURUTA, G., T., COMERFORD, K., M., LOUIS, N., KARHAUSEN, J., ELTZSCHIG, H. K., HANSEN, K. R., THOMPSON, L. F., COLGAN, S. P. (2002) Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* **110**: 993-1002.
231. TAN, C. C., ECKARDT, K. U., FIRTH, J. D., RATCLIFFE, P.J. (1992) Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anaemia and hypoxia. *Am. J. Physiol.* **263**: 474-481.
232. TAN, C. C., RATCLIFFE, P. J. (1992) Rapid oxygen-dependent changes in erythropoietin mRNA in perfused rat kidneys: evidence against mediation by cAMP. *Kidney Int.* **41**: 1581-1587.
233. TASSIOPOULOS, S., KONTOS, A., KONSTANTOPOULOS, K., HADZISTAVROU, C., VAIPOULOS, G., AESSOPOS, A., TASSIOPOULOS, T. (2001) Erythropoietic response to hypoxaemia in diffuse idiopathic pulmonary fibrosis, as opposed to chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* **95**: 471-475.
234. TAUCHI, T., DAMEN, J. E., TOYAMA, K., FENG, G. S., BROXMEYER, H. E., KRYSTAL, G. (1996) Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis. *Blood* **87**: 4495-4501.
235. THOMPSON, L. F., ELTZSCHIG, H. K., IBLA, J. C., VAN DE WIELE, C. J., RESTA, R., MOROTE-GARCIA, J. C., COLGAN, S. P. (2004) Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD 73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.* **200**: 1395-1405.
236. THOMSON, S., BAO, D., DENG, A., VALLON, V. (2000) Adenosine formed by 5'-nucleotidase mediates tubuloglomerular feedback. *J. Clin. Invest.* **106**: 289-298.
237. TODOKORO, K., SUGIYAMA, M., NISHIDA, E., NAKAYA, K. (1994) Activation of mitogen-activated protein kinase cascade through

- erythropoietin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**: 1912-1919.
238. TRIPATHY, S. K., SVENSSON, E. C., BLACK, H. B., GOLDWASSER, E., MARGALITH, M., HOBART, P. M., LEIDEN, J. M. (1996) Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10876-10880.
239. UENO, M., BROOKINS, J., BECKMAN, B., FISHER, J. W. (1988) A1 and A2 adenosine receptor regulation of erythropoietin production. *Life Sci.* **43**: 229-237.
240. UENO, M., SEFERYNSKA, I., BECKMAN, B., BROOKINS, J., NAKASHIMA, J., FISHER, J. W. (1989) Enhanced erythropoietin secretion in hepatoblastoma cells in response to hypoxia. *Am. J. Physiol.* **257** (*Cell. Physiol.* **26**): C743-C749.
241. VAN WAARDE, A., STROMSKI, M. E., THULIN, G., GAUDIO, K. M., KASHGARIAN, M., SHULMAN, R. G., SIEGEL, N. J. (1989) Protection of the kidney against ischemic injury by inhibition of 5'-ectonucleotidase. *Am. J. Physiol.* **256**: 298-305.
242. VEKARIA, R. M., SHIRLEY, D. G., SÉVIGNY, J., UNWIN, R. J. (2006) Immunolocalization of ectonucleotidases along the rat nephron. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**: 550-560
243. VOLMER, J. B., THOMPSON, L. F., BLACKBURN, M. R. (2006) Ecto-5'-nucleotidase (CD 73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury. *J. Immunol.* **176**: 4449-4458.
244. VON LINDERN, M., PARREN-VAN AMELSVOORT, M., VAN DIJK, T., DEINER, E., VAN DEN AKKER, E., VAN EMST-DE VRIES, S., WILLEMS, P., BEUG, H., LOWENBERG, B. (2000) Protein kinase C alpha controls erythropoietin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **275**: 34719-34727.
245. WANG, R. Y., TSAI, S. C., LU, C. C., SHIH, H. C., CHEN, Y.H., TUNG, Y. F., WANG, W. F., WANG, S. W., WANG, P. S. (1996) Effect of aging on erythropoietin secretion in male rats. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **51**: 434-438.
246. WATKINS, P. C., EDDY, R., HOFFMAN, N., STANISLOVITIS, P., BECK, A. K., GALLI, J., VELLUCCI, V., GUSELLA, J. F., SHOWS, T. B. (1986) Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7q22. *Cytogenet. Cell Genet.* **42**: 214-218.

247. WICKREMA, A., KRANTZ, S. B., WINKELMANN, J. C., BONDURANT, M. C. (1992) Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells. *Blood* **80**: 1940-1949.
248. WIDE, L., BENGTSSON, C., BIRGEGARD, G. (1989) Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. *Br. J. Haematol.* **72**: 85-90.
249. WIDNESS, J. A., CLEMONS, G. K., GARCIA, J. F., SCHWARTZ, R. (1984) Plasma immunoreactive erythropoietin in normal women studied during and after pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **149**: 646-650.
250. WINKELMANN, J. C., PENY, L. A., DEAVEN, L. L., FORGET, B. G., JENKINS, R. B. (1990) The gene for the human erythropoietin receptor: analysis of the coding sequence and assignment to chromosome 19p. *Blood* **76**: 24-30.
251. WU, H., KLINGMÜLLER, U., BESMER, P., LODISH, H. F. (1995) Interaction of erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* **377**: 242-246.
252. YASUDA, Y., MASUDA, S., CHIKUMA, M., INOUE, K., NAGAO, M., SASAKI, R. (1998) Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **273**: 25381-25387.
253. YOSHIMURA, A., ARAI, K. (1996) Physician Education: The Erythropoietin Receptor and Signal Transduction. *Oncologist* **1**: 337-339.
254. ZANJANI, E. D., POSTER, J., BURLINGTON, H., MANN, L. I., WASSERMANN, L. R. (1977) Liver as the primary site of erythropoietin production in the fetus. *J. Lab. Clin. Med.* **89**: 640-644.
255. ZHU, H., BUNN, H. F. (2001) How do cells sense oxygen? *Science* **292**: 449-451.
256. ZOU, A. P., WU, F., LI, P. L., COWLEY, A. W. JR. (1999) Effect of chronic salt loading on adenosine metabolism and receptor expression in renal cortex and medulla in rats. *Hypertension* **33**: 511-516

Diplom-/Doktorarbeiten

257. ZEBSKI, H. (1997) Die Bedeutung des Adenosins für die Kontrolle der Erythropoietinproduktion in Ratten.

258. ZHANG, H. (2004) The role of adenosine receptors in the carbon monoxide-induced erythropoietin secretion in adenosine receptor knockout mice.

VII. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Dr. med. A. Grenz für die kontinuierliche Betreuung und die stets hilfreiche Unterstützung in dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank für viele Anregungen und Ratschläge gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Oßwald.

Des Weiteren möchte ich mich aufrichtig bei Herrn Dr. C. Köhle bedanken, der mir die Techniken der PCR und der Klonierung näher brachte und mir immer hilfreich beiseite stand.

Frau H. Zhang danke ich herzlich für die Einweisung in verschiedene Methoden sowie für die stets freundliche Zusammenarbeit.

Herrn W. Beer sei ausdrücklich für die Lösung vieler technischer Probleme gedankt.

VIII. LEBENSLAUF

Name: Simone Corinna von Wietersheim

Geboren: 08. Februar 1982

Geburtsort: Windhoek, Namibia

Schulbildung: 1987 – 1990 Farmschule Gras, Kalkrand
1991 – 2000 Deutsche Höhere Privatschule Windhoek
(Abschlüsse: Higher International
General Certificate of Secondary
Education; Deutsche Hochschulreife)

Studium: 2000 – 2001 Studium Generale am “Leibniz Kolleg“,
Tübingen
2001 – 2007 Medizinstudium an der Universität
Tübingen
2003 Ärztliche Vorprüfung
2004 – 2006 Experimenteller Teil der vorliegenden
Dissertation am pharmakologischen
Institut der Universität Tübingen
2006 – 2007 Praktisches Jahr in Südafrika, Tübingen,
Schweiz
27.11.2007 Ärztliche Prüfung (2. Abschnitt)